

19



OFICINA ESPAÑOLA DE  
PATENTES Y MARCAS

ESPAÑA



11 Número de publicación: **2 713 240**

51 Int. Cl.:

**G01N 33/574** (2006.01)

12

TRADUCCIÓN DE PATENTE EUROPEA

T3

86 Fecha de presentación y número de la solicitud internacional: **16.02.2015 PCT/EP2015/053196**

87 Fecha y número de publicación internacional: **20.08.2015 WO15121465**

96 Fecha de presentación y número de la solicitud europea: **16.02.2015 E 15704319 (1)**

97 Fecha y número de publicación de la concesión europea: **12.12.2018 EP 3108254**

54 Título: **Proteína asociada a vesícula que interacciona con G-alfa (GIV) como marcador predictivo en cáncer colorrectal de estadio II**

30 Prioridad:

**17.02.2014 US 201461940705 P**

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

**20.05.2019**

73 Titular/es:

**VENTANA MEDICAL SYSTEMS, INC. (25.0%)  
1910 E. Innovation Park Drive  
Tucson, Arizona 85755, US;  
THE REGENTS OF THE UNIVERSITY OF  
CALIFORNIA (25.0%);  
THE UNITED STATES OF AMERICA AS  
REPRESENTED BY THE DEPARTMENT OF  
VETERANS AFFAIRS (25.0%) y  
F. HOFFMANN-LA ROCHE AG (25.0%)**

72 Inventor/es:

**LEITH, KATHERINE;  
ROHR, ULRICH-PETER;  
SINGH, SHALINI;  
GHOSH, PRADIPTA;  
HU, SONG;  
LAFLEUR, BONNIE;  
MURANYI, ANDREA y  
SHANMUGAM, KANDAVEL**

74 Agente/Representante:

**LINAGE GONZÁLEZ, Rafael**

**ES 2 713 240 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

Proteína asociada a vesícula que interacciona con G-alfa (GIV) como marcador predictivo en cáncer colorrectal de estadio II

5

### Campo

En el presente documento se proporcionan métodos y kits para analizar muestras de cáncer colorrectal (CRC) de estadio II (concretamente las que son competentes para reparación de apareamiento erróneo, pMMR). Tales métodos incluyen puntuar la expresión de proteína asociada a vesícula que interacciona con G-alfa (GIV, también conocida como girdina) de longitud completa (GIV-fl) para proporcionar un estado de GIV-fl para el CRC en combinación con determinar el estado de invasión linfovascular (LVI) del CRC.

10

### Partes del acuerdo de investigación conjunta

15

Ventana Medical Systems, Inc. y la Universidad de California, San Diego son partes de un acuerdo de investigación conjunta que rige las invenciones dadas a conocer en el presente documento.

### Antecedentes

20

La metástasis es un proceso complejo de múltiples etapas que implica la migración de células tumorales a ubicaciones distantes en el organismo. Las células cancerosas que migran o invaden usan receptores quimiotácticos para detectar gradientes de factor de crecimiento y deben amplificar la señalización de PI3K-Akt (Muller *et al.*, Nature, 2001. 410(6824):50-6). En cánceres epiteliales humanos, la ruta de señalización de PI3K-Akt está frecuentemente hiperactivada durante la invasión por cáncer (Larue y Bellacosa, Oncogene, 2005. 24(50):7443-54), y la potenciación progresiva de PI3K-Akt acoplada a una migración celular eficiente son rasgos distintivos de un alto potencial metastásico (Qiao *et al.*, Cancer Res, 2007. 67(11):5293-9). Sin embargo, la predicción precisa de potencial metastásico de tumores usando marcadores biológicos identificados de manera mecánica ha obtenido un éxito limitado (Fidler, Nat Rev Cancer, 2003. 3(6):453-8). A pesar de recientes estudios que muestran que la expresión de genes/proteínas asociados con la señalización de PI3K-Akt, remodelado de actina, motilidad e invasión varía entre tumores (Qiao *et al.*, Cell Cycle, 2008. 7(19):2991-6), la mayoría de ellos no han logrado realizar una transición a la clínica contra el cáncer como biomarcadores para pronóstico. Además, se ha sugerido la expresión de GIV-fl en la predicción de la supervivencia de pacientes con cáncer de colon (García-Marcos *et al.*, FASEB J, 2011. 25(2):590-9). Sin embargo, continúa realizándose investigación para obtener moléculas/marcadores que se demuestre que desempeñan un papel durante la invasión tumoral, cuyos mecanismos de acción estén bien caracterizados y que también puedan servir para estratificar el riesgo de recidiva o metástasis entre pacientes con cáncer en las clínicas.

25

30

35

### Sumario

40

La presente solicitud proporciona métodos, tal como se define en las reivindicaciones, que permiten la clasificación de un paciente con cáncer colorrectal de estadio II (tal como un estadio IIa o IIb) que es competente para reparación de apareamiento erróneo (pMMR) como de riesgo alto o bajo, es decir, si es probable que su CRC presente recidiva o progresión. Tales métodos son útiles ya que pueden seleccionarse pacientes con riesgo alto de progresión para recibir quimioterapia o bioterapia, mientras que pueden seleccionarse pacientes con riesgo bajo para no recibir quimioterapia o bioterapia. Los métodos reivindicados pueden ir seguidos por tratar a pacientes que se ha identificado que tienen un riesgo alto con quimioterapia o bioterapia. Además, los métodos dados a conocer pueden usarse para quimiopredicción, es decir, identificar tumores de CRC pMMR estadio II (tal como un estadio IIa o IIb) que es más probable que respondan a quimioterapia o bioterapia (por ejemplo, los clasificados como de riesgo alto con los métodos dados a conocer).

45

50

En el presente documento se muestra que la determinación de la expresión de proteína asociada a vesícula que interacciona con G-alfa de longitud completa (GIV-fl) (por ejemplo puntuando la expresión de GIV-fl), y la determinación del estado de invasión linfovascular (LVI) del sujeto, pueden predecir con alta precisión los CRC de estadio II que es probable que presenten recidiva (por ejemplo dentro del plazo de al menos 2 años o al menos 5 años), y los que no es probable que presenten recidiva. En algunos ejemplos, los métodos también usan una o más de otras características del sujeto, tales como la edad del sujeto en el diagnóstico, número de ganglios linfáticos que son positivos para CRC, sexo del sujeto, estado de diferenciación tumoral, estadio T del cáncer; y en qué lado estaba presente el cáncer de colon, para determinar si es probable que el CRC de estadio II presente recidiva, y por tanto es un tumor de riesgo alto que debe tratarse con quimioterapia o bioterapia.

55

60

Por tanto, la divulgación proporciona métodos para analizar una muestra de CRC pMMR de estadio II obtenida de un sujeto, por ejemplo para clasificar el CRC como uno que tiene riesgo alto o riesgo bajo de progresión, por ejemplo dentro del plazo de 1 año, dentro del plazo de 2 años, dentro del plazo de 3 años, dentro del plazo de 4 años, dentro del plazo de 5 años o dentro del plazo de 6 años. El método incluye poner en contacto una muestra de CRC pMMR de estadio II con un agente de unión específica a proteína asociada a vesícula que interacciona con G-alfa GIV-fl, en

65

el que el agente de unión específica a proteína GIV-fl comprende un anticuerpo específico para GIV-fl (es decir, que no puede detectar formas de GIV a las que les falta el extremo C-terminal, tales como los 762 ó 763 aminoácidos C-terminales), o poner en contacto ARN aislado de una muestra con una sonda de ácido nucleico específica para ARNm de proteína asociada a vesícula que interacciona con G-alfa de longitud completa (GIV-fl). El método también incluye puntuar la expresión de ARNm o proteína GIV-fl en la muestra para determinar un estado de GIV-fl (por ejemplo, positivo o negativo) de la muestra.

En un ejemplo, puntuar la expresión de proteína GIV-fl incluye determinar un grado de tinción de GIV-fl positiva para la muestra en una escala de 0 a 3, en el que al grado de tinción positiva se le asigna 0 si del 0% al 10% del área total de la muestra se tiñe de manera positiva, en el que al grado de tinción positiva se le asigna 1 si el 11%-35% del área total de la muestra se tiñe de manera positiva, en el que al grado de tinción positiva se le asigna 2 si el 36%-50% del área total de la muestra se tiñe de manera positiva, y en el que al grado de tinción positiva se le asigna 3 si el 51%-100% del área total de la muestra se tiñe de manera positiva; determinar una intensidad de tinción de GIV-fl para la muestra en una escala de 0 (negativa), 1 (débil), 2 (moderada) a 3 (fuerte); sumar el grado de tinción de GIV-fl positiva y la intensidad de tinción de GIV-fl, generando así un valor de puntuación de GIV-fl de desde 0 hasta 6; y determinar que la muestra es negativa para GIV-fl si el valor de puntuación de GIV-fl es de 0-2 o determinar que la muestra es positiva para GIV-fl si el valor de puntuación de GIV-fl es de 3-6.

En otro ejemplo, puntuar la expresión de proteína GIV-fl incluye determinar si un área total de tinción de GIV-fl para la muestra es mayor del 10% o determinar si la intensidad de tinción de GIV-fl para la muestra es de 3+ (fuerte). Por ejemplo, una muestra puede puntuarse como negativa (0) si hay una ausencia de cualquier señal detectable o señal de color tostado/gris pálido que es similar a la intensidad en el reactivo de control negativo; una muestra puede puntuarse como débil (1+) si hay intensidad de tinción de color marrón claro que es más que la observada en el reactivo de control negativo y en el fondo; una muestra puede puntuarse como moderada (2+) si hay intensidad de color marrón; o una muestra puede puntuarse como intensidad fuerte (3+) si hay intensidad de señal de color marrón oscuro a negro. Se determina que el estado de GIV-fl es positivo si el área total de tinción de GIV-fl con cualquier intensidad para la muestra es mayor del 10% o si la intensidad de tinción de GIV-fl es fuerte (3+) con cualquier porcentaje; o se determina que el estado de GIV-fl es negativo si el área total de tinción de GIV-fl con una intensidad de tinción de 0, 1+ o 2+ para la muestra es menor del 10%. El método también incluye determinar el estado de invasión linfovascular (LVI) del sujeto, por ejemplo determinando si hay células de CRC viables presentes en cualquiera de vasos sanguíneos o vaso(s) linfático(s) están presentes en el tumor. En algunos ejemplos, el método incluye además determinar una o más características adicionales del sujeto, tales como la edad del sujeto en el diagnóstico, el número de ganglios linfáticos que son positivos para CRC, sexo del sujeto, estado de diferenciación tumoral, estadio T del cáncer; y en qué lado estaba presente el cáncer de colon. El estado de GIV-fl, estado de LVI, y opcionalmente una o más de las características del sujeto determinados se introducen en un ordenador o algoritmo, que después genera una salida, analizando así la muestra. En algunos ejemplos, la salida es una indicación de si es probable que el CRC presente progresión (por ejemplo, metastática). Por ejemplo, la salida puede ser una notación de que el CRC es de riesgo alto o bajo. En algunos ejemplos la salida es la supervivencia libre de progresión (SLP) probable del sujeto. Esto puede permitir a un médico identificar los sujetos que no han recibido previamente quimioterapia que es probable que respondan al tratamiento con quimioterapia o bioterapia (riesgo alto) de un sujeto que no ha recibido previamente quimioterapia que no necesita quimioterapia o bioterapia (riesgo bajo). Una o más etapas de los métodos dados a conocer pueden realizarse mediante un ordenador programado de manera adecuada.

El método reivindicado puede ir seguido por tratar a un sujeto identificado como de riesgo alto con quimioterapia o bioterapia, tal como uno o más de 5-fluorouracilo, leucovorina, panitumumab (VECTIBIX®), cetuximab (ERBITUX®), bevacizumab (AVASTIN®), ziv-aflibercept (ZALTRAP®), irinotecán (CAMPTOSAR®) y oxaliplatino (ELOXATIN®).

También se proporcionan métodos implementados por ordenador. En un ejemplo, el método incluye generar una puntuación de expresión de proteína GIV-fl basándose al menos en la expresión de proteína GIV-fl medida dentro de una imagen visualizada que representa una muestra de cáncer colorrectal (CRC) de estadio II marcada de manera detectable con un anticuerpo frente a GIV-fl, en el que la muestra de CRC se obtiene de un sujeto, y en el que la puntuación de expresión de proteína GIV-fl se genera mediante (i) determinar un grado de tinción de GIV-fl positiva para la muestra en una escala de 0 a 3, en el que al grado de tinción positiva se le asigna 0 si del 0% al 10% del área total de la muestra se tiñe de manera positiva, en el que al grado de tinción positiva se le asigna 1 si el 11%-35% del área total de la muestra se tiñe de manera positiva, en el que al grado de tinción positiva se le asigna 2 si el 36%-50% del área total de la muestra se tiñe de manera positiva, y en el que al grado de tinción positiva se le asigna 3 si el 51%-100% del área total de la muestra se tiñe de manera positiva; determinar una puntuación de intensidad de tinción de GIV-fl (por ejemplo, una intensidad de tinción global o predominante) para la muestra en una escala de 0 a 3 (por ejemplo, una muestra puede puntuarse como negativa (0) si hay una ausencia de cualquier señal detectable o señal de color tostado/gris pálido que es similar a la intensidad en el reactivo de control negativo; una muestra puede puntuarse como débil (1) si hay intensidad de tinción de color marrón claro que es más que la observada en el reactivo de control negativo y en el fondo; una muestra puede puntuarse como moderada (2) si hay intensidad de color marrón; o una muestra puede puntuarse como intensidad fuerte (3) si hay intensidad de señal de color marrón oscuro a negro); sumar el grado de tinción de GIV-fl positiva y la intensidad de tinción de GIV-fl, generando así un valor de puntuación de GIV-fl de desde 0 hasta 6; y determinar que la muestra es negativa para

GIV-fl si el valor de puntuación de GIV-fl es de 0-2 o determinar que la muestra es positiva para GIV-fl si el valor de puntuación de GIV-fl es de 3-6; o (ii) determinar si un área total de tinción de GIV-fl para la muestra es mayor del 10% o determinar si la intensidad de tinción de GIV-fl es de 3+ (fuerte) (por ejemplo, una muestra puede puntuarse como negativa (0) si hay una ausencia de cualquier señal detectable o señal de color tostado/gris pálido que es similar a la intensidad en el reactivo de control negativo; una muestra puede puntuarse como débil (1+) si hay intensidad de tinción de color marrón claro que es más que la observada en el reactivo de control negativo y en el fondo; una muestra puede puntuarse como moderada (2+) si hay intensidad de color marrón; o una muestra puede puntuarse como intensidad fuerte (3+) si hay intensidad de señal de color marrón oscuro a negro), y determinar que la muestra es positiva para GIV-fl si el área total de tinción de GIV-fl con cualquier intensidad para la muestra es mayor del 10% o si la intensidad de tinción de GIV-fl es fuerte (3+) con cualquier porcentaje; o determinar que la muestra es negativa para GIV-fl si el área total de tinción de GIV-fl con una intensidad de tinción de 0, 1+ o 2+ para la muestra es menor del 10%. La puntuación de expresión de proteína GIV-fl resultante para la muestra puede emitirse desde el ordenador, tal como una salida visual o audible. En algunos ejemplos, los métodos implementados por ordenador incluyen además introducir el estado de invasión linfocelular (LVI) del sujeto en el ordenador y opcionalmente introducir en el ordenador una o más características del sujeto, en los que las una o más características incluyen edad del sujeto en el diagnóstico, número de ganglios linfáticos que son positivos para CRC; sexo del sujeto, estado de diferenciación tumoral, estadio T del cáncer; y en qué lado estaba presente el cáncer de colon. En algunos ejemplos, las una o más características del sujeto incluyen, el grado tumoral, LVI, número de ganglios linfáticos examinados, si hay invasión perineural, si hay perforación localizada, y si los márgenes son indeterminados o positivos. Entonces el ordenador puede proporcionar una salida, tal como si es probable que el CRC presente progresión (por ejemplo, metastatice). Por ejemplo, la salida puede ser una notación de que el CRC es de riesgo alto o bajo, la supervivencia libre de progresión (SLP) probable del sujeto, el pronóstico para el sujeto, si es probable que un sujeto se beneficie de quimioterapia o bioterapia o combinaciones de las mismas.

También se dan a conocer uno o más medios legibles por ordenador no transitorios que incluyen instrucciones ejecutables por ordenador que hacen que un sistema informático realice los métodos proporcionados en el presente documento.

También se describen sistemas para analizar una muestra de cáncer colorrectal (CRC) competente para reparación de apareamiento erróneo (pMMR) de estadio II obtenida de un sujeto. Tales sistemas pueden incluir unos medios para medir un nivel de GIV-fl en la muestra (tal como un anticuerpo específico para GIV-fl); y medios para determinar el estado de LVI del sujeto (tal como H&E o anticuerpos específicos para marcadores de LVI tales como CD34 y/o endotelio linfático). En algunos ejemplos, el sistema incluye reglas implementadas para determinar el estado de GIV-fl de la muestra (por ejemplo, positivo o negativo) basándose en el nivel medido de GIV-fl. En algunos ejemplos, el sistema incluye reglas implementadas para comparar el nivel medido de GIV-fl con un valor de referencia de GIV-fl, tal como un control positivo o negativo para GIV-fl. En algunos ejemplos, el sistema incluye reglas implementadas para determinar el estado de LVI de la muestra (por ejemplo, positivo o negativo), por ejemplo basándose en el nivel medido de marcadores de LVI o basándose en marcadores histológicos (por ejemplo, Tinción de H&E). En algunos ejemplos, el sistema incluye reglas implementadas para comparar los marcadores medidos de LVI con una muestra o valor de referencia de LVI o muestra, tal como un control positivo o negativo para LVI. En algunos ejemplos, los valores de referencia de GIV-fl y/o LVI son valores almacenados. En algunos ejemplos, los valores de referencia de GIV-fl y/o LVI son un nivel de GIV-fl y/o LVI medido a partir de una muestra de control mediante dichos medios para medir. El sistema también puede incluir uno o más medios para implementar las reglas, mediante lo cual se proporciona una indicación del riesgo probable de recidiva de CRC y/o respuesta probable del CRC a quimioterapia o bioterapia basándose en el estado de GIV-fl y de LVI. En algunos ejemplos, el sistema también incluye unos medios para determinar una o más características del sujeto, en el que las una o más características incluyen edad del sujeto en el diagnóstico, número de ganglios linfáticos que son positivos para CRC; sexo del sujeto, estado de diferenciación tumoral, estadio T del cáncer; y en qué lado estaba presente el cáncer de colon; y reglas implementadas para comparar el nivel medido de una o más características con un valor de referencia para las una o más características.

La invención también proporciona kits, que pueden usarse con los métodos proporcionados en el presente documento. En un ejemplo, el kit incluye un agente de unión específica a GIV-fl, tal como clon de anticuerpo SP173. El kit incluye: un agente de unión específica que permite una determinación de LVI que comprende un anticuerpo específico para CD34 o endotelio linfático; un agente de unión específica a proteína de reparación de apareamiento erróneo que comprende un anticuerpo específico para homólogo de mutL 1 (MLH1); segregación posmeiótica aumentada 2 (PMS2); homólogo de proteína MutS 2 Msh2 (MSH2), homólogo de proteína MutS 6 (MSH6), o una combinación de tales anticuerpos; y opcionalmente portaobjetos de microscopio; anticuerpos secundarios marcados; y tampones para IHC.

En algunas realizaciones, la divulgación incluye un método para analizar una muestra de cáncer colorrectal (CRC) competente para reparación de apareamiento erróneo (pMMR) de estadio II obtenida de un sujeto, que comprende: aislar ARN de la muestra, poner en contacto la muestra que contiene el ARN con una sonda de ácido nucleico específica para ARNm de proteína asociada a vesícula que interacciona con G-alfa de longitud completa (GIV-fl); y determinar la cantidad del ARNm de GIV-fl en la muestra.

Los objetos y características anteriores y otros de la divulgación resultarán más evidentes a partir de la siguiente descripción detallada, que se realiza con referencia a las figuras adjuntas.

**Breve descripción de los dibujos**

5 La figura 1 es un diagrama de flujo de datos que describe las etapas usadas en el modelado estadístico dado a conocer en el presente documento.

10 Las figuras 2A y 2B son imágenes digitales que muestran la tinción de IHC de muestras de colon (A) normal y (B) cancerosa con anticuerpo frente a GIV de IBL o el Ac SP173 descrito en el ejemplo 1.

La figura 2C son imágenes digitales que muestran la tinción de IHC de GIV-fl de líneas de células cancerosas.

15 Las figuras 3A-3C son imágenes digitales que muestran la tinción de IHC de líneas de células cancerosas invasivas (A) MDA MB231; (B) DLD1 y en (C) hígado normal con diferentes cantidades del anticuerpo frente a GIV descrito en el ejemplo 1.

20 Las figuras 4A-4B son imágenes digitales que muestran la tinción de IHC de casos de cáncer de colon negativo para GIV (A) y positivo para GIV (B) con diferentes cantidades del anticuerpo frente a GIV descrito en el ejemplo 1.

Las figuras 5A-5D son imágenes digitales que muestran la tinción de IHC usando el anticuerpo frente a GIV descrito en el ejemplo 1 en cánceres colorrectales con una puntuación de (A) 0, (B) 1+, (C) 2+ o (D) 3+.

25 La figura 6 muestra curvas de Kaplan-Meier para todos los sujetos con CRC de estadio II (T3+T4) estratificados como competentes para reparación de apareamiento erróneo (pMMR), deficientes para reparación de apareamiento erróneo (dMMR), pMMR/positivos para GIV, pMMR/negativos para GIV, usando el algoritmo para la puntuación de la puntuación de grado e intensidad de GIV-fl mostrado en la tabla 7.

30 Las figuras 7A-7B muestran curvas de supervivencia de Kaplan-Meier usando (A) la puntuación de grado e intensidad de GIV-fl a partir de la tabla 7 o (B) la puntuación predictiva de GIV-fl.

35 La figura 8 muestra curvas de Kaplan-Meier para sujetos con CRC de estadio II que no han recibido previamente quimioterapia (T3+T4) estratificados como competentes para reparación de apareamiento erróneo (pMMR), deficientes para reparación de apareamiento erróneo (dMMR), pMMR/positivos para GIV, pMMR/negativos para GIV, usando el algoritmo para la puntuación de la puntuación predictiva de GIV-fl mostrado en la tabla 7.

La figura 9 muestra un gráfico de puntos de las posibles variables de predicción clasificadas mediante estadística de  $\chi^2$  parcial ajustada.

40 Las figuras 10A-10B muestran gráficos de AUC para cuatro modelos de predicción estadística para la supervivencia libre de progresión (A) a los 2 años y (B) a los 5 años.

45 La figura 11 muestra una curva de capacidad de predicción curva para pacientes con CRC de estadio II T3 que no han recibido previamente quimioterapia basándose en un modelo estadístico que incluye GIV-fl y LVI.

La figura 12 muestra curvas de Kaplan-Meier para pacientes con CRC de estadio II T3 que no han recibido previamente quimioterapia (gráfico superior) y tratados con quimioterapia (gráfico inferior) a partir de la cohorte de BioGrid 1 estratificados para GIV+LVI y MMR.

50 La figura 13 muestra curvas de Kaplan-Meier para pacientes con CRC de estadio II T3 que no han recibido previamente quimioterapia (gráfico superior) y tratados con quimioterapia (gráfico inferior) a partir de la cohorte de BioGrid 2 estratificados para GIV+LVI y MMR.

**Lista de secuencias**

55 SEQ ID NO: 1 es la secuencia de proteína de número de registro de GenBank® BAE44387

1 meneiftplll eqfmtsplvt vvkftfgplaa gngtnldeyv alvdgvflnq vmlqinpkle  
 61 sqrvnkkvnn daslrnmhnl ilvrqikfyy qetlqqlimm slpnlviigk npfseqgtee  
 121 vkklllllllg cavqccqkee fieriqgldf dtkaavaahi qevthnqenv fdlqwmvtd  
 181 msqediepll knmalhlkrl iderdehset ielseerdg lhflphasss aqspcgspgm  
 241 krtesrqhls veladakaki rrlrqeleeq teqlldckqe leqmeielkr lqqenmnlis  
 301 darsarmyrd eldalrekav rvdklesevs rykerlhdie fykarveelk ednqvllletk  
 361 tmlqdqlegq rarsdklhel ekenlqlkak lhdmemerdm drkkieelme enmtlemaqk  
 421 qsmdeslhlq weleqisrts elseapqksl ghevnelts rllklemenq sltkktveelr  
 481 ttvdsvegna skilkmeken qrlskkveil eneivqekqs lqncqnlskd lmkekaqlek  
 541 tietlrense rqikileqen ehlnqtvssl rqrqsisaesa rvkdiekenk ilhesikets  
 601 sklskiefek rqiikkelehy kekgeraeel enelhhleke nellqkkitn lkitcekiea  
 661 leqenseler enrklkktld sfknltfqls slekensqld eenlelrrnv eslkcasmmk  
 721 aqlqlenkel esekeqlkkg lellkasfkk terlevsyqg ldiqnrlqk tlensnkkik  
 781 qleseqldle menqtlqknl eelkisskrl eqlekenksl eqetsqlekd kkqlekenkr  
 841 lrqqaeikdt tleennvkig nlekenkts keigiyykesc vrlkeleken kelvkratid  
 901 iktlvtlred lvseklktqg mnndleklth elekiglnke rllhdeqstd drykllleskl  
 961 estlkslei keekiaalea rleestnyng qlrqlkktvk knyealkqrq deermvqssp  
 1021 pisgednkwe resqettrel lkvkdrliev ernnatlqae kqalktqlkq letqnnnlqa  
 1081 qilalqrqtv slqeqnrttl tqnaklqven stlnsqstsl mnqnaqliq qsslenenes  
 1141 vikeredlks lydslikdhe klellherqa seyesliskh gtllsahknl evehrdledr  
 1201 ynqllkqkqg ledlekmlkv eqekmlenk nhetvaaeyk klcgendrln htysqllket  
 1261 evlqtdhknk ksilnnskle qtrleaefsk lkeqyqqldi tstklennqce llsqikgnle  
 1321 eenrhlldqv qtimlqnrll leqnmeskdl fhveqqrqid klnelrrrqqe kleekimdqy  
 1381 kfydpspprr rgnwitlkmr klikskkdin rerqksltlt ptrsdssegf lqlphqdsqd  
 1441 sssvgsnsls dgqtlgtkks smvalkrlpf lnrnrpkdkd mkacyrrsm mndlvqsmvl  
 1501 agqwtgsten levppdistg krrkelgama fsttainfst vnssagfrsk qlvnnkdtts  
 1561 fedispqgvs ddsstgsrvh asrpaldsgr rtstnsnnsn aslhevkaqa vnnqsrpqsh  
 1621 ssgefslldh heawsssgss piqylkrqtr sspvlqhkis etlesrhhki ktgspgsevv  
 1681 tlqqfleeen kltsvqkss sqenlldevm kslsvssdf l gkdkpvcgl arsvsgktpg  
 1741 dfydrtrtkp eflrpgprkt edtyfissag kptpgtqgki klvkesslsr qskdsnpyat  
 1801 lprassvist aegtrrtsi hdfltkdsrl psvdpsppa adsnttaasn vdkvqesrns  
 1861 ksrreqqss

SEQ ID NO: 2 es la secuencia de proteína de número de registro de GenBank® Q3V6T2

1 MENEIFTPLLL EQFMTSPLVT VVKFTFGPLAA GNGTNLDEYV ALVDGVFLNQ VMLQINPKLE  
 61 SQRVNKKVNN DASLRMHNLS ILVRQIKFYY QETLQQQLIMM SLPNVLIGK NPFSEQGTEE  
 121 VKKLLLLLLLG CAVQCQKKEE FIERIQGLDF DTAAVAHAHI QEVTHNQENV FDLQWMEVTD  
 181 MSQEDIEPLL KNMALHLKRL IDERDEHSET IELSEERDG LHFLPHASSS AQSPCGSPGM  
 241 KRTERSQHLS VELADAKAKI RRLRQELEEK TEQLLDCKQE LEQMEIELKR LQQENMNLIS  
 301 DARSARMYRD ELDALREKAV RVDKLESEVS RYKERLHDIE FYKARVEELK EDNQVLLLET  
 361 TMLDQLEGT RARSDKLHEL EKENLQLKAK LHDMEMERDM DRKKIEELME ENMTLEMAQK  
 421 QSMDESLHLG WELEQISRTS ELSEAPQKSL GHEVNETSS RLLKLEMENQ SLTKTVEELR  
 481 TTVDSEVNA SKILMEKEN QRLSKKVEIL ENEIVQEKQS LQNCQNLKSD LMKEKAQLEK  
 541 TIETLRENSE RQIKILEQEN EHLNQTVSSL RQRQSISAESA RVKDIKENK ILHESIKETS  
 601 SKLSKIEFEK RQIKKELEHY KEKGERAEEL ENELHHLEKE NELLQKKITN LKITCEKIEA  
 661 LEQENSELER ENRKLKKTLD SFKNLTFQLE SLEKENSQLD EENLELRRNV ESLKCSMMK  
 721 AQLQLENKEL ESEKEQLKKG LELLKASFKK TERLEVSQYG LDIENQRLQK TLENSNKKIQ  
 781 QLESELQDLE MENQTLQKNL EELKISSKRL EQLEKENKSL EQETSQLEKD KKQLEKENKR  
 841 LRQQAEIKDT TLEENNVKIG NLEKENKTS KEIGIYKESC VRLKELEKEN KELVKRATID  
 901 IKTLVTLRED LVSEKKTQG MNNDLEKLTH ELEKIGLNKE RLLHDEQSTD DRYKLLLESK  
 961 LESTLKSLE IKEEKIAALE ARLEESTNYN QQLRQELKTV KKNYEALKQR QDEERMOVSS  
 1021 PISGEDNKWE ERESQETTREL LLKVKDRILIE VERNNATLQA EKQALKTQLK QLETQNNNLQA  
 1081 QILALQRQT VSLQEQNTTL QTQNAKLQVE NSTLNSQSTS LMNNAQLLI QSSLENENE  
 1141 SVIKEREDLK SLYDSLKDH EKLELLHERQ ASEYESLISK HGTLLSAHKN LEVEHRDLED  
 1201 RYNQLLKQKG QLEDLEKMLK VEQEKMLLEN KNHETVAAEY KKLCCGENDRL NHTYSQLLKE  
 1261 TEVLQTPDHKN LKSLNNSKL EQTRLEAEFS KLKEQYQQLD ITSTKLNNQC ELLSQKGNL  
 1321 EENRHLLDQV IQTLMQNRLL LEQNMESKD LFHVEQRQYI DKLNELRRQK EKLEKIMDQY  
 1381 KYFYDPSPPR RRGNWITLKM RKLIKSKKDI NRERQKSLTL TPTRSDSSEG FLQLPHQDSQ  
 1441 DSSVGSNSL EDGQTLGTTK SSMVALKRLP FLNRNRPKDKD KMKACYRRSM SMNDLVQSMV  
 1501 LAGQWTGSTE NLEVPDDIST GKRRKELGAM AFSTTAINFS TVNSSAGFRS QQLVNNKDTT  
 1561 SFEDISPQGV SDDSTGSRV HASRPAALDS GRTSTNSNNS NASLHEVKAG AVNNQSRPQS  
 1621 HSSGEFSLLD DHEAWSSSGS SPIQYLKRQT RSPVLQHKI SETLESRHHK IKTGSPGSEV  
 1681 VTLQQFLEES NKLTSVQKSS SQENLLDEV MKSLSVSSDF LGKDKPVCGL LARVSGKTPG  
 1741 GDFYDRTRTK PEFLRPGPRK TEDTYFISSA GKPTPGTQGI IKLVKESLS RQSKDSNPYA  
 1801 TLPRASSVIST AEGTRRTS IHDFTLKDSR LPISVDSPPA AADSNNTAAS NVDKVQESRN  
 1861 SKRSREQQS S

5

**Descripción detallada**

10 Las siguientes explicaciones de términos y métodos se proporcionan para describir mejor la presente divulgación y para orientar a los expertos habituales en la técnica en la práctica de la presente divulgación. Las formas en singular “un”, “una” y “el/la” hacen referencia a uno o más de uno, a menos que el contexto indique claramente lo contrario. Por ejemplo, el término “que comprende una célula” incluye una única o varias células y se considera equivalente a la frase “que comprende al menos una célula”. El término “o” se refiere a un único elemento de elementos

alternativos mencionados o a una combinación de dos o más elementos, a menos que el contexto indique claramente lo contrario. Tal como se usa en el presente documento, “comprende” significa “incluye”. Por tanto, “que comprende A o B”, significa “que incluye A, B, o A y B”, sin excluir elementos adicionales. Las fechas de n.ºs de registro de GenBank® a las que se hace referencia en el presente documento son las secuencias disponibles al menos a partir del 17 de febrero de 2014.

A menos que se explique lo contrario, todos los términos técnicos y científicos usados en el presente documento tienen el mismo significado que el entendido habitualmente por un experto habitual en la técnica a la que pertenece esta divulgación. Aunque en la práctica o pruebas de la presente divulgación pueden usarse métodos y materiales similares o equivalentes a los descritos en el presente documento, a continuación se describen métodos y materiales adecuados. Los materiales, métodos y ejemplos son sólo ilustrativos y no se pretende que sean limitativos.

Con el fin de facilitar la revisión de las diversas realizaciones de la divulgación, se proporcionan las siguientes explicaciones de términos específicos:

Anticuerpo: Moléculas de inmunoglobulina y porciones inmunológicamente activas de moléculas de inmunoglobulina, es decir, moléculas que contienen un sitio de unión a antígeno que se une específicamente a (inmunorreacciona con) un antígeno (tal como proteínas GIV-fl, CD34 o MMR). Los anticuerpos a modo de ejemplo incluyen anticuerpos monoclonales, policlonales y humanizados, tales como los que son específicos para GIV de longitud completa (por ejemplo, pueden detectar los aminoácidos C-terminales de SEQ ID NO: 1 ó 2, tal como usando el Ac descrito en el ejemplo 1). En algunos ejemplos, los anticuerpos pueden ser de diagnóstico, por ejemplo se usan para detectar la presencia de una proteína tal como GIV de longitud completa (GIV-fl). En algunas realizaciones, el anticuerpo frente a GIV-fl de diagnóstico comprende el dominio variable de cadena ligera y/o dominio variable de cadena pesada del anticuerpo producido en el ejemplo 1. En algunos ejemplos, un anticuerpo frente a GIV-fl se une específicamente a la proteína GIV de longitud completa, pero no a una proteína GIV que tiene un extremo C-terminal deletado (por ejemplo, GIV $\Delta$ CT, que en algunos ejemplos carece de los 762 ó 763 aminoácidos C-terminales).

En algunos ejemplos, un anticuerpo tiene una afinidad de unión alta por GIV-fl, tal como una afinidad de unión de al menos aproximadamente  $1 \times 10^{-8}$  M, al menos aproximadamente  $1,5 \times 10^{-8}$ , al menos aproximadamente  $2,0 \times 10^{-8}$ , al menos aproximadamente  $2,5 \times 10^{-8}$ , al menos aproximadamente  $3,0 \times 10^{-8}$ , al menos aproximadamente  $3,5 \times 10^{-8}$ , al menos aproximadamente  $4,0 \times 10^{-8}$ , al menos aproximadamente  $4,5 \times 10^{-8}$  o al menos aproximadamente  $5,0 \times 10^{-8}$  M. En determinadas realizaciones, un anticuerpo que se une a GIV de longitud completa tiene una constante de disociación (Kd) de  $\leq 104$  nM,  $\leq 100$  nM,  $\leq 10$  nM,  $\leq 1$  nM,  $\leq 0,1$  nM,  $\leq 0,01$  nM o  $\leq 0,001$  nM (por ejemplo,  $10^{-8}$  M o menos, por ejemplo, desde  $10^{-8}$  M hasta  $10^{-13}$  M, por ejemplo, desde  $10^{-9}$  M hasta  $10^{-13}$  M). En una realización, la Kd se mide mediante un ensayo de unión a antígeno radiomarcado (RIA) realizado con la versión Fab de un anticuerpo de interés y su antígeno (véase, por ejemplo, Chen *et al.*, J. Mol. Biol. 293:865-881, 1999). En otro ejemplo, la Kd se mide usando ensayos de resonancia de plasmón superficial usando un dispositivo BIACORES-2000 o BIACORES-3000 (BIAcore, Inc., Piscataway, N.J.) a 25°C con chips CM5 de antígeno inmovilizado a aproximadamente 10 unidades de respuesta (UR). La unión puede medirse usando una variedad de métodos convencionales en la técnica, incluyendo, pero sin limitarse a: inmunotransferencia de tipo Western, inmunotransferencia, ensayo de inmunoabsorción ligado a enzimas (ELISA), radioinmunoensayo (RIA), inmunoprecipitación, resonancia de plasmón superficial, quimioluminiscencia, polarización fluorescente, fosforescencia, análisis inmunohistoquímico, espectrometría de masas de tiempo de vuelo con ionización por desorción de láser asistida por matriz, microcitometría, micromatriz, microscopía, clasificación celular activada por fluorescencia (FACS) y citometría de flujo.

Un anticuerpo que se produce de manera natural (tal como IgG, IgM, IgD) incluye cuatro cadenas polipeptídicas, dos cadenas pesadas (H) y dos cadenas ligeras (L) interconectadas mediante enlaces disulfuro. Tal como se usa en el presente documento, el término anticuerpo también incluye anticuerpos recombinantes producidos mediante expresión de un ácido nucleico que codifica para una o más cadenas de anticuerpo en una célula (por ejemplo, véanse la patente estadounidense n.º 4.745.055; patente estadounidense n.º 4.444.487; documento WO 88/03565; documento EP 256.654; documento EP 120.694; documento EP 125.023; Faoukner *et al.*, Nature 298:286, 1982; Morrison, J. Immunol. 123:793, 1979; Morrison *et al.*, Ann Rev. Immunol. 2:239, 1984).

El término anticuerpo también incluye un fragmento de unión a antígeno de un anticuerpo que se produce de manera natural o recombinante. Ejemplos específicos, no limitativos, de fragmentos de unión abarcados dentro del término anticuerpo incluyen Fab, (Fab) $_2$ , Fv y Fv de cadena sencilla (scFv). Fab es el fragmento que contiene un fragmento de unión a antígeno monovalente de una molécula de anticuerpo producido mediante digestión de anticuerpo completo con la enzima papaína para producir una cadena ligera intacta y una porción de una cadena pesada o de manera equivalente mediante ingeniería genética. Fab' es el fragmento de una molécula de anticuerpo obtenido tratando anticuerpo completo con pepsina, seguido por reducción, para producir una cadena ligera intacta y una porción de la cadena pesada; se obtienen dos fragmentos Fab' por molécula de anticuerpo. (Fab') $_2$  es el fragmento del anticuerpo obtenido tratando anticuerpo completo con la enzima pepsina sin reducción posterior o de manera equivalente mediante ingeniería genética. F(Ab') $_2$  es un dímero de dos fragmentos FAB' mantenidos juntos mediante enlaces disulfuro. Fv es un fragmento modificado por ingeniería genética que contiene la región variable de la cadena ligera y la región variable de la cadena pesada expresadas como dos cadenas. Un anticuerpo de cadena

sencilla (“SCA”) es una molécula modificada por ingeniería genética que contiene la región variable de la cadena ligera, la región variable de la cadena pesada, unidas mediante un ligador polipeptídico adecuado como una molécula de cadena sencilla fusionada de manera genética. Los métodos de preparación de estos fragmentos son rutinarios en la técnica.

5 Poner en contacto: Poner un agente en estrecha proximidad con otro agente, permitiendo así que los agentes interactúen. Por ejemplo, puede aplicarse un anticuerpo frente a GIV-fl a un portaobjetos de microscopio u otra superficie que contiene una muestra biológica (tal como una muestra de CRC de estadio II), permitiendo así la detección de proteínas GIV-fl en la muestra que se reconocen específicamente por el anticuerpo frente a GIV-fl.

10 Detectar: Determinar si un agente está presente o ausente. En algunos ejemplos, esto puede incluir además la cuantificación. Por ejemplo, el uso de un anticuerpo específico para una proteína particular (por ejemplo, GIV-fl) permite la detección de la proteína en una muestra, tal como una muestra que contiene tejido canceroso. En ejemplos particulares, se detecta una señal de emisión a partir de una etiqueta detectable (tal como un aumento en la señal si está presente la diana). La detección puede ser a granel, de modo que puede observarse simultáneamente un número macroscópico de moléculas. La detección también puede incluir identificación de señales a partir de moléculas individuales usando microscopía y técnicas tales como reflexión interna total para reducir el ruido de fondo.

20 Proteína asociada a vesícula que interactúa con G-alfa (GIV, también conocida como girdina) (OMIM 609736): Un factor de intercambio de nucleótido guanina no receptor (GEF) para Gai. Se requiere un motivo de GEF único en el extremo C-terminal de GIV para la activación de Gai (Garcia-Marcos *et al.*, Proc Natl Acad Sci USA, 2009. 106:3178-83). Activando Gai y liberando G $\beta\gamma$  “libre”, GIV amplifica la señalización de Akt mediante la ruta de G $\beta\gamma$ -PI3K (Garcia-Marcos *et al.*, Proc Natl Acad Sci USA, 2009. 106:3178-83). Se requiere un complejo molecular compuesto por una proteína G trimérica, Gai, y GIV para factores de crecimiento (EGF (Enomoto *et al.*, Dev Cell, 2005. 9:389-402; Ghosh *et al.*, J Cell Biol, 2008. 182:381-93)), IGF (Jiang *et al.*, Cancer Res, 2008. 68(5):1310-8), VEGF (Kitamura *et al.*, Nat Cell Biol, 2008. 10(3):329-37), insulina (Garcia-Marcos *et al.*, Proc Natl Acad Sci USA, 2009. 106:3178-83; Ghosh *et al.*, J Cell Biol, 2008. 182:381-93, Anai *et al.*, J Biol Chem, 2005. 280:18525-35) para potenciar Akt, remodelar la actina y desencadenar la migración celular.

30 El extremo C-terminal de GIV se une directamente a las colas citoplasmáticas autofosforiladas de EGFR, y de ese modo une una proteína G a receptores activados por ligando. Cuando el extremo C-terminal de GIV está intacto se ensambla un complejo de señalización Gai-GIV-EGFR, se potencia la autofosforilación de EGFR y se prolonga la asociación del receptor con la membrana plasmática (PM). Por consiguiente, se amplifican las señales basadas en PM que desencadenan la motilidad (PI3K-Akt y PLC $\gamma$ 1), se remodela la actina y se desencadena la migración celular (Ghosh *et al.*, Mol. Biol. Cell. 2010. 21:2338-54). Por tanto, el extremo C-terminal de GIV sirve como plataforma común que une receptores activados por ligando (Ghosh *et al.*, Mol. Biol. Cell. 2010. 21:2338-54) en el borde de ataque con actina (Enomoto *et al.*, Dev Cell, 2005. 9:389-402), Akt (Enomoto *et al.*, Dev Cell, 2005. 9:389-402; Anai *et al.*, J Biol Chem, 2005. 280:18525-35) y Gai (Garcia-Marcos *et al.*, Proc Natl Acad Sci USA, 2009. 106:3178-83), tres componentes cuya interacción es esencial para la migración celular.

45 GIV es una fosfoproteína de tirosina que se une directamente a, y activa, fosfoinositida 3-cinasa (PI3K). Tras la estimulación por ligando de diversos receptores, GIV se fosforila en la tirosina 1764 y la tirosina 1798 mediante tirosina cinasas tanto receptoras como no receptoras. Estos acontecimientos de fosforilación permiten la unión directa de GIV a los dominios de homología de Src 2 amino-y carboxilo-terminales de p85 $\alpha$ , una subunidad reguladora de PI3K; estabilizan la asociación de receptor con PI3K; y potencian la actividad de PI3K en la membrana plasmática para desencadenar la migración celular.

50 El gen de GIV humana (CCDC88A) codifica, en algunos ejemplos, para una proteína de 1870 aminoácidos (1871 en una isoforma de GIV humana) con una masa molecular predicha de aproximadamente 220 kDa. La estructura de GIV puede dividirse en varias regiones diferentes: Un dominio de campana de unión a microtúbulos (aminoácidos 1-195), dominio de oligomerización helicoidal enrollado (aminoácidos 196-1304), un dominio de unión G-alfa (aminoácidos 1343-1424), un dominio de unión a fosfoinositida (PI4P) (aminoácidos 1390-1408), un dominio de unión a Akt, actina y receptor (aminoácidos 1623-1870), un dominio SH2 (aminoácidos 1714-1815) que está a aproximadamente 15 aa en sentido de 3' del motivo de GEF (aminoácidos 1674-1694). La expresión de ARNm de GIV se regula por incremento durante la progresión metastásica en diversos cánceres, incluyendo de mama, colorrectal, de pulmón, melanoma maligno, carcinoma de células renales, carcinomas gástricos, carcinoma pancreático, carcinoma esofágico y carcinoma de tiroides.

60 Las secuencias de GIV están públicamente disponibles, por ejemplo a partir de la base de datos de secuencias GenBank® (por ejemplo, números de registro NP-001129069 y BAE44387.1 (proteína), y AB201172.1 y NM\_001135597.1 (ácido nucleico)). El número de registro de GenBank® Q3V6T2 proporciona una variante de GIV-fl de 1871 aa. Un experto habitual en la técnica puede identificar secuencias de ácido nucleico y de proteína de GIV adicionales, incluyendo variantes de GIV.

65 Hibridación: Formar pares de bases entre regiones complementarias de dos cadenas de ADN, ARN o entre ADN y

ARN, formando así una molécula dúplex. Las condiciones de hibridación que dan como resultado grados particulares de rigurosidad variarán dependiendo de la naturaleza del método de hibridación y la composición y longitud de las secuencias de ácido nucleico en hibridación. Generalmente, la temperatura de hibridación y la fuerza iónica (tal como la concentración de Na<sup>+</sup>) del tampón de hibridación determinarán la rigurosidad de hibridación. La presencia de un producto químico que disminuye la hibridación (tal como formamida) en el tampón de hibridación también determinará la rigurosidad (Sadhu *et al.*, J. Biosci. 6:817-821, 1984). Se comentan cálculos referentes a las condiciones de hibridación para alcanzar grados particulares de rigurosidad en Sambrook *et al.*, (1989) Molecular Cloning, segunda edición, Cold Spring Harbor Laboratory, Plainview, NY (capítulos 9 y 11). También se comentan condiciones de hibridación para ISH en Landegent *et al.*, Hum. Genet. 77:366-370, 1987; Lichter *et al.*, Hum. Genet. 80:224-234, 1988; y Pinkel *et al.*, Proc. Natl. Acad. Sci. USA 85:9138-9142, 1988.

Etiqueta: Un agente que puede detectarse, por ejemplo mediante espectrofotometría, citometría de flujo o microscopía (tal como microscopía óptica). Por ejemplo, pueden unirse una o más etiquetas a un anticuerpo, permitiendo así la detección de la proteína diana (tal como GIV). Las etiquetas a modo de ejemplo incluyen isótopos radiactivos, fluoróforos, ligandos, agentes quimioluminiscentes, haptenos, enzimas y combinaciones de los mismos.

Invasión linfovascular (LVI): La invasión de células tumorales, tales como células de CRC, en vasos sanguíneos o vasos linfáticos. Si hay células tumorales presentes en vasos sanguíneos o vasos linfáticos, el estado de LVI del sujeto o tumor es positivo. Si no hay células tumorales presentes en vasos sanguíneos o vasos linfáticos, el estado de LVI del sujeto o tumor es negativo. Sin embargo, si el sujeto o tumor es positivo para LVI, esto no significa necesariamente que el tumor se haya propagado a los ganglios linfáticos.

Tejido o células normales: Tejido y células no tumorales, no malignos.

Competente para reparación de apareamiento erróneo (pMMR): Se dice que un tumor, tal como un CRC, es positivo para pMMR si el sistema de reparación de apareamiento erróneo de ADN (MMR) es competente, en contraposición a un tumor con un sistema de MMR deficiente (dMMR). Los cánceres con pMMR pueden mostrar inestabilidad de microsatélites (MSI) a baja frecuencia. Pueden usarse métodos rutinarios para determinar la presencia o ausencia de MMR, tal como mediante pruebas de MSI usando PCR o análisis de la expresión de proteínas de MMR, MLH1, PMS2, MSH2 y MSH6, mediante IHC.

Cebador: Un oligonucleótido que se hibrida con una secuencia en el ácido nucleico diana y puede actuar como punto de inicio de la síntesis a lo largo de una cadena complementaria de ácido nucleico en condiciones adecuadas para tal síntesis. No se requiere una complementariedad perfecta para que se produzca la extensión del cebador. Sin embargo, un cebador con complementariedad perfecta (especialmente cerca del extremo 3'-terminal) se extenderá de manera más eficiente que un cebador con apareamientos erróneos, especialmente apareamientos erróneos en o cerca del extremo 3'-terminal.

Sonda: Un oligonucleótido que se hibrida con una secuencia en el ácido nucleico diana y puede marcarse de manera detectable. La sonda puede tener modificaciones, tales como una modificación en el extremo 3'-terminal que hace que la sonda no pueda extenderse mediante ácido nucleico polimerasas; y uno o más cromóforos.

PCR cuantitativa o RT-PCR cuantitativa: Una reacción de amplificación de ácido nucleico en la que el ácido nucleico diana se detecta de manera cuantitativa. La QPCR se caracteriza por una "curva de crecimiento" que es un gráfico de una función, en la que una variable independiente es el número de ciclos de amplificación y una variable dependiente es un parámetro medible dependiente de la amplificación (tal como la cantidad de fluorescencia emitida por una sonda específica tras la hibridación, o tras la hidrólisis de la sonda mediante la actividad nucleasa de la ácido nucleico polimerasa) que se mide en cada ciclo de amplificación, véase Holland *et al.*, (1991) Proc. Natl. Acad. Sci. 88:7276-7280 y la patente estadounidense n.º 5.210.015. El parámetro medible dependiente de la amplificación refleja entre otras variables la cantidad inicial del ácido nucleico diana. Una curva de crecimiento se caracteriza normalmente por un valor de "ciclos hasta el umbral" o "valor de C<sub>t</sub>", que es un número de ciclos en los que se logra una magnitud predeterminada del parámetro medible. Un valor de C<sub>t</sub> inferior o "anterior" refleja una mayor cantidad del ácido nucleico diana de entrada, mientras que un valor de C<sub>t</sub> superior o "posterior" representa una cantidad inferior del ácido nucleico diana de entrada.

Muestra: Un espécimen biológico que contiene ADN genómico, ARN (incluyendo ARNm), proteína, células intactas (por ejemplo, una muestra de tejido) o combinaciones de los mismos, obtenidos de un sujeto. Los ejemplos incluyen un espécimen que contiene al menos una célula cancerosa (una muestra de cáncer o muestra de tejido canceroso), por ejemplo, una muestra de resección quirúrgica, una biopsia tisular o tumoral, aspirado de aguja fina, lavado bronquioalveolar, líquido pleural, esputo, espécimen quirúrgico, ganglio linfático, una metástasis o material de autopsia. En otros ejemplos, una muestra incluye una muestra de control, tal como una muestra de célula o tejido no canceroso. En un ejemplo el control es un control negativo, tal como una muestra que se sabe que no incluye proteína GIV-fl detectable (hepatocitos en una muestra de hígado que no se tiñe con anticuerpos frente a GIV-fl). En otro ejemplo, el control es un control positivo, tal como una muestra que se sabe que incluye GIV-fl detectable (tal como una muestra de células COS-7; n.º de catálogo de ATCC CRL-1651, o células distintas de hepatocitos en una muestra de hígado tales como células estrelladas, sinusoides).

5 Agente de unión específica: Un agente que se une sustancial o preferiblemente sólo a una diana definida tal como una proteína, por ejemplo una proteína GIV-fl. En algunos ejemplos, un agente de unión específica a GIV-fl se une específicamente a la proteína GIV de longitud completa, pero no a una proteína GIV que tiene un extremo C-terminal delecionado (por ejemplo, GIV $\Delta$ CT, que en algunos ejemplos carece de los 762 ó 763 aminoácidos C-terminales).

10 Un agente de unión específica a proteína GIV-fl se une sustancialmente sólo a proteína GIV-fl, o a una región específica dentro de la proteína GIV-fl (tal como el extremo C-terminal). Por ejemplo, un "agente de unión específica a GIV-fl" incluye anticuerpos y otros agentes, tales como aptámeros, que se unen sustancialmente a un polipéptido de GIV-fl. Los anticuerpos pueden ser anticuerpos monoclonales o policlonales que son específicos para el polipéptido, así como porciones inmunológicamente eficaces ("fragmentos") de los mismos. La determinación de que un agente particular se une sustancialmente sólo a un polipéptido de GIV-fl puede realizarse fácilmente usando o adaptando procedimientos rutinarios. Un ensayo *in vitro* adecuado hace uso del procedimiento de inmunotransferencia de tipo Western (descrito en muchos textos convencionales, incluyendo Harlow y Lane, Using Antibodies: A Laboratory Manual, CSHL, Nueva York, 1999).

15 Sujeto: Organismos vertebrados multicelulares vivos, una categoría que incluye mamíferos humanos y no humanos, tales como sujetos veterinarios. En un ejemplo particular, un sujeto es uno que tiene o se sospecha que tiene cáncer, tal como cáncer colorrectal, por ejemplo CRC de estadio II (tal como CRC de estadio IIa o IIb). En algunos ejemplos el CRC de estadio II es T3, T3/4 o T4. En algunos ejemplos, el sujeto no ha recibido previamente quimioterapia (es decir, no ha recibido anteriormente tratamiento de quimioterapia o bioterapia para su CRC). En algunos ejemplos, el sujeto ha recibido previamente quimioterapia.

25 Cantidad terapéuticamente eficaz: Una dosis suficiente para prevenir el avance, retardar la progresión o provocar la regresión de una enfermedad, o que puede reducir los síntomas provocados por la enfermedad, tal como cáncer, por ejemplo cáncer colorrectal (por ejemplo, CRC de estadio II). En un ejemplo, una cantidad terapéuticamente eficaz es una cantidad de una quimioterapia o bioterapia suficiente para reducir el tamaño o volumen de un tumor, o el número de tumores (tal como el número de metástasis) en al menos el 10%, al menos el 20%, al menos el 50%, al menos el 70% o al menos el 90%, tal como reducir el tamaño, volumen o número (tal como metástasis) de tumores de CRC en al menos el 10%, al menos el 20%, al menos el 50%, al menos el 70% o al menos el 90%.

30 En condiciones suficientes para: Una frase que se usa para describir cualquier entorno que permite la actividad deseada. Un ejemplo incluye poner en contacto un anticuerpo con una muestra biológica suficiente para permitir la detección de una o más proteínas diana (por ejemplo, GIV-fl) en la muestra.

35 Visión general

40 El manejo rutinario de pacientes con cáncer colorrectal de estadio II (CRC) sigue suponiendo un desafío. Aproximadamente el 25% de los pacientes con CRC de estadio II reciben quimioterapia y/o bioterapia adyuvante (habitualmente pacientes más jóvenes y aquellos con riesgo alto tal como se define mediante características clinicopatológicas). En última instancia, se observa un beneficio pequeño pero seguro (una mejora absoluta de aproximadamente el 3% en la supervivencia global) con quimioterapia adyuvante, especialmente en pacientes con tumores que son competentes para reparación de apareamiento erróneo (pMMR).

45 La presente solicitud proporciona métodos, tal como se define en las reivindicaciones, que permiten la clasificación de un paciente con cáncer colorrectal de estadio II (tal como estadio IIa o IIb) que es pMMR como de riesgo alto o bajo, es decir, si es probable que el CRC presente progresión o recidiva. Por ejemplo, CRC puede presentar progresión o recidiva de manera local (el cáncer vuelve a aparecer en la misma zona), a nodos locales (por ejemplo, progresión a estadio III de CRC) o a nodos distantes u otros órganos tales como el hígado o el pulmón (por ejemplo, progresión a estadio IV de CRC). Los métodos dados a conocer son útiles ya que los pacientes con riesgo alto de progresión o recidiva es más probable que muestren un beneficio de quimioterapia o bioterapia que aquellos que tienen un CRC con riesgo bajo para la progresión. Los métodos reivindicados pueden ir seguidos por tratar a los pacientes que se identifica que tienen un CRC con riesgo alto con quimioterapia o bioterapia. En el presente documento se muestra que la determinación de la expresión de proteína asociada a vesícula que interacciona con G-alfa de longitud completa (GIV-fl) (por ejemplo puntuando la expresión de GIV-fl) y la determinación del estado de invasión linfovascular (LVI) del sujeto, pueden predecir con alta precisión los CRC de estadio II que es probable que presenten recidiva (por ejemplo, dentro del plazo de al menos 2 años o al menos 5 años), y por tanto tienen riesgo alto, y aquellos que no es probable que presenten recidiva y por tanto tienen riesgo bajo. En algunos ejemplos, los métodos también usan una o más de otras características del sujeto, tales como la edad del sujeto en el diagnóstico, número de ganglios linfáticos que son positivos para CRC, sexo del sujeto, estado de diferenciación tumoral, estadio T del cáncer; y en qué lado estaba presente el cáncer de colon, para determinar si es probable que el CRC de estadio II presente recidiva, y por tanto es un tumor de riesgo alto que debe tratarse con quimioterapia o bioterapia. En algunos ejemplos, las una o más características del sujeto incluyen una o más de: el grado tumoral, LVI, número de ganglios linfáticos examinados, si hay invasión perineural, si hay perforación localizada y si los márgenes son indeterminados o positivos.

La proteína GIV de longitud completa (GIV-fl), y más específicamente su extremo C-terminal (tal como los 762 ó 763 aminoácidos C-terminales de SEQ ID NO: 1 o SEQ ID NO: 2, respectivamente), que contiene los motivos clave (unión a EGFR, unión a Akt/actina y GEF) está desregulada en células de tumor de mama y colorrectal mediante corte y empalme alternativo (Ghosh *et al.*, Mol. Biol. Cell. 2010. 21:2338-54). En células cancerosas poco invasivas y en carcinomas colorrectales preinvasivos, de estadio temprano, GIV-fl se sustituye por una variante truncada en el extremo C-terminal, GIV $\Delta$ CT. En células cancerosas altamente invasivas y carcinomas invasivos de estadio tardío, GIV-fl se expresa altamente. Por consiguiente, sólo algunas células tumorales y tumores, pero no todos, expresan GIV-fl que contiene un extremo C-terminal funcionalmente intacto y la expresión de GIV-fl se correlaciona con la progresión metastásica.

A pesar de la gran cantidad de información disponible sobre las funciones moleculares y biológicas de GIV-fl durante la invasión de cáncer y la angiogénesis (Garcia-Marcos *et al.*, Proc Natl Acad Sci USA, 2009. 106(9):3178-83; Garcia-Marcos *et al.*, J Biol Chem. 2010. 285:12765-77; Enomoto *et al.*, Dev Cell, 2005. 9(3):389-402; Ghosh *et al.*, J Cell Biol, 2008. 182(2):381-93; Jiang *et al.*, Cancer Res, 2008. 68(5):1310-8; Kitamura *et al.*, Nat Cell Biol, 2008. 10(3):329-37; Anai *et al.*, J Biol Chem, 2005. 280(18):18525-35; Ghosh *et al.*, Mol. Biol. Cell. 2010. 21:2338-54; Enomoto *et al.*, Ann N Y Acad Sci, 2006. 1086:169-84; Weng *et al.*, Cancer Sci. 2010. 101:836-42), y la observación de que la presencia del extremo C-terminal de GIV puede distinguir los cánceres (de colon, mama y páncreas) altamente metastásicos de los poco metastásicos y de ese modo pronosticar la supervivencia entre pacientes con cáncer colorrectal (Garcia-Marcos *et al.*, Faseb J. 2011. 25:590-99), sigue sin determinarse si la expresión de GIV-fl puede usarse en combinación con otros indicadores para determinar qué pacientes con cáncer colorrectal de estadio II que tienen un mal pronóstico (por ejemplo, aquellos que son competentes para reparación de apareamiento erróneo (pMMR)), se beneficiarán de quimioterapia o bioterapia adyuvante.

La presente divulgación proporciona métodos para analizar o caracterizar un CRC pMMR de estadio II (tal como estadio IIa o estadio IIb), usando una muestra de CRC obtenida de un sujeto. En algunos ejemplos, los métodos distinguen un sujeto con CRC pMMR de estadio II (tal como uno que no ha recibido previamente quimioterapia) que es probable que responda a tratamiento con quimioterapia o bioterapia de un sujeto (tal como uno que no ha recibido previamente quimioterapia) con CRC pMMR de estadio II que no es probable que responda a tratamiento con quimioterapia o bioterapia. Los métodos dados a conocer también pueden usarse para predecir la supervivencia libre de progresión (SLP) probable del sujeto, por ejemplo prediciendo si el sujeto tendrá una SLP de al menos 1 año, al menos 2 años, al menos 3 años, al menos 4 años, al menos 5 años, al menos 6 años o al menos 7 años sin progresión o recidiva del cáncer.

El método incluye poner en contacto una muestra de CRC de estadio II (por ejemplo, que es T3 o T3/4) con un agente de unión específica que es específico para GIV-fl. Un agente de unión específica de este tipo, tal como un anticuerpo, puede unirse específicamente a GIV-fl, pero no a truncamientos C-terminales de GIV (GIV $\Delta$ CT, tales como proteínas GIV a las que les faltan los 762 ó 763 aminoácidos C-terminales). Esto permite la determinación de la presencia de GIV-fl en la muestra. En algunos ejemplos, se usa un dispositivo de tinción de tejido automatizado para la aplicación de los anticuerpos primarios frente a GIV-fl (y anticuerpos adicionales u otros reactivos de IHC).

La expresión de la proteína GIV-fl se puntúa, por ejemplo detectando su tinción en la muestra, para determinar el estado de GIV-fl (por ejemplo, positivo o negativo) de la muestra. En un ejemplo, puntuar la expresión de la proteína GIV-fl incluye examinar la muestra y caracterizar o determinar el porcentaje de tinción global de GIV-fl y la intensidad de tinción de GIV-fl predominante. En algunos ejemplos, puntuar la expresión de proteína GIV-fl incluye la inspección visual de la tinción de GIV-fl, por ejemplo usando microscopía óptica. En algunos ejemplos, puntuar la expresión de GIV-fl incluye una inspección visual del área total de la muestra, por ejemplo que está presente en un portaobjetos de microscopio. En algunos ejemplos, puntuar la expresión de GIV-fl incluye una inspección del área total de la muestra, por ejemplo usando un dispositivo de obtención de imágenes de portaobjetos. Puntuar la expresión de GIV-fl puede incluir la detección directa o indirecta de la unión del agente de unión específica a la proteína GIV-fl a la muestra.

En algunos ejemplos, se procesa y/o se obtienen imágenes de un portaobjetos de microscopio usando un dispositivo de exploración de portaobjetos. Se conocen dispositivos de exploración de portaobjetos en la técnica, y pueden incluir los datos a conocer en las patentes estadounidenses n.ºs 8.625.930; 8.609.023 y 8.290.236, así como los disponibles de VMSI. En algunos ejemplos, se usa el análisis de imágenes para evaluar o distinguir patrones de tinción, tales como expresión de GIV-fl. Por ejemplo, puede usarse puntuación automatizada de la expresión de GIV-fl usando imágenes digitales de los portaobjetos y análisis de imágenes basado en ordenador, tales como los datos a conocer en las patentes estadounidenses n.ºs 8.625.930; 8.537.181; 8.515.683; y 8.428.887; así como los disponibles de VMSI.

En un ejemplo, el método de puntuar la expresión de GIV-fl incluye determinar un grado de tinción de GIV-fl positiva para la muestra en una escala de 0 a 3, en el que al grado de tinción positiva se le asigna 0 si del 0% al 10% del área total de la muestra se tiñe de manera positiva, en el que al grado de tinción positiva se le asigna 1 si el 11%-35% del área total de la muestra se tiñe de manera positiva, en el que al grado de tinción positiva se le asigna 2 si el 36%-50% del área total de la muestra se tiñe de manera positiva, y en el que al grado de tinción positiva se le asigna 3 si el 51%-100% del área total de la muestra se tiñe de manera positiva. Además, se determina una intensidad de

tinción de GIV-fl para la muestra en una escala de 0 (negativa), 1 (débil), 2 (moderada) a 3 (fuerte). Por ejemplo, una muestra puede puntuarse como negativa (0) si hay una ausencia de cualquier señal detectable o señal de color tostado/gris pálido que es similar a la intensidad en el reactivo de control negativo; una muestra puede puntuarse como débil (1) si hay intensidad de tinción clara (por ejemplo, de color marrón claro) que es más que la observada en el reactivo de control negativo y en el fondo; una muestra puede puntuarse como moderada (2) si hay intensidad de tinción moderada (por ejemplo, marrón); o una muestra puede puntuarse como intensidad fuerte (3) si hay intensidad de tinción oscura (por ejemplo, intensidad de señal de marrón a negra). El color detectado dependerá del sistema de detección usado. En algunos ejemplos, se introducen el grado de tinción de GIV-fl positiva y la intensidad de tinción de GIV-fl se introducen en un ordenador o algoritmo. Se suman el grado de tinción de GIV-fl positiva y la intensidad de tinción de GIV-fl, generando así un valor de puntuación de GIV-fl de desde 0 hasta 6. Basándose en este valor de desde 0 hasta 6, se determina que la muestra es negativa para GIV-fl si el valor de puntuación de GIV-fl es de 0-2 o que la muestra es positiva para GIV-fl si el valor de puntuación de GIV-fl es de 3-6. En algunos ejemplos, el valor de puntuación de GIV-fl y/o el estado de GIV-fl de la muestra (por ejemplo, positivo o negativo) se emiten mediante un ordenador o algoritmo, por ejemplo en una salida visual o audible. En algunos ejemplos, el valor de puntuación de GIV-fl y/o el estado de GIV-fl de la muestra (por ejemplo, positivo o negativo) se introducen en un algoritmo.

En otro ejemplo, denominado puntuación predictiva de GIV-fl, puntuar la expresión de proteína GIV-fl para la muestra incluye determinar si el área total de tinción de GIV-fl con cualquier intensidad para la muestra es mayor del 10% y/o determinar si la intensidad de tinción de GIV-fl es fuerte (3+) para cualquier porcentaje positivo. Por ejemplo, una muestra puede puntuarse como negativa (0) si hay una ausencia de cualquier señal detectable o señal de color tostado/gris pálido que es similar a la intensidad en el reactivo de control negativo; una muestra puede puntuarse como débil (1+) si hay intensidad de tinción clara (por ejemplo, de color marrón claro) que es más que la observada en el reactivo de control negativo y en el fondo; una muestra puede puntuarse como moderada (2+) si hay intensidad de tinción moderada (por ejemplo, marrón); o una muestra puede puntuarse como intensidad fuerte (3+) si hay intensidad de tinción oscura (por ejemplo, intensidad de señal de marrón a negra). El color detectado dependerá del sistema de detección usado. Basándose en esta información, se asigna la muestra como positiva para GIV-fl si el área total de tinción de GIV-fl para la muestra es mayor del 10% con cualquier intensidad o si la intensidad de tinción de GIV-fl es fuerte (3+) con cualquier porcentaje positivo; o se asigna la muestra como negativa para GIV-fl si el área total de tinción de GIV-fl con una intensidad de tinción de 0, 1+ o 2+ para la muestra es menor del 10%. En algunos ejemplos, el estado de GIV-fl de la muestra (por ejemplo, positivo o negativo) se emite mediante un ordenador o algoritmo, por ejemplo en una salida visual o audible. En algunos ejemplos, el valor de estado de GIV-fl de la muestra (por ejemplo, positivo o negativo) se introduce en un algoritmo.

En otro ejemplo, se evalúa la expresión de GIV-fl cuantificando el ARNm de GIV-fl. El método incluye aislar ARN a partir de la muestra tumoral y detectar cuantitativamente el ARNm de GIV-fl usando una sonda nucleotídica específica, por ejemplo, mediante reacción en cadena de la polimerasa de transcripción inversa cuantitativa (qRT-PCR). En algunos ejemplos, se determina la cantidad relativa del ARNm de GIV-fl comparando la cantidad absoluta del ARNm de GIV-fl con la de un gen de mantenimiento. En aún otros ejemplos, se compara la cantidad relativa del ARNm de GIV-fl en una muestra tumoral con la cantidad relativa del ARNm de GIV-fl en un control, por ejemplo, muestra no tumoral. La muestra tumoral se asigna como positiva para GIV-fl si la cantidad relativa del ARNm de GIV-fl es sustancialmente superior a la cantidad relativa del ARNm de GIV-fl en una muestra de control.

El método también incluye determinar el estado de invasión linfovascular (LVI) del sujeto (por ejemplo, positivo o negativo), por ejemplo examinando la muestra para determinar si había invasión del CRC en vasos sanguíneos o vasos linfáticos. Una determinación de este tipo puede realizarse usando un método rutinario, tal como microscopía de una muestra teñida con H&E o anticuerpos, tales como un anticuerpo específico para el endotelio linfático (por ejemplo, Ac D2-40) o un anticuerpo frente a CD34.

El método puede incluir opcionalmente determinar una o más características del sujeto. En algunos ejemplos, las una o más características del sujeto se emiten mediante un ordenador o algoritmo, por ejemplo en una salida visual o audible. En algunos ejemplos, las una o más características del sujeto se introducen en un algoritmo. Las características a modo de ejemplo incluyen, pero no se limitan a, la edad del sujeto en el diagnóstico, número de ganglios linfáticos que son positivos para CRC, sexo del sujeto (hombre o mujer), estado de diferenciación tumoral (por ejemplo, moderada, mala o buena), estadio T del CRC (por ejemplo, T1, T2, T3, T4 o T3/4, que refleja el tamaño y/o grado del tumor primario), y en qué lado estaba presente el cáncer de colon (por ejemplo, derecho o izquierdo). Otras características a modo de ejemplo del sujeto que pueden determinarse e introducirse incluyen, pero no se limitan a: el grado tumoral, LVI, número de ganglios linfáticos examinados, si hay invasión perineural, si hay perforación localizada y si los márgenes son indeterminados o positivos.

El método puede incluir introducir el estado de GIV-fl, estado de LVI y opcionalmente una o más de las características del sujeto en un ordenador o algoritmo, y después generar una salida a partir del ordenador o algoritmo, analizando o caracterizando así la muestra. Por ejemplo, la salida puede ser una indicación en cuanto a si el CRC analizado es uno de riesgo alto (probable que presente recidiva o progresión) o si el CRC analizado es uno de riesgo bajo (no es probable que presente recidiva o progresión). Por ejemplo, la salida puede ser un "riesgo alto", "riesgo bajo" visual o audible o proporcionar una indicación de que debe o no debe administrarse quimioterapia o

bioterapia al sujeto.

En algunos ejemplos, el método incluye seleccionar a un sujeto para tratamiento con quimioterapia o bioterapia si se identifica al sujeto como un sujeto (por ejemplo, sujeto que no ha recibido previamente quimioterapia) que es probable que responda a tratamiento con quimioterapia o bioterapia. En algunos ejemplos, a tales sujetos se les debe administrar una cantidad terapéuticamente eficaz de una o más quimioterapias o bioterapias apropiadas, tales como 5-fluouracilo, leucovorina, panitumumab (Vectibix®), cetuximab (Erbix®), bevacizumab (Avastin®), ziv-aflibercept (Zaltrap®), irinotecán (Camptosar®), oxaliplatino (Eloxatin®) o combinaciones de los mismos. En cambio, si se identifica al sujeto como un sujeto (por ejemplo, sujeto que no ha recibido previamente quimioterapia) que no es probable que responda a tratamiento con quimioterapia o bioterapia, a tales sujetos no se les debe administrar quimioterapia o bioterapia, sino que pueden asignarse para una monitorización estrecha.

Las muestras analizadas usando los métodos dados a conocer son rutinarias, y pueden incluir una biopsia tisular (tal como una sección tisular) o aspirado de aguja fina. En algunos ejemplos, la muestra es una muestra fijada, tal como una muestra fijada en formalina, incrustada en parafina (FFPE).

Una o más etapas de los métodos dados a conocer pueden realizarse mediante un ordenador programado de manera adecuada.

También se proporciona un método implementado por ordenador. Un método de este tipo puede incluir generar una puntuación de expresión de proteína GIV-fl basándose al menos en la expresión de proteína GIV-fl medida dentro de una imagen visualizada que representa una muestra de pMMR de estadio II marcada de manera detectable con un anticuerpo frente a GIV-fl, en el que la muestra de CRC se ha obtenido de un sujeto. La puntuación de expresión de proteína GIV-fl puede generarse mediante (i) determinar un grado de tinción de GIV-fl positiva para la muestra en una escala de 0 a 3, en el que al grado de tinción positiva se le asigna 0 si del 0% al 10% del área total de la muestra se tiñe de manera positiva, en el que al grado de tinción positiva se le asigna 1 si el 11%-35% del área total de la muestra se tiñe de manera positiva, en el que al grado de tinción positiva se le asigna 2 si el 36%-50% del área total de la muestra se tiñe de manera positiva, y en el que al grado de tinción positiva se le asigna 3 si el 51%-100% del área total de la muestra se tiñe de manera positiva; una intensidad de tinción de GIV-fl para la muestra en una escala de 0 (negativa), 1 (débil), 2 (moderada) a 3 (fuerte) tal como se describió anteriormente, sumar el grado de tinción de GIV-fl positiva y la intensidad de tinción de GIV-fl, generando así un valor de puntuación de GIV-fl de desde 0 hasta 6, y determinar que la muestra es negativa para GIV si el valor de puntuación de GIV-fl es de 0-2 o determinar que la muestra es positiva para GIV si el valor de puntuación de GIV-fl es de 3-6; o (ii) determinar si un área total de tinción de GIV-fl con cualquier intensidad para la muestra es mayor del 10% o determinar si la intensidad de tinción de GIV-fl es fuerte (3+) usando los métodos de puntuación descritos anteriormente; y determinar que la muestra es positiva para GIV si el área total de tinción de GIV-fl para la muestra con cualquier intensidad es mayor del 10% o si la intensidad de tinción de GIV-fl es fuerte (3+) para cualquier porcentaje positivo; o determinar que la muestra es negativa para GIV si el área total de tinción de GIV-fl para la muestra con una intensidad de tinción de 0, 1+ o 2+ es menor del 10%. La puntuación de expresión de proteína GIV-fl resultante para la muestra puede emitirse mediante el ordenador, por ejemplo para un usuario o para un algoritmo.

El método implementado por ordenador puede incluir además introducir el estado de invasión linfovascular (LVI) del sujeto y opcionalmente introducir una o más características del sujeto, en el que las una o más características incluyen edad del sujeto en el diagnóstico, número de ganglios linfáticos que son positivos para CRC, sexo del sujeto, estado de diferenciación tumoral, estadio T del cáncer; y en qué lado estaba presente el cáncer de colon (otras características a modo de ejemplo del sujeto que pueden introducirse incluyen, pero no se limitan a: el grado tumoral, LVI, número de ganglios linfáticos examinados, si hay invasión perineural, si hay perforación localizada y si los márgenes son indeterminados o positivos), y emitir un pronóstico o diagnóstico para el sujeto. Por ejemplo, la salida puede ser una indicación en cuanto a si el CRC es de riesgo alto o riesgo bajo, y por tanto el paciente debe o no debe recibir quimioterapia/bioterapia, respectivamente.

También se dan a conocer uno o más medios legibles por ordenador no transitorios que incluyen instrucciones ejecutables por ordenador que hacen que un sistema informático realice los métodos proporcionados en el presente documento.

También se describen sistemas para analizar una muestra de cáncer colorrectal (CRC) competente para reparación de apareamiento erróneo (pMMR) de estadio II (tal como estadio IIa o IIb) obtenida de un sujeto. Tales sistemas pueden incluir unos medios para medir un nivel de GIV-fl en la muestra (tal como un anticuerpo específico para GIV-fl); y medios para determinar el estado de LVI del sujeto (tal como H&E o anticuerpos específicos para marcadores de LVI tales como CD34 y/o endotelio linfático). En algunos ejemplos, tales medios incluyen un microscopio óptico, dispositivo de tinción de portaobjetos o tejido automatizado, ordenador o combinaciones de los mismos. En algunos ejemplos, el sistema incluye reglas implementadas para determinar el estado de GIV-fl de la muestra (por ejemplo, positivo o negativo) basándose en el nivel medido de GIV-fl. En el presente documento se comentan métodos de puntuar la expresión de GIV-fl. En algunos ejemplos, el sistema incluye reglas implementadas para comparar el nivel medido de GIV-fl con un valor de referencia de GIV-fl, tal como un control positivo o negativo para GIV-fl. En algunos ejemplos, el sistema incluye reglas implementadas para determinar el estado de LVI de la muestra (por ejemplo,

positivo o negativo), por ejemplo basándose en el nivel medido de marcadores de LVI u otros marcadores histológicos o estructurales (por ejemplo, tinción de H&E). En algunos ejemplos, el sistema incluye reglas implementadas para comparar los marcadores de LVI medidos con un valor de referencia de LVI o muestra, tal como un control positivo o negativo para LVI. En algunos ejemplos, los valores de referencia de GIV-fl y/o LVI son valores almacenados o imágenes digitales almacenadas. En algunos ejemplos, los valores de referencia de GIV-fl y/o LVI son un nivel de GIV-fl y/o LVI medido a partir de una muestra de control mediante dichos medios para medir. El sistema también puede incluir uno o más medios para implementar las reglas (tal como un ordenador o algoritmo), mediante lo cual se proporciona una indicación del riesgo probable de recidiva de CRC y/o respuesta probable del CRC a quimioterapia o bioterapia basándose en el estado de GIV-fl y de LVI. En algunos ejemplos, el sistema también incluye unos medios para determinar una o más características del sujeto (o medios para introducir tales características en un algoritmo, tales como un teclado o programa informático), en el que las una o más características incluyen edad del sujeto en el diagnóstico, número de ganglios linfáticos que son positivos para CRC; sexo del sujeto, estado de diferenciación tumoral, estadio T del cáncer; y en qué lado estaba presente el cáncer de colon; y reglas implementadas para comparar el nivel medido de una o más características con un valor de referencia para las una o más características.

La invención también proporciona kits que pueden usarse con los métodos proporcionados en el presente documento. En un ejemplo, el kit incluye un agente de unión específica a GIV-fl, tal como clon de anticuerpo SP173. El kit incluye: un agente de unión específica que permite una determinación de LVI que comprende un anticuerpo específico para CD34 o endotelio linfático; un agente de unión específica a proteína de reparación de apareamiento erróneo que comprende un anticuerpo específico para homólogo de mutL 1 (MLH1); segregación posmeiótica aumentada 2 (PMS2); homólogo de proteína MutS 2 (MSH2), homólogo de proteína MutS 6 MSH6, o una combinación de tales anticuerpos; opcionalmente anticuerpos específicos para otros marcadores tumorales, tales como EGFR, Bax, Bcl, p53 y similares; y opcionalmente portaobjetos de microscopio (tales como portaobjetos de vidrio y cubreobjetos); anticuerpos secundarios marcados (tales como los que incluyen una etiqueta detectable y permiten la detección de anticuerpos primarios en el kit); y tampones para IHC (tales como tampón CC1 de VMSI). En otra realización, el kit contiene reactivos para medir la expresión de ARNm de GIV-fl. En esta realización, el kit contiene una sonda de ácido nucleico que puede hibridarse específicamente con la secuencia de ARNm de GIV-fl. El kit también puede contener reactivos para PCR de transcripción inversa (RT-PCR), incluyendo uno o más de los cebadores oligonucleotídicos específicos para el ARNm de GIV-fl, cebadores oligonucleotídicos y una o más sondas específicas para el gen de control, por ejemplo, un gen de "mantenimiento", nucleósido trifosfatos, una o más ADN polimerasas para proporcionar actividades de transcripción inversa y replicación de ADN y tampones y cofactores para soportar la actividad de las una o más ADN polimerasas.

### Métodos de analizar muestras de cáncer colorrectal pMMR de estadio II

En el presente documento se dan a conocer métodos para analizar muestras de cáncer colorrectal (CRC) competentes para reparación de apareamiento erróneo (pMMR) de estadio II (tal como IIa y IIb, también denominados T3 y T4, respectivamente) obtenidas de un sujeto. Un CRC de estadio IIa se caracteriza generalmente como tumor que invade a través de la capa muscular en la subserosa, o en tejidos perirrectales o pericolónicos no peritonealizados, mientras que un CRC de estadio IIb es cuando el tumor invade directamente otros órganos o estructuras, y/o perfora el peritoneo visceral. En cambio, el estadio IIc es cuando el CRC se ha propagado a través de la serosa de la pared del colon pero no se ha propagado a órganos cercanos. En algunos ejemplos, tales métodos se usan para pronosticar un desenlace bueno o malo para el sujeto del que se obtuvo la muestra. Por ejemplo, los métodos pueden determinar si es probable que el CRC presente progresión al menos 1, 2, 3, 4, 5, 6 o incluso 7 años tras el diagnóstico original. Por ejemplo, si el método predice que el CRC presentará progresión (por ejemplo, es probable que presente recidiva o metastatice tras la cirugía) esto indica que el CRC es de riesgo alto y el sujeto debe recibir quimioterapia o bioterapia. En cambio, si el método predice que el CRC no presentará progresión (por ejemplo, no es probable que presente recidiva o metastatice tras la cirugía) esto indica que el CRC es de riesgo bajo y el sujeto no debe recibir quimioterapia o bioterapia (ya que probablemente no obtendrá ningún beneficio). Por tanto, el método puede usarse como factor de predicción químico, para identificar a sujetos con CRC pMMR de estadio II que es probable que se beneficien de recibir quimioterapia o bioterapia.

Los métodos pueden incluir determinar si el CRC pMMR de estadio II (tal como IIa o IIb) es positivo o negativo para la expresión de proteína GIV-fl. Por ejemplo, el método puede incluir puntuar la expresión de proteína GIV-fl. Los tumores de CRC pMMR que son positivos para GIV-fl tienen generalmente un pronóstico peor que aquellos que son negativos para GIV-fl (por ejemplo, es más probable que el cáncer presente progresión dentro del plazo de 1, 2, 3, 4, 5, 6 o incluso 7 años que un sujeto con un CRC negativo para GIV-fl), ya que los CRC positivos para GIV-fl son más invasivos. Es decir, GIV-fl es un factor de pronóstico adverso. Sin embargo, no todos los CRC positivos para GIV-fl responderán a quimioterapia o bioterapia. Por tanto, los inventores identificaron variables clínicas adicionales que pueden identificar aquellos cánceres de CRC positivos para GIV-fl pMMR de estadio II que probablemente responderán a quimioterapia o bioterapia. Tales métodos pueden usarse para identificar a un sujeto como que tiene un CRC pMMR de estadio II que se predice que responderá a tratamiento con quimioterapia o bioterapia. En algunos ejemplos, tales sujetos se han tratado anteriormente con un agente quimioterápico o bioterápico para su CRC. En otros ejemplos, tales sujetos no se han tratado anteriormente con un agente quimioterápico o bioterápico para su CRC (no han recibido previamente quimioterapia).

Los métodos dados a conocer incluyen detectar o medir la expresión de GIV-fl, para proporcionar o determinar un estado de GIV-fl de la muestra. Tal estado puede incluir uno o más de una puntuación de proteína GIV-fl (tal como 0, 1, 2, 3, 4, 5 ó 6), positivo para GIV-fl o negativo para GIV-fl. Tales métodos pueden incluir poner en contacto una muestra que contiene células de CRC (tal como una muestra obtenida de un sujeto) con un agente de unión específica a proteína GIV-fl. Los ejemplos de agentes de unión específica a proteína GIV-fl incluyen anticuerpos, tales como anticuerpos monoclonales (por ejemplo, clon de anticuerpo monoclonal de conejo SP173, véase el ejemplo 1), anticuerpos policlonales, anticuerpos quiméricos y fragmentos de los mismos, así como aptámeros, que se unen a GIV-fl, pero no a GIV $\Delta$ CT, con alta especificidad. Los agentes de unión específica a proteína GIV-fl pueden incubarse con la muestra en condiciones que permiten que los agentes de unión específica a proteína GIV-fl se unan a proteínas GIV-fl en la muestra. En un ejemplo, se detecta o se mide la expresión de proteína GIV-fl en la muestra de CTC y después, basándose en estas mediciones, se determina una puntuación de expresión de proteína GIV-fl para la muestra. Basándose en esta puntuación, se determina si la muestra es positiva o negativa para GIV-fl.

En un ejemplo, la puntuación de GIV-fl para la muestra de CRC se determina de la siguiente manera. El grado de tinción de GIV-fl positiva para la muestra se puntúa en una escala de 0 a 3, en la que al grado de tinción positiva se le asigna 0 si del 0% al 10% del área total de la muestra presenta tinción positiva para GIV-fl, en el que al grado de tinción positiva se le asigna 1 si el 11%-35% del área total de la muestra presenta tinción positiva para GIV-fl, en el que al grado de tinción positiva se le asigna 2 si el 36%-50% del área total de la muestra presenta tinción positiva para GIV-fl, y en el que al grado de tinción positiva se le asigna 3 si el 51%-100% del área total de la muestra presenta tinción positiva para GIV-fl. Además, se determina o se calcula una intensidad de tinción de GIV-fl para la muestra en una escala de 0 (negativa), 1 (débil), 2 (moderada) a 3 (fuerte) usando los métodos descritos anteriormente. En algunos ejemplos, el valor para cada uno del grado de tinción de GIV-fl positiva y la intensidad de tinción de GIV-fl se introducen en un ordenador o algoritmo. Se suman el valor para cada uno del grado de tinción de GIV-fl positiva y la intensidad de tinción de GIV-fl, generando así un valor de puntuación de GIV-fl de desde 0 hasta 6. Basándose en este valor de desde 0 hasta 6, se determina que la muestra es negativa para GIV-fl si el valor de puntuación de GIV-fl es de 0-2 o que la muestra es positiva para GIV-fl si el valor de puntuación de GIV-fl es de 3-6.

En otro ejemplo la puntuación de GIV-fl para la muestra de CRC se determina de la siguiente manera. Se analiza la muestra para determinar si el área total de tinción de GIV-fl para la muestra es mayor del 10% y/o para determinar si la intensidad de tinción de GIV-fl es fuerte (3+) usando los métodos descritos anteriormente. Basándose en esta información, la muestra se asigna como positiva para GIV-fl si el área total de tinción de GIV-fl con cualquier intensidad de tinción para la muestra es mayor del 10% o si la intensidad de tinción de GIV-fl es fuerte (3+) para cualquier porcentaje; o la muestra se asigna como negativa para GIV-fl si el área total de tinción de GIV-fl para la muestra con una intensidad de tinción de 0, 1+ o 2+ es menor del 10%.

Los métodos de usar anticuerpos y otros agentes de unión específica a proteínas para detectar una proteína diana en una muestra son rutinarios, y la divulgación no se limita a métodos particulares. En algunos ejemplos, se usa IHC, por ejemplo en combinación con microscopía óptica. Por ejemplo, la expresión de proteína GIV-fl en la muestra puede detectarse directa o indirectamente mediante unión del agente de unión específica a proteína GIV-fl a la muestra. En algunos ejemplos, la puesta en contacto de la muestra con el agente de unión específica a proteína GIV-fl y la detección de la expresión de proteína GIV-fl en la muestra se realizan con un dispositivo de tinción de tejido automatizado. En algunos ejemplos, detectar la expresión de proteína GIV-fl usa una inspección visual, por ejemplo usando microscopía óptica.

Los métodos de detectar la expresión de ARNm usando ARNm aislado a partir de una muestra también son rutinarios. Los métodos incluyen PCR de transcripción inversa cuantitativa (RT-PCR), por ejemplo con sondas TaqMan®, o sistemas libres de PCR tales como el ensayo Invader® (Third Wave Technologies), hibridación a sondas inmovilizadas, por ejemplo, como parte de una micromatriz, o cualquier otro método de cuantificar ARNm que está o llegue a estar disponible.

El método también se basa en conocer el estado de invasión linfovascular (LVI) del sujeto (por ejemplo, positivo o negativo). Los métodos de determinar el LVI son rutinarios, tales como usando microscopía. Por ejemplo, puede analizarse la muestra de CRC para determinar si había invasión del CRC en vasos sanguíneos o vasos linfáticos, por ejemplo usando microscopía. El estado de LVI puede usarse en combinación con el estado de GIV-fl para determinar si es probable o no es probable que un CRC pMMR de estadio II responda a quimioterapia o bioterapia.

El método puede incluir opcionalmente determinar una o más características del sujeto. En algunos ejemplos, las una o más características del sujeto se emiten mediante un ordenador o algoritmo, por ejemplo en una salida visual o audible. En algunos ejemplos, las una o más características del sujeto se introducen en un algoritmo. Las características a modo de ejemplo incluyen, pero no se limitan a, la edad del sujeto en el diagnóstico, número de ganglios linfáticos que son positivos para CRC, sexo del sujeto (hombre o mujer), estado de diferenciación tumoral (por ejemplo, moderada, mala o buena), estadio T del CRC (por ejemplo, T1, T2, T3, T4 o T3/4, que refleja el tamaño y/o grado del tumor primario), y en qué lado estaba presente el cáncer de colon (por ejemplo, derecho o izquierdo). El estado de GIV-fl, en combinación con una o más características del sujeto, y en algunos ejemplos también en combinación con el estado de LVI, pueden usarse para determinar si es probable o no es probable que

un CRC pMMR de estadio II responda a quimioterapia o bioterapia.

En algunos ejemplos, los métodos dados a conocer son métodos de identificar a un sujeto como que tiene un CRC pMMR de estadio II que es probable o se predice que responderá a tratamiento de quimioterapia o bioterapia. Por ejemplo, el método puede incluir determinar que el sujeto se beneficiará del tratamiento con quimioterapia o bioterapia si la muestra tumoral obtenida del sujeto es positiva para GIV-fl y el paciente es positivo para LVI. Tales sujetos identificados pueden seleccionarse para tratamiento con quimioterapia. Además, el método puede ir seguido por administrar a tales sujetos identificados y seleccionados una cantidad terapéuticamente eficaz de quimioterapia o bioterapia. En cambio, el método puede incluir determinar que el sujeto no se beneficiará del tratamiento con quimioterapia si la muestra tumoral obtenida del sujeto es negativa para GIV-fl y el paciente es negativo para LVI.

En algunos ejemplos se compara la expresión de proteína GIV-fl en la muestra de prueba con un control, tal como un control positivo y/o negativo. Por tanto, en algunos ejemplos el método incluye detectar o medir la expresión de proteína GIV-fl en una o más muestras de control. Por ejemplo, los hepatocitos en una muestra de hígado no expresan GIV-fl de manera endógena, y por tanto deben presentar una puntuación de 0 para la intensidad de tinción o menos del 10% para el área total teñida para la expresión de proteína GIV-fl. En cambio, las células COS-7 expresan GIV-fl y por tanto deben presentar una puntuación de 2 ó 3 para la intensidad de tinción o más del 50% para el área total teñida para la expresión de proteína GIV-fl.

Una o más etapas de los métodos dados a conocer pueden realizarse mediante un sistema u ordenador programado de manera adecuada. Por ejemplo, la expresión de proteína GIV-fl puede detectarse y puntuarse usando un sistema de análisis de obtención de imágenes o un ordenador. En algunos ejemplos, el sistema u ordenador proporciona una salida de la puntuación de proteína GIV-fl o valor usado para calcular la puntuación, tal como una puntuación de 0, 1, 2 ó 3 para el grado de tinción de GIV-fl positiva; una puntuación de 0, 1, 2 ó 3 para la intensidad de tinción de GIV-fl; una puntuación de tinción de GIV-fl de 0, 1, 2, 3, 4, 5 ó 6, o si la muestra es positiva o negativa para GIV-fl. Además, el estado de LVI puede detectarse usando un sistema de análisis de obtención de imágenes o un ordenador. En algunos ejemplos, el sistema u ordenador proporciona una salida del estado de LVI, tal como positivo o negativo para LVI. En algunos ejemplos el sistema u ordenador proporciona una salida de si es probable que el CRC presente progresión (por ejemplo, recidiva) y/o responda a quimioterapia o bioterapia. En algunos ejemplos la salida es visual o de audio, tal como una impresión. En algunos ejemplos, la salida se almacena, por ejemplo, en un medio legible por ordenador.

Por tanto, en el presente documento se proporciona un método implementado por ordenador para determinar si un CRC pMMR de estadio II es de riesgo alto o bajo, y por tanto si es probable que el CRC responda a quimioterapia o bioterapia. Tal método puede incluir generar una puntuación de expresión de GIV-fl basándose al menos en la expresión de proteína GIV-fl medida dentro de una imagen visualizada que representa una muestra de CRC marcada de manera detectable con anticuerpos frente a GIV-fl, en el que la muestra de CRC se obtiene de un sujeto. La puntuación de expresión de proteína GIV-fl puede generarse detectando la expresión de proteína GIV-fl en las células de CRC. En el presente documento se proporcionan métodos de generar una puntuación de expresión de proteína GIV-fl. La puntuación de expresión de proteína GIV-fl resultante para la muestra puede emitirse mediante el ordenador, por ejemplo a un usuario o a un algoritmo. El método implementado por ordenador puede incluir además introducir el estado de LVI (por ejemplo, positivo o negativo) del sujeto. Alternativamente, el estado de LVI puede determinarse basándose al menos en una imagen de histología visualizada que representa una muestra de CRC (tal como una teñida con H&E o con anticuerpo D2-40, un marcador del endotelio linfático, o con un anticuerpo frente a CD34). El método implementado por ordenador puede introducir opcionalmente una o más características del sujeto, en el que las una o más características incluyen edad del sujeto en el diagnóstico, número de ganglios linfáticos que son positivos para CRC, sexo del sujeto, estado de diferenciación tumoral, estadio T del cáncer; y en qué lado estaba presente el cáncer de colon, y emitir un pronóstico o diagnóstico para el sujeto. Por ejemplo, la salida puede ser una indicación de si el CRC es de riesgo alto o riesgo bajo, y por tanto el paciente debe o no debe recibir quimioterapia o bioterapia, respectivamente.

También se describen uno o más medios legibles por ordenador no transitorios que incluyen instrucciones ejecutables por ordenador que hacen que un sistema informático realice un método de este tipo.

#### 55 A. Detección de GIV-FL

La muestra de CRC pMMR de estadio II obtenida de un sujeto se analiza para determinar si contiene GIV-fl, tal como niveles detectables de proteína GIV-fl en una o más células de CRC. Por tanto, la muestra puede analizarse para detectar o medir la presencia de proteína GIV-fl en la muestra, por ejemplo una medición cualitativa o semicuantitativa. En realizaciones particulares, los métodos dados a conocer usan una medición cualitativa de la presencia de proteína GIV-fl en células tumorales en la muestra. Basándose en la puntuación de GIV-fl, se determina que la muestra es positiva o negativa para GIV-fl.

En algunos ejemplos, GIV-fl tiene 1870 ó 1871 aminoácidos de longitud, tal como SEQ ID NO: 1 ó 2, respectivamente. En cambio, GIV $\Delta$ CT carece de los 762 ó 763 aminoácidos C-terminales (por ejemplo, los 762 ó 763 aminoácidos C-terminales de SEQ ID NO: 1 o SEQ ID NO: 2, respectivamente), lo cual incluye el dominio EF

activador de proteína G. El truncamiento se produce en el extremo del exón 19, y da como resultado una proteína que termina en Q1108 y contiene 3 aminoácidos adicionales en el extremo C-terminal (VVI), que resultan de la traducción de la secuencia del intrón 19. Por tanto, la secuencia C-terminal de la proteína GIV truncada es QTQNAKLQVVI. Los agentes de unión específica a GIV-fl detectan GIV-fl, pero no GIVΔCT.

5 Puede usarse IHC para detectar o medir la proteína GIV-fl presente en una muestra del sujeto. IHC puede determinar la presencia o distribución de un antígeno (tal como una proteína) en una muestra (tal como una muestra tumoral, por ejemplo, una porción o sección de tejido que incluye tejido o células de CRC que expresan GIV-fl) detectando la interacción del antígeno con un agente de unión específica, concretamente anticuerpo. Se incubaba una muestra que incluye un antígeno (tal como GIV-fl) con un anticuerpo específico para GIV-fl (tal como el Ac SP173 descrito en el ejemplo 1) en condiciones que permiten la unión anticuerpo-antígeno. La unión anticuerpo-antígeno puede detectarse por medio de una etiqueta detectable conjugada al anticuerpo (detección directa) o por medio de una etiqueta detectable conjugada a un anticuerpo secundario, que se produce contra el anticuerpo primario (por ejemplo, detección indirecta). En otros ejemplos de detección indirecta, la unión anticuerpo-antígeno se detecta por medio de una etiqueta detectable conjugada a un anticuerpo terciario que puede unirse a un anticuerpo secundario (por ejemplo, se produce contra el anticuerpo secundario o se produce contra una molécula conjugada al anticuerpo secundario, tal como un hapteno). Las etiquetas detectables a modo de ejemplo que pueden usarse para IHC incluyen, pero no se limitan a, isótopos radiactivos, fluorocromos (tal como fluoresceína, isotiocianato de fluoresceína, y rodamina), haptenos, enzimas (tales como peroxidasa del rábano o fosfatasa alcalina) y cromógenos (tales como 3,3'-diaminobencidina (DAB) o Fast Red). En algunos ejemplos, la detección de unión antígeno-anticuerpo también incluye la amplificación de señal (tal como amplificación de señal de tiramida o métodos relacionados). El método de amplificación de señal puede incluir métodos descritos en la publicación de patente estadounidense n.º 2012/0171668.

25 El agente de unión específica a GIV-fl es un anticuerpo, tal como un anticuerpo policlonal o monoclonal, o fragmento del mismo. Un agente de unión específica a GIV-fl de este tipo puede usarse en algunos ejemplos para distinguir entre GIV-fl y GIVΔCT. Por tanto, en algunos ejemplos el anticuerpo frente a GIV-fl no se une con alta afinidad a GIVΔCT (por ejemplo no produce una señal detectable si sólo está presente GIVΔCT). Si se desea, el anticuerpo frente a GIV-fl puede incluir una etiqueta detectable para permitir la detección y en algunos casos la cuantificación del complejo proteína GIV-fl/anticuerpo. En otros ejemplos, el anticuerpo frente a GIV-fl se detecta con un anticuerpo secundario marcado apropiado. En ejemplos adicionales, el anticuerpo frente a GIV-fl se detecta con un anticuerpo terciario marcado apropiado.

35 Se conocen anticuerpos que pueden usarse para detectar la expresión de GIV-fl y se proporcionan en el presente documento (tales como SP173). Un experto habitual en la técnica apreciará que pueden usarse otros anticuerpos en los métodos proporcionados en el presente documento, incluyendo aquellos ahora disponibles o que se desarrollen en el futuro. Por ejemplo, en la técnica se conocen bien métodos de preparar anticuerpos frente a una proteína diana específica. Una proteína GIV-fl o un fragmento o variante conservativa de la misma (tal como una región única del extremo C-terminal de GIV-fl, tal como una región dentro de los 700, 600, 500, 400, 300, 200, 100, 50 ó 20 aminoácidos C-terminales) puede usarse para producir anticuerpos que son inmunorreactivos o se unen específicamente a un epítipo de la proteína GIV-fl. Se incluyen anticuerpos policlonales, anticuerpos que consisten esencialmente en anticuerpos monoclonales combinados con diferentes especificidades epitópicas, así como preparaciones de anticuerpos monoclonales diferenciados. Los expertos en la técnica conocen bien la preparación de anticuerpos policlonales. Véase, por ejemplo, Green *et al.*, "Production of Polyclonal Antisera", en: *Immunochemical Protocols*, páginas 1-5, Manson, ed., Humana Press, 1992; Coligan *et al.*, "Production of Polyclonal Antisera in Rabbits, Rats, Mice and Hamsters", en: *Current Protocols in Immunology*, sección 2.4.1, 1992. La preparación de anticuerpos monoclonales también es convencional (véase, por ejemplo, Kohler & Milstein, *Nature* 256:495, 1975; Coligan *et al.*, secciones 2.5.1-2.6.7; y Harlow *et al.* en: *Antibodies: a Laboratory Manual*, página 726, Cold Spring Harbor Pub., 1988).

50 En algunos ejemplos, una muestra se ha obtenido de un sujeto (tal como una muestra tumoral que se sabe o se sospecha que expresa GIV-fl, tal como un CRC pMMR de estadio II) y se ha procesado para IHC. Por ejemplo, la muestra puede fijarse e incrustarse, por ejemplo con formalina y parafina. Después puede montarse la muestra en un soporte, tal como un portaobjetos de vidrio de microscopio. Por ejemplo, la muestra puede cortarse en una serie de secciones delgadas (por ejemplo, usando un microtomo) y montarse las secciones en un portaobjetos de microscopio. En algunos ejemplos, un único portaobjetos incluye múltiples secciones tisulares de la misma muestra de cáncer o secciones de la misma muestra de cáncer pueden colocarse en diferentes portaobjetos. Después pueden marcarse individualmente diferentes secciones de la muestra de cáncer (por ejemplo, CRC) con diferentes anticuerpos, por ejemplo un anticuerpo anti-GIV-fl y un anticuerpo de control negativo (por ejemplo, un anticuerpo que no se une específicamente a un antígeno endógeno en el CRC). Es decir, una sección puede marcarse con anticuerpo frente a GIV-fl y otra sección puede marcarse con un anticuerpo de control negativo (tal como un anticuerpo que se une a una diana que no se produce de manera endógena en la muestra). En algunos ejemplos, se tiñe un portaobjetos independiente del mismo sujeto con H&E (tal como una sección adyacente o en serie de la misma muestra tumoral). En algunos ejemplos, pueden detectarse proteínas de interés adicionales en las mismas muestras de tejido u otras adicionales marcando con anticuerpos adicionales (por ejemplo otros marcadores tumorales, tales como anticuerpos específicos para EGFR, Bax, proteínas de MMR (por ejemplo, MLH1; PMS2;

MSH2 y MSH6), pAKT, PTEN y mutantes de PI3K). En algunos ejemplos, puede usarse un portaobjetos automatizado o un dispositivo de tinción de tejido (tal como instrumentos de VENTANA BENCHMARK, por ejemplo instrumentos BenchMark XT o BenchMark GX) para teñir y procesar los portaobjetos.

- 5 En algunos ejemplos, detectar proteína GIV-fl en la muestra incluye la detección indirecta de unión del anticuerpo frente a GIV-fl a la muestra (por ejemplo, el anticuerpo (primario) frente a GIV-fl no está marcado de manera detectable). Por ejemplo, se pone la muestra en contacto con un anticuerpo frente a GIV-fl (tal como SP173) en condiciones suficientes para que el anticuerpo frente a GIV-fl se una a proteína GIV-fl en la muestra. Después se pone la muestra en contacto con un anticuerpo secundario que puede unirse específicamente al anticuerpo frente a GIV-fl (tal como un anticuerpo anti-conejo, si el anticuerpo frente a GIV-fl es un anticuerpo de conejo o un anticuerpo anti-ratón, si el anticuerpo frente a GIV-fl es un anticuerpo de ratón) en condiciones suficientes para que el anticuerpo secundario se una al anticuerpo frente a GIV-fl. El anticuerpo secundario puede estar marcado de manera detectable. La etiqueta detectable puede conjugarse al anticuerpo secundario. En algunos ejemplos, la etiqueta detectable conjugada al anticuerpo secundario puede detectarse directamente (tal como una etiqueta fluorescente, o una enzima, que puede producir un producto de reacción detectable en presencia de sustrato adecuado). En otros ejemplos, el anticuerpo secundario se conjuga a uno o más haptenos (tal como fluoresceína, dinitrofenilo, biotina o ácido 3-hidroxiquinolín-2-carboxílico (HQ)). Después se pone la muestra en contacto con un anticuerpo terciario que puede unirse específicamente al anticuerpo secundario conjugado a hapteno (por ejemplo, un anticuerpo anti-hapteno, tal como un anticuerpo anti-HQ) en condiciones suficientes para que el anticuerpo terciario se una al hapteno. En algunos ejemplos, el anticuerpo terciario se conjuga a una etiqueta detectable, tal como una enzima (por ejemplo, peroxidasa del rábano (HRP) o fosfatasa alcalina (AP)). Después se pone la muestra en contacto con uno o más reactivos que producen un producto de reacción detectable en presencia de la enzima. En algunos ejemplos, se pone la muestra en contacto con un sustrato de HRP (tal como peróxido de hidrógeno) y un cromógeno (tal como DAB) que produce un producto visualmente detectable en presencia de HRP.
- 10
- 15
- 20
- 25 En algunos ejemplos, la detección de proteína GIV-fl en la muestra se lleva a cabo usando el kit de detección VENTANA OptiView DAB IHC (Ventana Medical Systems, Inc., Tucson, AZ, n.º de catálogo 760-700) o el kit de detección VENTANA ultraView Universal DAB (Ventana Medical Systems, Inc., Tucson, AZ, n.º de catálogo 760-500).
- 30 En realizaciones particulares, detectar proteína GIV-fl en la muestra incluye la detección indirecta incluyendo amplificación de señal. En algunos ejemplos, la amplificación de señal permite la detección inequívoca de especímenes positivos para GIV-fl que pueden mostrar tan sólo tinción débil sin amplificación de señal. Un experto habitual en la técnica conoce métodos de amplificación de señal para IHC. En algunos ejemplos, la amplificación de señal incluye la deposición de indicador catalizada (CARD), también conocida como amplificación de señal de tiramida (TSA™). En una variación de este método un anticuerpo secundario conjugado a enzima (tal como un anticuerpo secundario conjugado a HRP) se une al anticuerpo primario. A continuación se usa un sustrato de tiramida biotinilada (tiramina es 4-(2-aminoetil)fenol), que supuestamente se convierte en un radical libre cuando interacciona con la enzima HRP. Después, el radical fenólico reacciona rápidamente con el material circundante, depositando o fijando así biotina en las inmediaciones. Se repite este procedimiento proporcionando más sustrato (tiramida biotinilada) y acumulando más biotina localizada. Finalmente, se detecta el depósito de biotina “amplificado” con estreptavidina unida a una molécula fluorescente. Alternativamente, el depósito de biotina amplificado puede detectarse con complejo de avidina-peroxidasa, que después se pone en contacto con DAB para producir un color marrón.
- 35
- 40
- 45 En otros ejemplos, la amplificación de señal incluye poner en contacto la muestra con peróxido de hidrógeno y un conjugado de tiramida-HQ tras poner en contacto la muestra con un anticuerpo terciario conjugado a HRP en condiciones suficientes para depositar HQ en o cerca del sitio del anticuerpo primario unido a la muestra. Después se pone la muestra en contacto con un anticuerpo conjugado a enzima (tal como un anticuerpo conjugado a HRP o AP) que se une específicamente a HQ. En algunos ejemplos, este anticuerpo conjugado a enzima es el mismo que el anticuerpo terciario conjugado a HRP. En otros ejemplos, el anticuerpo conjugado a enzima es un anticuerpo diferente del anticuerpo terciario conjugado a HRP. Después se pone la muestra en contacto con uno o más reactivos que producen un producto de reacción detectable en presencia de la enzima. En algunos ejemplos, se pone la muestra en contacto con un sustrato de HRP (tal como peróxido de hidrógeno) y un cromógeno (tal como DAB) que produce un producto visualmente detectable en presencia de HRP. En algunos ejemplos, la amplificación de señal se lleva a cabo usando el kit de amplificación VENTANA OptiView (Ventana Medical Systems, Inc., n.º de catálogo 760-099).
- 50
- 55

#### B. Puntuación de la expresión de GIV-fl

- 60 Para puntuar muestras para la expresión de GIV-fl, se usa una muestra de CRC con GIV-fl marcado de manera detectable (por ejemplo, uno o más portaobjetos que contienen secciones de la muestra de CRC, tal como 1, 2, 3, 4 ó 5 portaobjetos). La muestra puede marcarse con un anticuerpo (u otro agente de unión específica a proteína, tal como un aptámero) específico para GIV-fl y anticuerpos secundarios y/o terciarios marcados de manera apropiada, por ejemplo tal como se describió en la sección A, anteriormente.
- 65

Un experto habitual en la técnica puede identificar porciones de la muestra que son neoplásicas (por ejemplo,

células tumorales) y porciones de la muestra que son tejido o células normales, por ejemplo basándose en características morfológicas y/o histológicas. En algunos ejemplos, la muestra se tiñe con H&E (por ejemplo una sección tisular adyacente) para ayudar a identificar morfología tisular y celular.

5 La muestra marcada con anticuerpo anti-GIV-fl (o una imagen digital de la misma) puede inspeccionarse visualmente (por ejemplo, con o sin microscopía óptica), por ejemplo por un patólogo o mediante un ordenador. En algunos ejemplos, se inspecciona visualmente una muestra completa (tal como una sección tisular completa), por ejemplo usando microscopía óptica, por ejemplo a un aumento de aproximadamente 2x-20x. En algunos ejemplos, se usa el Sistema de Análisis de Imágenes de Ventana (VIAS) para cuantificar digitalmente la intensidad de tinción y el área total de tinción. Pueden captarse imágenes de alta resolución y obtenerse la densidad óptica (DO) del cromógeno asociado con GIV-fl con respecto a una zona clara en el mismo portaobjetos. Pueden analizarse tres o más zonas diferentes por espécimen. Puede registrarse la DO promedio como medida digital de la expresión de GIV-fl para ese espécimen.

15 Los métodos dados a conocer pueden usarse para determinar si la muestra de CRC es positiva o negativa para GIV-fl, por ejemplo determinando en primer lugar una puntuación de GIV-fl para la muestra. En un ejemplo, la puntuación de GIV-fl para la muestra de CRC se determina de la siguiente manera. Se puntúa el grado de tinción de GIV-fl positiva para la muestra en una escala de 0 a 3, en la que a la puntuación se le asigna 0 si del 0% al 10% del área total de la muestra presenta tinción positiva para GIV-fl (es decir, al grupo de % positivo se le puede asignar 0), a la puntuación se le asigna 1 si el 11%-35% del área total de la muestra presenta tinción positiva para GIV-fl (es decir, al grupo de % positivo se le puede asignar 1), a la puntuación se le asigna 2 si el 36%-50% del área total de la muestra presenta tinción positiva para GIV-fl (es decir, al grupo de % positivo se le puede asignar 2), y a la puntuación se le asigna 3 si el 51%-100% del área total de la muestra presenta tinción positiva para GIV-fl (es decir, al grupo de % positivo se le puede asignar 3). Además, se determina o calcula un valor o puntuación de intensidad de tinción de GIV-fl para la muestra en una escala de 0 a 3+ (fuerte). Un experto habitual en la técnica conoce métodos generales de determinar la intensidad de tinción (por ejemplo, métodos de IHC semicuantitativa). Por ejemplo, se usa una puntuación de 0 si no hay tinción por encima del fondo, se usa 1 ó 1+ para tinción de intensidad débil, se usa 2 ó 2+ para tinción de intensidad moderada, y se usa 3 ó 3+ para tinción de intensidad fuerte (por ejemplo tal como se comentó anteriormente). Por tanto, a un grupo de intensidad de tinción de GIV-fl se le puede asignar 0, 1, 2 ó 3. En algunos ejemplos, el valor determinado para cada uno del grado de tinción de GIV-fl positiva y la intensidad de tinción de GIV-fl se introduce en un ordenador o algoritmo. Se suman el grado de tinción de GIV-fl positiva y los valores o puntuaciones de intensidad de tinción de GIV-fl, generando así un valor de puntuación de GIV-fl de desde 0 hasta 6. Basándose en este valor de desde 0 hasta 6, si el valor de puntuación de GIV-fl es de 0-2 se determina que la muestra es negativa para GIV-fl y si el valor de puntuación de GIV-fl es de 3-6 se determina que la muestra es positiva para GIV-fl.

40 En otro ejemplo la puntuación de GIV-fl para la muestra de CRC se determina de la siguiente manera. Se analiza la muestra para determinar si el área total de tinción de GIV-fl para la muestra es mayor del 10% y/o para determinar si la intensidad de tinción de GIV-fl es fuerte (3+) para cualquier porcentaje de células positivas usando los métodos descritos anteriormente. Basándose en esta información, la muestra se asigna como positiva para GIV-fl si el área total de tinción de GIV-fl para la muestra con cualquier intensidad de tinción es mayor del 10% o si la intensidad de tinción de GIV-fl es fuerte (3+) para cualquier porcentaje; o la muestra se asigna como negativa para GIV-fl si el área total de tinción de GIV-fl con una intensidad de tinción de 0, 1+ o 2+ o la muestra es menor del 10%.

45 En algunos ejemplos, el método de puntuar también incluye comparar la muestra tumoral marcada con GIV-fl con uno o más controles marcados con el agente de unión específica a GIV-fl (por ejemplo, anticuerpo) (por ejemplo, controles sometidos a ensayo en la misma serie de IHC que la muestra de prueba). En algunos ejemplos, el control incluye un control positivo, tal como una muestra que incluye células que se sabe que son positivas para GIV-fl (por ejemplo células COS-7). En otros ejemplos, el control incluye un control negativo, tal como una muestra que incluye células que se sabe que son negativas para GIV-fl (por ejemplo hepatocitos). En algunos ejemplos, las muestras de control positivo y/o negativo son controles a nivel de sistema para garantizar el funcionamiento apropiado de reactivos de ensayo e instrumentos. En un ejemplo, los controles incluyen tanto un control positivo como uno negativo.

55 En otros ejemplos, el control negativo incluye una muestra de CRC pMMR de estadio II (tal como estadio IIa o estadio IIb) teñida con un anticuerpo de control negativo. En algunos ejemplos, el anticuerpo de control negativo es un anticuerpo que se une específicamente a un antígeno diana que no está presente de manera endógena en la muestra de CRC. En algunos ejemplos, el anticuerpo de control negativo es una inmunoglobulina, tal como un anticuerpo monoclonal. La tinción con el anticuerpo de control negativo puede usarse para evaluar el nivel de tinción de fondo en una muestra del sujeto. En algunos ejemplos, la muestra teñida con el anticuerpo de control negativo es una muestra del mismo sujeto (tal como una sección adyacente o en serie de la muestra) que la muestra teñida con el agente de unión específica a GIV-fl (por ejemplo, anticuerpo). En otros ejemplos, la muestra teñida con el anticuerpo de control negativo es de un sujeto diferente al de la muestra teñida con el agente de unión específica a GIV-fl (por ejemplo, anticuerpo).

65 En aún otro ejemplo, la expresión de la GIV-fl se mide cuantificando el ARNm. Se conocen varias técnicas para

purificar ARNm a partir de tejidos, incluyendo tejidos recientes o fijados en formalina, incrustados en parafina (FFPET), véase, por ejemplo, la patente estadounidense n.º 6.248.535 "Method for isolation of RNA from formalin-fixed paraffin-embedded tissue specimens". La detección cuantitativa de ARNm mediante RT-PCR de un gen diana con respecto a un gen de mantenimiento también se conoce en la técnica, véase, por ejemplo, la patente estadounidense n.º 8.586.311. Una reacción típica implica un cebador directo y uno inverso. Al menos uno de los cebadores, preferiblemente el cebador usado para la etapa de transcripción inversa, abarca la unión de dos exones del gen diana para evitar la amplificación del ADN residual. Para detectar el transcrito de longitud completa (GIV-fl) al menos un cebador es específico para el último exón codificante del gen. En algunas realizaciones, la cantidad relativa del ARNm de GIV-fl se determina mediante comparación con la cantidad detectada de ARNm de un gen con un nivel de transcripción constitutivo, algunas veces denominado "gen de mantenimiento". La comparación puede realizarse determinando una diferencia o una razón de las dos medidas. Los ejemplos de genes de mantenimiento incluyen, sin limitación, beta-actina, GADPH, gen de receptor de transferrina o gen de TMEM55B. En aún otros ejemplos, la cantidad relativa del ARNm de GIV-fl en una muestra tumoral se compara con la cantidad relativa del ARNm de GIV-fl en una muestra de control, por ejemplo, no tumoral. La muestra tumoral se asigna como positiva para GIV-fl si la cantidad relativa del ARNm de GIV-fl es sustancialmente superior a la cantidad relativa del ARNm de GIV-fl en una muestra de control.

#### C. LVI

Los métodos dados a conocer tienen en cuenta el estado de invasión linfovascular (LVI) del sujeto (por ejemplo, positivo o negativo). Los métodos de determinar el LVI son rutinarios, tales como uso de microscopía. Por ejemplo, la muestra de CRC puede analizarse para determinar si había invasión del CRC en vasos sanguíneos o vasos linfáticos, por ejemplo usando microscopía de una imagen teñida con H&E o con un anticuerpo específico para el endotelio linfático tal como D2-40 o con un anticuerpo específico para CD34. El estado de LVI puede usarse en combinación con el estado de GIV-fl para determinar si es probable o no es probable que un CRC pMMR de estadio IIa o IIb responda a quimioterapia o bioterapia.

#### D. Otras variables clínicas

Los métodos dados a conocer tienen en cuenta las una o más características del sujeto (o introducen características conocidas para el sujeto en un ordenador o algoritmo). En algunos ejemplos, las una o más características del sujeto se emiten mediante un ordenador o algoritmo, por ejemplo en una salida visual o audible. En algunos ejemplos, las una o más características del sujeto se introducen en un algoritmo. Las características a modo de ejemplo incluyen, pero no se limitan a, la edad del sujeto, edad en el diagnóstico, número de ganglios linfáticos que son positivos para CRC, sexo del sujeto (hombre o mujer), estado de diferenciación tumoral (por ejemplo, moderada, mala o buena), estadio T del CRC (por ejemplo, T1, T2, T3, T4 o T3/4, que refleja el tamaño y/o grado del tumor primario), y en qué lado estaba presente el cáncer de colon (por ejemplo, derecho o izquierdo). El estado de GIV-fl, en combinación con una o más características del sujeto, y en algunos ejemplos también en combinación con el estado de LVI, puede usarse para determinar si es probable o no es probable que un CRC pMMR de estadio II responda a quimioterapia o bioterapia.

#### E. Muestras

En algunos ejemplos, los métodos dados a conocer incluyen la etapa de preparar una muestra para su análisis (por ejemplo fijar la muestra, ponerla en contacto con anticuerpos frente a GIV-fl o tinción de H&E), tras haberse obtenido la muestra. En la técnica se conocen métodos de obtener una muestra biológica, tal como una muestra de resección quirúrgica, de un sujeto. Por ejemplo, los métodos de obtener tejido, tal como tejido colorrectal, tejido de ganglio linfático, células colorrectales o células de ganglio linfático, son rutinarios. Por ejemplo, puede obtenerse una muestra de un CRC que contiene material celular mediante escisión quirúrgica de la totalidad o parte del tumor, recogiendo un aspirado de aguja fina a partir del tumor, así como otros métodos conocidos en la técnica. En algunos ejemplos, la muestra se ha obtenido de un sujeto que tiene o se sospecha que tiene CRC de estadio II (tal como estadio IIa o IIb). En ejemplos particulares, la muestra obtenida del sujeto incluye células tumorales, tales como al menos una porción de un tumor. En algunos ejemplos, la muestra del sujeto también incluye células o tejido normales (por ejemplo, no tumorales). En algunos ejemplos, la muestra tumoral se coloca en formalina tamponada neutra al 10% tras la extirpación del sujeto.

La muestra puede ser reciente, congelada o fijada. En algunos ejemplos, las muestras se procesan tras la recogida mediante fijación y en algunos ejemplos se incrustan en cera (por ejemplo, parafina). En la técnica se conocen bien fijadores para preparaciones de células y tejidos montadas e incluyen, sin limitación, fijador de formalina, fijador de Bouin alcohólico al 95%; fijador de alcohol al 95%; fijador B5, fijador de Bouin, fijador de Karnovsky (glutaraldehído), fijador de Hartman, fijador de Hollande, disolución de Orth (fijador de dicromato) y fijador de Zenker (véase, por ejemplo, Carson, *Histotechnology: A Self-Instructional Text*, Chicago: ASCP Press, 1997). La intensidad de tinción de GIV-fl puede variar dependiendo de los fijadores particulares usados (tales como alcohol al 95%, AFA, B5 o Prefer). En ejemplos particulares, la muestra se fija en formalina tamponada neutra (tal como formalina tamponada neutra al 10%) o formalina de cinc. En algunos ejemplos, la muestra se fija durante al menos aproximadamente 6 horas (por ejemplo, aproximadamente 6-48 horas, 12-24 horas o aproximadamente 6, 12, 16, 18, 24, 36 ó 48 horas). En

ejemplos adicionales, la muestra se coloca en el fijador dentro del plazo de aproximadamente 6 horas desde la recogida (por ejemplo, dentro del plazo de aproximadamente 15 minutos, 30 minutos, 1, 2, 3, 4, 5 ó 6 horas).

- 5 En algunos ejemplos, la muestra puede ser una muestra de tejido fijada, incrustada en cera, tal como una muestra de tejido fijada, incrustada en cera, que incluye células tumorales. En algunos ejemplos, la muestra es una sección tisular que incluye células tumorales marcadas con un anticuerpo primario específico para GIV-fl, que puede marcarse directa o indirectamente (por ejemplo, con un anticuerpo secundario marcado), que en algunos ejemplos se tiñe adicionalmente con H&E (por ejemplo, usando una sección adyacente o en serie de la misma muestra).
- 10 En algunos ejemplos, la muestra (o una fracción de la misma) está presente en un soporte sólido. Los soportes sólidos portan la muestra biológica y permiten la detección conveniente de componentes (por ejemplo, proteínas) en la muestra. Los soportes o sustratos a modo de ejemplo incluyen portaobjetos de microscopio (por ejemplo, portaobjetos de microscopio de vidrio o portaobjetos de microscopio de plástico), cubreobjetos (por ejemplo, cubreobjetos de vidrio o cubreobjetos de plástico), placas de cultivo tisular, placas de múltiples pocillos, membranas (por ejemplo, de nitrocelulosa o poli(fluoruro de vinilideno) (PVDF)) o chips BIACORE™.

#### F. Métodos de tratamiento (no son objeto de las reivindicaciones)

- 20 Los métodos dados a conocer pueden incluir además identificar y/o seleccionar a sujetos para tratamiento con quimioterapia o bioterapia. Por ejemplo, si los métodos dados a conocer indican que el CRC es de riesgo alto, puede seleccionarse al sujeto para tratamiento con quimioterapia o bioterapia, mientras que si los métodos dados a conocer indican que el CRC es de riesgo bajo, entonces puede seleccionarse al sujeto para abstenerse de quimioterapia o bioterapia. Adicionalmente, los métodos dados a conocer no incluyen, pero pueden ir seguidos por, administrar una o más quimioterapias o bioterapias al sujeto si se concluye que la muestra obtenida del sujeto es de riesgo alto (por ejemplo, una que es probable que presente progresión o recidiva, por ejemplo si la muestra es positiva para GIV-fl y positiva para LVI). En cambio, las realizaciones dadas a conocer pueden incluir además identificar a sujetos que no es probable que se beneficien de quimioterapia o bioterapia, por ejemplo si se concluye que la muestra tumoral obtenida del sujeto es de riesgo bajo (por ejemplo, una que es probable que presente progresión o recidiva, por ejemplo si la muestra es negativa para GIV-fl y negativa para LVI).

#### 30 1. Terapias biológicas y quimioterapias contra CRC a modo de ejemplo

- 35 Las quimioterapias y bioterapias contra CRC incluyen agentes terapéuticos que, cuando se administran en cantidades terapéuticamente eficaces, inducen la respuesta deseada (por ejemplo, tratamiento de un CRC, por ejemplo reduciendo el tamaño o volumen del tumor, o reduciendo el tamaño, volumen o número de metástasis). Los ejemplos de quimioterapias y bioterapias contra CRC que pueden usarse incluyen, pero no se limitan a, una o más de las siguientes: 5-fluorouracilo (por ejemplo, Aducril®, Efudex®, Fluoroplex®), Avastin® (bevacizumab), Camptosar® (clorhidrato de irinotecán), capecitabina (por ejemplo, Xeloda®), oxaliplatino (por ejemplo, Eloxatin®), Erbitux® (cetuximab), leucovorina de calcio, regorafenib, Stivarga® (regorafenib), Vectibix® (panitumumab), Wellcovorin® (leucovorina de calcio) y Zaltrap® (ziv-aflibercept). Los ejemplos de combinaciones de fármacos usadas para CRC incluyen, pero no se limitan a: CAPOX (capecitabina y oxaliplatino), FOLFIRI (5-FU, leucovorina e irinotecán), FOLFIRI-bevacizumab, FOLFIRI-cetuximab, FOLFOX (5-FU, leucovorina y oxaliplatino) y XELOX.

- 45 En un ejemplo, una quimioterapia o bioterapia contra CRC aumenta la destrucción de células de CRC (o reduce su viabilidad). No es necesario que tal destrucción de como resultado una reducción del 100% de células de CRC; por ejemplo una quimioterapia contra CRC que da como resultado una reducción del número de células de CRC viables en al menos el 10%, al menos el 20%, al menos el 30%, al menos el 40%, al menos el 50%, al menos el 75%, al menos el 90% o al menos el 95% (por ejemplo en comparación con ausencia de tratamiento con la quimioterapia o bioterapia contra CRC) puede usarse en los métodos proporcionados en el presente documento. Por ejemplo, la quimioterapia o bioterapia contra CRC puede reducir el crecimiento de células de CRC en al menos el 10%, al menos el 20%, al menos el 30%, al menos el 40%, al menos el 50%, al menos el 75%, al menos el 90% o al menos el 95% (por ejemplo en comparación con ausencia de quimioterapia o bioterapia).

- 55 En un ejemplo, una quimioterapia o bioterapia contra CRC reduce la expresión o actividad de GIV-fl. No es necesario que tal inhibición dé como resultado una reducción del 100% de la expresión o actividad de GIV-fl; por ejemplo una quimioterapia contra CRC que da como resultado una reducción de la expresión o actividad de GIV-fl en al menos el 10%, al menos el 20%, al menos el 30%, al menos el 40%, al menos el 50%, al menos el 75%, al menos el 90% o al menos el 95% (por ejemplo en comparación con ausencia de tratamiento con quimioterapia o bioterapia contra CRC) puede usarse en los métodos proporcionados en el presente documento. Por ejemplo, la quimioterapia o bioterapia contra CRC puede interferir con la expresión génica (transcripción, procesamiento, translación, modificación postraduccional).

- 65 En un ejemplo, una bioterapia contra CRC incluye o consiste en un anticuerpo, tal como un anticuerpo humanizado. Tales anticuerpos pueden ser anticuerpos policlonales, monoclonales o quiméricos. Tal como se indicó anteriormente, los métodos de preparar anticuerpos específicos para una diana particular son rutinarios. En algún ejemplo, el anticuerpo terapéutico se conjuga con una toxina.

Otros ejemplos de bioterapia contra CRC incluyen moléculas de ácido nucleico inhibitoras, tales como un oligonucleótido antisentido, un ARNip, un microARN (miARN), un ARNhp o una ribozima. Tales moléculas pueden usarse para disminuir o eliminar la expresión de gen de GIV-fl. Se contempla para su uso cualquier tipo de compuesto antisentido que seleccione específicamente como diana y regule la expresión de ácido nucleico de GIV-fl. Un compuesto antisentido es uno que se hibrida específicamente con, y modula la expresión de, una molécula de ácido nucleico diana (tal como GIV-fl). Estos compuestos pueden introducirse como compuestos de cadena sencilla, cadena doble, circulares, ramificados o de horquilla y pueden contener elementos estructurales tales como bucles o protuberancias internos o terminales. Los compuestos antisentido de cadena doble pueden ser dos cadenas hibridadas para formar compuestos de cadena doble o una cadena sencilla con suficiente auto-complementariedad como para permitir la hibridación y formación de un compuesto total o parcialmente de cadena doble. En algunos ejemplos, un oligonucleótido de GIV-fl antisentido es un compuesto antisentido de cadena sencilla, de tal manera que cuando el oligonucleótido antisentido se hibrida con un ARNm de GIV-fl, el dúplex se reconoce por ARNasa H, dando como resultado la escisión del ARNm. En otros ejemplos, un miARN es una molécula de ARN de cadena sencilla de aproximadamente 21-23 nucleótidos que es al menos parcialmente complementaria a una molécula de ARNm que regula la expresión génica a través de una ruta de iARN. En ejemplos adicionales, un ARNhp es un oligonucleótido de ARN que forma una horquilla estrecha, que se escinde para dar ARNip. Las moléculas de ARNip generalmente tienen aproximadamente 20-25 nucleótidos de longitud y pueden tener una proyección de dos nucleótidos en los extremos 3', o pueden presentar extremos romos. Generalmente, una cadena de un ARNip es al menos parcialmente complementaria a un ácido nucleico diana. Compuestos antisentido que seleccionan específicamente como diana un gen de GIV-fl pueden prepararse diseñando compuestos que son complementarios a una secuencia de nucleótidos de GIV-fl, tal como una secuencia de ARNm. No se necesita que los compuestos antisentido de GIV-fl sean complementarios al 100% con la molécula de ácido nucleico de GIV-fl para hibridarse específicamente y regular la expresión de GIV-fl. Por ejemplo, el compuesto antisentido, o cadena antisentido del compuesto si es un compuesto de cadena doble, puede ser complementario en al menos el 75%, al menos el 80%, al menos el 85%, al menos el 90%, al menos el 95%, al menos el 99% o el 100% a una secuencia de ácido nucleico de GIV-fl. Se conocen bien métodos de examinar compuestos antisentido para determinar la especificidad (véase, por ejemplo, la publicación estadounidense n.º 2003-0228689). Además, los métodos de diseñar, preparar y usar moléculas de ácido nucleico inhibitoras se encuentran dentro de las capacidades de un experto en la técnica. Además, hay secuencias para GIV-fl disponibles para el público.

## 2 Administración de quimio o bioterapia y otros agentes

En algunos ejemplos, los métodos dados a conocer van seguidos por proporcionar una cantidad terapéuticamente eficaz de una o más quimioterapias o bioterapias contra CRC a un sujeto que tiene un CRC pMMR de estadio II de riesgo alto. Los expertos habituales en la técnica conocen métodos y dosificaciones terapéuticas de tales agentes y tratamientos y, por ejemplo, puede determinarlos un médico experto. En algunos ejemplos, los métodos dados a conocer van seguidos por proporcionar cirugía y/o radioterapia al sujeto en combinación con la quimioterapia o bioterapia (por ejemplo, de manera secuencial, de manera sustancialmente simultánea o de manera simultánea). La administración puede lograrse mediante una única o múltiples dosis. Los expertos en la técnica conocen métodos y dosificaciones terapéuticas de tales agentes y tratamientos, y puede determinarlos un médico experto. La dosis requerida variará de un sujeto a otro dependiendo de la especie, edad, peso y estado general del sujeto, el agente terapéutico particular que esté usándose y su modo de administración.

Pueden administrarse agentes terapéuticos, incluyendo quimioterapias o bioterapia contra CRC, a un sujeto que necesita tratamiento usando cualquier medio adecuado conocido en la técnica. Los métodos de administración incluyen, pero no se limitan a, intradérmica, transdérmica, intramuscular, intraperitoneal, parenteral, intravenosa, subcutánea, vaginal, rectal, intranasal, por inhalación, oral o mediante pistola génica. La administración intranasal se refiere a administración de las composiciones al interior de la nariz y los conductos nasales a través de uno o ambos orificios nasales y puede incluir la administración mediante un mecanismo de pulverización o un mecanismo de gotitas, o mediante aerosolización del agente terapéutico.

La administración de los agentes terapéuticos, incluyendo quimioterapias o bioterapia contra CRC, mediante inhalador puede realizarse a través de la nariz o la boca mediante administración por mecanismos de pulverización o gotitas. La administración puede realizarse directamente a cualquier zona del aparato respiratorio mediante intubación. La administración parenteral se logra generalmente mediante inyección. Pueden prepararse productos inyectables de maneras convencionales, ya sea como disoluciones o suspensiones líquidas, formas sólidas adecuadas para disolución de suspensión en líquido antes de la inyección, o como emulsiones. Pueden prepararse disoluciones y suspensiones para inyección a partir de polvos estériles, gránulos y comprimidos. La administración puede ser sistémica o local.

Pueden administrarse agentes terapéuticos, incluyendo quimioterapias o bioterapias contra CRC, de cualquier manera adecuada, por ejemplo con portadores farmacéuticamente aceptables. Los portadores farmacéuticamente aceptables se determinan en parte por la composición particular que está administrándose, así como por el método particular usado para administrar la composición. Por consiguiente, hay una amplia variedad de formulaciones adecuadas de composiciones farmacéuticas de la presente divulgación. Los portadores farmacéuticamente

aceptables (vehículos) útiles en esta divulgación son convencionales. Remington's Pharmaceutical Sciences, de E. W. Martin, Mack Publishing Co., Easton, PA, 15ª edición (1975), describe composiciones y formulaciones adecuadas para la administración farmacéutica de uno o más agentes terapéuticos

5 Las preparaciones para administración parenteral incluyen disoluciones, suspensiones y emulsiones estériles acuosas y no acuosas. Los ejemplos de disolventes no acuosos son propilenglicol, polietilenglicol, aceites vegetales tales como aceite de oliva, y ésteres orgánicos inyectables tales como oleato de etilo. Los portadores acuosos incluyen agua, disoluciones, emulsiones o suspensiones alcohólicas/acuosas, incluyendo solución salina y medios tamponados. Los vehículos parenterales incluyen disolución de cloruro de sodio, dextrosa de Ringer, dextrosa  
10 cloruro de sodio, solución de Ringer con lactato, o aceites fijos. Los vehículos intravenosos incluyen reponedores de nutrientes y líquidos, reponedores de electrolito (tal como los basados en dextrosa de Ringer) y similares. También pueden estar presentes conservantes y otros aditivos tales como, por ejemplo, agentes antimicrobianos, antioxidantes, agentes quelantes y gases inertes y similares.

15 Las formulaciones para administración tópica pueden incluir pomadas, lociones, cremas, geles, gotas, supositorios, pulverizaciones, líquidos y polvos. Pueden necesitarse o ser deseables portadores farmacéuticos convencionales, bases acuosas, en polvo o aceitosas, espesantes y similares.

Los agentes terapéuticos, incluyendo quimioterapias o bioterapia contra CRC, para administración oral incluyen polvos o gránulos, suspensiones o disoluciones en agua o medios no acuosos, cápsulas, sobres o comprimidos. Pueden ser deseables espesantes, aromatizantes, diluyentes, emulsionantes, adyuvantes de dispersión o  
20 aglutinantes.

Pueden administrarse agentes terapéuticos, incluyendo quimioterapias o bioterapia contra CRC, como sal de adición  
25 de ácido o base farmacéuticamente aceptable, formada mediante reacción con ácidos inorgánicos tales como ácido clorhídrico, ácido bromhídrico, ácido perclórico, ácido nítrico, ácido tiocianico, ácido sulfúrico y ácido fosfórico, y ácidos orgánicos tales como ácido fórmico, ácido acético, ácido propiónico, ácido glicólico, ácido láctico, ácido pirúvico, ácido oxálico, ácido malónico, ácido succínico, ácido maleico y ácido fumárico, o mediante reacción con una base inorgánica tal como hidróxido de sodio, hidróxido de amonio, hidróxido de potasio y bases orgánicas tales  
30 como mono, di, triálquil y aril-aminas y etanolaminas sustituidas.

Las quimioterapias y bioterapias contra CRC pueden incluir agentes quimioterápicos antineoplásicos, antibióticos, agentes alquilantes y antioxidantes, inhibidores de cinasa y otros agentes tales como anticuerpos. Los ejemplos  
35 particulares de agentes quimioterápicos adicionales que pueden usarse incluyen agentes alquilantes, tales como mostazas de nitrógeno (por ejemplo, clorambucilo, clormetina, ciclofosfamida, ifosfamida y melfalán), nitrosoureas (por ejemplo, carmustina, fotemustina, lomustina y estreptozocina), compuestos de platino (por ejemplo, carboplatino, cisplatino, oxaliplatino y BBR3464), busulfano, dacarbazina, mecloretamina, procarbazona, temozolomida, tiotepa y uramustina; ácido fólico (por ejemplo, metotrexato, pemetrexed y raltitrexed), purina (por ejemplo, cladribina, clofarabina, fludarabina, mercaptopurina y tioguanina), pirimidina (por ejemplo, capecitabina),  
40 citarabina, fluorouracilo y gemcitabina; alcaloides vegetales, tales como podofilo (por ejemplo, etopósido y tenipósido); agentes de unión a microtúbulos (tal como paclitaxel, docetaxel, vinblastina, vindesina, vinorelbina (navelbina), vincristina, las epotilonas, colchicina, dolastatina 15, nocodazol, podofilotoxina, rizoxina y derivados y análogos de los mismos), agentes de reticulación o intercalación de ADN (tales como cisplatino, carboplatino, oxaliplatino, mitomicinas, tales como mitomicina C, bleomicina, clorambucilo, ciclofosfamida y derivados y análogos  
45 de los mismos), inhibidores de la síntesis de ADN (tales como metotrexato, 5-fluoro-5'-desoxiuridina, 5-fluorouracilo y análogos de los mismos); miembros de la familia de antraciclina (por ejemplo, daunorubicina, doxorubicina, epirubicina, idarubicina, mitoxantrona y valrubicina); antimetabolitos, tales como antibióticos citotóxicos/antitumorales, bleomicina, rifampicina, hidroxiurea y mitomicina; inhibidores de topoisomerasa, tales como topotecán e irinotecán; anticuerpos monoclonales, tales como alemtuzumab, bevacizumab, cetuximab,  
50 gemtuzumab, rituximab, panitumumab, pertuzumab y trastuzumab; fotosensibilizadores, tales como ácido aminolevulínico, aminolevulinato de metilo, porfímero de sodio, y verteporfina, enzimas, inhibidores enzimáticos (tales como camptotecina, etopósido, formestano, tricostatina y derivados y análogos de los mismos), inhibidores de cinasa (tales como imatinib, gefitinib y erlotinib), reguladores génicos (tales como raloxifeno, 5-azacitidina, 5-aza-2'-desoxicitidina, tamoxifeno, 4-hidroxitamoxifeno, mifepristona y derivados y análogos de los mismos); y otros agentes,  
55 tales como alitretinoína, altretamina, amsacrina, anagrelida, trióxido de arsénico, asparaginasa, axitinib, bexaroteno, bevacizumab, bortezomib, celecoxib, denileucina difitox, estramustina, hidroxycarbamida, lapatinib, pazopanib, pentostatina, masoprocol, mitotano, pegaspargasa, tamoxifeno, sorafenib, sunitinib, vemurafinib, vandetanib y tretinoína. Los expertos en la técnica conocen métodos y dosificaciones terapéuticas de tales agentes, y pueden determinarse por un médico experto. Otros agentes terapéuticos, por ejemplo agentes antitumorales, que pueden o  
60 no pertenecer a una o más de las clasificaciones anteriores, también son adecuados para la administración en combinación con los agentes de unión específica descritos. Los expertos en la técnica conocen la selección y dosificaciones terapéuticas de tales agentes, y pueden determinarse por un médico experto.

En algunos ejemplos, la dosis de un ácido nucleico inhibidor de GIV-fl (tal como una molécula antisentido, ARNip, ARNhp o miARN) es de aproximadamente 1 mg a aproximadamente 1000 mg, de aproximadamente 10 mg a  
65 aproximadamente 500 mg o de aproximadamente 50 mg a aproximadamente 100 mg. En algunos ejemplos, la dosis

de compuesto antisentido es de aproximadamente 1 mg, aproximadamente 10 mg, aproximadamente 50 mg, aproximadamente 100 mg, aproximadamente 250 mg, aproximadamente 500 mg o aproximadamente 1000 mg. En algunas realizaciones, la dosis de un ácido nucleico inhibidor es de aproximadamente 1,0 mg/kg a aproximadamente 100 mg/kg o de aproximadamente 5,0 mg/kg a aproximadamente 500 mg/kg, de aproximadamente 10 mg/kg a aproximadamente 100 mg/kg o de aproximadamente 25 a aproximadamente 50 mg/kg. En algunos ejemplos, la dosis de un ácido nucleico inhibidor es de aproximadamente 1,0 mg/kg, aproximadamente 5 mg/kg, aproximadamente 10 mg/kg, aproximadamente 12,5 mg/kg, aproximadamente 15 mg/kg, aproximadamente 20 mg/kg, aproximadamente 25 mg/kg, aproximadamente 30 mg/kg, aproximadamente 35 mg/kg, aproximadamente 40 mg/kg, aproximadamente 45 mg/kg, aproximadamente 50 mg/kg, aproximadamente 60 mg/kg, aproximadamente 70 mg/kg, aproximadamente 80 mg/kg o aproximadamente 100 mg/kg. Se apreciará que estas dosificaciones son sólo ejemplos, y un experto habitual en la técnica puede determinar una dosis apropiada usando sólo experimentación de rutina.

En algunas realizaciones, la dosis de un anticuerpo o conjugado de anticuerpo es de aproximadamente 1 mg/kg a aproximadamente 25 mg/kg, tal como de aproximadamente 2 mg/kg a aproximadamente 15 mg/kg, de aproximadamente 2 mg/kg a aproximadamente 10 mg/kg o de aproximadamente 2 mg/kg a aproximadamente 8 mg/kg. En algunos ejemplos, la dosis de anticuerpo es de aproximadamente 1 mg/kg, aproximadamente 2 mg/kg, aproximadamente 4 mg/kg, aproximadamente 5 mg/kg, aproximadamente 6 mg/kg, aproximadamente 8 mg/kg, aproximadamente 10 mg/kg, aproximadamente 15 mg/kg, aproximadamente 20 mg/kg o aproximadamente 25 mg/kg. En otras realizaciones, la dosis de anticuerpo es de aproximadamente 50 mg/m<sup>2</sup> a aproximadamente 500 mg/m<sup>2</sup>, tal como de aproximadamente 50 mg/m<sup>2</sup> a aproximadamente 400 mg/m<sup>2</sup>, de aproximadamente 100 mg/m<sup>2</sup> a aproximadamente 400 mg/m<sup>2</sup> o de aproximadamente 250 mg/m<sup>2</sup> a aproximadamente 400 mg/m<sup>2</sup>. En algunos ejemplos, la dosis es de aproximadamente 50 mg/m<sup>2</sup>, aproximadamente 100 mg/m<sup>2</sup>, aproximadamente 150 mg/m<sup>2</sup>, aproximadamente 200 mg/m<sup>2</sup>, aproximadamente 250 mg/m<sup>2</sup>, aproximadamente 300 mg/m<sup>2</sup>, aproximadamente 400 mg/m<sup>2</sup> o aproximadamente 500 mg/m<sup>2</sup>. Se apreciará que estas dosificaciones sólo son ejemplos y que un experto habitual en la técnica puede determinar una dosis apropiada usando sólo experimentación de rutina.

#### G. Desenlaces

Tras la detección de la expresión de GIV-fl y determinación de la puntuación de proteína GIV-fl y estado de GIV-fl, así como el estado de LVI y opcionalmente otras características de paciente, los resultados de ensayo (tales como el estado de GIV-fl y estado de LVI), hallazgos, pronóstico, predicciones y/o recomendaciones de tratamiento pueden registrarse y comunicarse a técnicos, médicos y/o pacientes, por ejemplo. En determinadas realizaciones, se usan ordenadores para comunicar tal información a las partes interesadas, tales como, pacientes y/o los médicos encargados. Basándose en el estado de GIV-fl, estado de LVI y opcionalmente otras características de paciente, una salida en cuanto a si el CRC es de riesgo alto o bajo (tal como si es probable que el CRC presente progresión o recidiva, y por tanto es probable que responda a quimioterapia o bioterapia), puede asignarse el sujeto del que se obtuvo la muestra a un plan de tratamiento, tal como tratamiento o no con quimioterapia o bioterapia.

En una realización, un pronóstico, predicción y/o recomendación de tratamiento basándose en la salida (si el CRC es de riesgo alto o bajo) se comunica a las partes interesadas lo antes posible tras completarse el ensayo y generarse el pronóstico. Los resultados y/o información relacionada pueden comunicarse al sujeto por el médico que trata al sujeto. Alternativamente, los resultados pueden comunicarse directamente a las partes interesadas por cualquier medio de comunicación, incluyendo por escrito, tal como proporcionando un informe escrito, formas electrónicas de comunicación, tales como correo electrónico, o teléfono. La comunicación puede facilitarse mediante el uso de un ordenador programado de manera adecuada, tal como en caso de comunicaciones por correo electrónico. En determinadas realizaciones, la comunicación que contiene resultados de la prueba y/o conclusiones extraídas de y/o recomendaciones de tratamiento basadas en la prueba, puede generarse y suministrarse automáticamente a las partes interesadas usando una combinación de hardware y software informáticos con los que estarán familiarizados los trabajadores expertos en telecomunicaciones. Un ejemplo de un sistema de comunicaciones orientado a la atención sanitaria se describe en la patente estadounidense n.º 6.283.761; sin embargo, la presente divulgación no se limita a métodos que usen este sistema de comunicaciones particular.

En determinadas realizaciones de los métodos de la divulgación, la totalidad o algunas de las etapas de método, incluyendo el ensayo de muestras, puntuación de la expresión de proteína GIV-fl, pronóstico del tumor y comunicación de resultados de ensayo o pronóstico, pueden llevarse a cabo en diversas jurisdicciones (por ejemplo, en el extranjero).

#### H. Medios legibles por ordenador

Cualquier medio legible por ordenador en el presente documento puede ser no transitorio (por ejemplo, memoria, almacenamiento magnético, almacenamiento óptico o similares).

Cualquiera de las acciones de almacenamiento descritas en el presente documento puede implementarse almacenando en uno o más medios legibles por ordenador (por ejemplo, medios de almacenamiento legibles por

ordenador u otros medios tangibles).

Cualquiera de las cosas que se describe que se almacenan puede almacenarse en uno o más medios legibles por ordenador (por ejemplo, medios de almacenamiento legibles por ordenador u otros medios tangibles).

5 Cualquiera de los métodos descritos en el presente documento puede implementarse mediante instrucciones ejecutables por ordenador en (por ejemplo, codificadas en) uno o más medios legibles por ordenador (por ejemplo, medios de almacenamiento legibles por ordenador u otros medios tangibles). Tales instrucciones pueden hacer que un ordenador realice el método. Las tecnologías descritas en el presente documento pueden implementarse en una  
10 variedad de lenguajes de programación.

Cualquiera de los métodos descritos en el presente documento puede implementarse mediante instrucciones ejecutables por ordenador almacenadas en uno o más dispositivos de almacenamiento legibles por ordenador (por ejemplo, memoria, almacenamiento magnético, almacenamiento óptico o similares). Tales instrucciones pueden hacer que un ordenador realice el método.  
15

I. Modelo de predicción estadístico

Los métodos usan modelos de predicción estadístico. Basándose en el estado de GIV-fl, el estado de LVI y opcionalmente otras características clínicas, los métodos son predictivos de si un CRC pMMR de estadio II responderá probablemente a quimioterapia o bioterapia. En el desarrollo del modelo, se tiene en cuenta cada variable mientras se mantienen otras variables constantes. Los modelos estadísticos usan modelado por riesgos instantáneos proporcionales de Cox (Cox, Journal of the Royal Statistical Society, Series B 34 (2): 187-220, 1972).  
20

Matemáticamente, el modelado de la supervivencia por riesgos instantáneos proporcionales de Cox define un desenlace de tiempo hasta el acontecimiento en cuanto a la función de riesgo instantáneo  $h(t)$ , algunas veces denominada tasa de fallo, que es una tasa de la función de densidad de probabilidad (numerador) y la función de supervivencia (denominador). Pueden incorporarse posibles factores de predicción en este modelo estadístico de la siguiente manera:  
25

$$30 \quad h(t|\mathbf{X}) = h_0(t) \exp(\beta_1 X_1 + \dots + \beta_p X_p)$$

En estos modelos,  $h_0(t)$  es el riesgo instantáneo de referencia (análogo a una ordenada en el origen en modelos lineales), la función de riesgo instantáneo es lineal en los  $p$  coeficientes estimados,  $\beta$  y los  $p$  factores de predicción son aditivos a lo largo de los coeficientes, y pueden ser o bien categóricos o bien continuos. Los modelos de riesgos instantáneos proporcionales de Cox no realizan ninguna suposición paramétrica sobre el riesgo instantáneo de referencia,  $h_0(t)$  y cuando se estiman las  $\beta$  se supone que son proporcionales a lo largo del tiempo dentro de los factores de predicción. Los coeficientes estimados se obtienen usando métodos de probabilidades parciales, una técnica estadística habitual. Se usaron el paquete de fuente abierta R ([www.Rproject.org](http://www.Rproject.org)) y el software SAS versión 40 9.3 (SAS Institute, Carey, Carolina del Norte) para la programación estadística.

Los coeficientes ajustados, exponenciados,  $\exp(\beta)$  para cada factor de predicción se interpretan como una “razón de riesgos instantáneos” que describe la razón entre tasas de riesgos instantáneos en los factores de predicción; para factores de predicción categóricos, esta es la probabilidad de que se produzca un acontecimiento (recidiva) en un grupo en comparación con otro grupo a cualquier tiempo,  $t$ , y para factores de predicción continuos es la probabilidad de que se produzca un acontecimiento a lo largo de algún intervalo de factor de predicción en comparación con un intervalo adyacente (de nuevo, a cualquier tiempo,  $t$ ). Las razones que son inferiores a uno indican que el grupo de referencia (denominador) tiene una probabilidad superior de recidiva, y las razones superiores a uno indican que la categoría del comparador tiene una probabilidad superior de recidiva. Por ejemplo, con carácter positivo para GIV-fl y LVI, se usaron grupos negativos para GIV-fl y negativos para LVI como referencia. El tercer conjunto de resultados en la tabla 11 muestra las razones de riesgos instantáneos estimadas para el carácter positivo para GIV-fl (en comparación con negativo para GIV-fl) y positivo para LVI (en comparación con negativo para LVI) cuando se incluyen ambas variables en un modelo ajustado (2,56 y 2,07, respectivamente). Dado que el modelo ajustado es lineal en la escala exponencial, la razón de riesgos instantáneos de dos factores para cuando ambas de estas variables son positivas (por ejemplo, ambas adoptan el valor 1, de modo que  $X_1 = 1$  y  $X_2 = 1$ ) se estima mediante el producto de las razones de riesgos instantáneos:  
45  
50  
55

$$HR_{GIV=1,LVI=1} = \exp(\hat{\beta}_1 X_1) \exp(\hat{\beta}_2 X_2) = (2,56)(2,07) = 5,30$$

60 Cuando GIV-fl es positivo ( $X_1 = 1$ ), y LVI es negativo ( $X_2 = 0$ ), la razón de riesgos instantáneos de dos factores pasa a ser (obsérvese que  $\exp(0) = 1$ ):

$$HR_{GIV=1,LVI=0} = \exp(\hat{\beta}_1 X_1) \exp(\hat{\beta}_2 X_2) = (2,56)(1) = 2,56$$

Y además, cuando tanto GIV-fl como LVI son negativos ( $X_1 = 0$  y  $X_2 = 0$ ) la razón de riesgos instantáneos de dos factores pasa a ser:

$$HR_{GIV=0,LVI=0} = \exp(\hat{\beta}_1 X_1) \exp(\hat{\beta}_2 X_2) = (1)(1) = 1$$

5 Por tanto, hay una probabilidad superior de recidiva para pacientes positivos tanto para la expresión de GIV-fl como para LVI que cualquiera de estas variables solas, en comparación con pacientes con ninguna; los pacientes con ambas variables tienen 5 veces más probabilidad de presentar recidiva en comparación con pacientes con ninguno de carácter positivo para GIV-fl o LVI. Esta razón de riesgo de recidiva es mayor que el riesgo de 2,56 para positivo para GIV por sí solo, y el de 2,07 para LVI por sí solo. Cualquiera de las razones de riesgos instantáneos de múltiples factores, a partir de modelos de múltiples factores (por ejemplo, modelo que incluye "todas" las variables clínicas), puede obtenerse de esta manera. La razón de riesgos instantáneos no es simétrica, ya que, por definición, es un número entre 0 y  $\infty$ ; no resulta poco común examinar estas estimaciones en cuanto al logaritmo de esta razón de riesgos instantáneos, dado que entonces la razón es un número simétrico que va desde  $\infty$  hasta  $\infty$ . En este último caso, las razones de riesgos instantáneos logarítmicas negativas describen cuando es más probable que el grupo de referencia presente recidiva, y las razones de riesgos instantáneos logarítmicas positivas son cuando es menos probable que el grupo de referencia presente recidiva, en comparación con el grupo especificado.

20 Para la clasificación, se usó una población de pacientes que no habían recibido previamente quimioterapia para estimar los coeficientes, y el factor de predicción lineal ( $L_p$ ) es el que proporciona la máxima sensibilidad y especificidad como punto de corte para riesgo alto y bajo. Específicamente, el factor de predicción lineal se obtiene para cada paciente que no ha recibido previamente quimioterapia para cualquier modelo de  $p$  factores (donde  $p$  es el número de factores de predicción),  $L_p = \exp(\beta X_{1i} \dots X_{pi})$ . El punto de corte para  $L_p$  se obtiene donde se maximizan tanto la sensibilidad como la especificidad:  $\max(\text{sensibilidad}, \text{especificidad}) = \max(\text{sensibilidad especificidad})$ . Una vez calculado este punto de corte óptimo, puede aplicarse a nuevos valores de  $X$  en una población independiente aplicando simplemente el punto de corte a individuos tratados por quimioterapia. Los individuos con riesgo alto son aquellos que tienen  $L_p >$  punto de corte, y los individuos con riesgo bajo son aquellos que tienen  $L_p <$  punto de corte. Para validar la predicción estadística, después se comparan estas categorías de riesgo alto y bajo con la recidiva real para cada individuo en la población tratada por quimioterapia. El  $L_p$  final puede usarse para determinar riesgo de pacientes individuales, beneficiándose probablemente los pacientes con riesgo alto de tratamiento por quimioterapia o bioterapia.

35 El diagrama de flujo de datos en la figura 1 describe las etapas usadas en el modelado estadístico. Los valores de  $\beta_p$  y  $L_p$  son entradas que pueden proporcionarse a los médicos. Después los médicos pueden usar estas variables para determinar el riesgo individual, basándose en valores de cada valor individual de los factores de predicción,  $X_p$ . El procedimiento mostrado en el diagrama no se necesita para cada evaluación; es una descripción del procedimiento usado para obtener las entradas.

40 La última etapa es la aplicación del modelado estadístico a una población de pacientes que recibieron quimioterapia o bioterapia. Esta etapa demuestra que para pacientes que se clasificaron como de riesgo alto, el 80% de ellos respondieron realmente a quimioterapia o bioterapia (valor predicho positivo = probabilidad de no presentar recidiva dada la clasificación de riesgo alto).

45 La presente divulgación se ilustra mediante los siguientes ejemplos no limitativos.

#### Ejemplo 1

Generación de anticuerpos frente a GIV y optimización de condiciones de tinción

50 Este ejemplo describe métodos usados para generar un anticuerpo monoclonal de conejo específico para la proteína GIV de longitud completa.

Se generó un anticuerpo monoclonal de conejo específico para GIV usando los 11 últimos aminoácidos C-terminales (SKRSRSEQSS, aminoácidos 1861-1871 de SEQ ID NO: 2) de GIV humana. Este anticuerpo monoclonal de conejo anti-GIV es el clon número SP173 (VMSI, número de catálogo M4734).

#### Ejemplo 2

Optimización de las condiciones de tinción de IHC

60 Este ejemplo describe la evaluación de cuatro anticuerpos frente a GIV (3 anticuerpos policlonales comercialmente disponibles y el anticuerpo monoclonal de conejo descrito en el ejemplo 1) que seleccionan como diana la proteína GIV de longitud completa mediante inmunohistoquímica (IHC). Cada ensayo de IHC se desarrolló en casos de hígado (normal, graso y cirrótico) que sirvieron como control negativo.

65

Se comparó el anticuerpo frente a GIV generado en el ejemplo 1 (SP173) con otros tres anticuerpos preparados contra la parte C-terminal de GIV humana, para determinar su capacidad para detectar la proteína GIV de longitud completa. Los tres anticuerpos comercialmente disponibles sometidos a prueba fueron: (1) anticuerpo anti-GIV de Sigma Prestige (número de catálogo HPA038101), que es un anticuerpo policlonal de conejo purificado por afinidad preparado contra 78 aminoácidos C-terminales (1738-1815) de girdina humana; (2) anticuerpo anti-GIV (T-13) de Santa Cruz Biotechnology, Inc. (número de catálogo sc-133371) que es un anticuerpo policlonal de conejo purificado por afinidad preparado contra un péptido que se mapea en el extremo C-terminal de girdina de origen humano; y (3) anticuerpo anti-GIV de Immuno-Biological Laboratories Co. (IBL, número de catálogo 18979), que es un anticuerpo policlonal de conejo purificado por afinidad desarrollado contra los 19 aminoácidos C-terminales de girdina humana.

Se usó el kit de detección OptiView DAB IHC (Ventana Medical Systems, Inc. [VMSI], n.º de catálogo 760-700) para la detección cromogénica de la proteína GIV de longitud completa (GIV-fl). Se logró la contratinción incubando portaobjetos con hematoxilina II y reactivo de tinción azul para potenciar la señal de DAB. Se examinaron los siguientes parámetros: titulación de anticuerpo; tiempo de incubación de anticuerpo primario y temperatura; condiciones de recuperación de antígeno y diluyente de anticuerpo.

Se realizó una serie de titulación para optimizar la concentración de anticuerpo primario. Se diluyó cada anticuerpo primario a diversas concentraciones (de 0,6 a 60 µg/ml para el anticuerpo de Sigma Prestige; de 0,1 a 5 µg/ml para el anticuerpo de Santa Cruz; de 0,4 a 16 µg/ml para el anticuerpo de IBL; y de 0,1 a 100 µg/ml para el anticuerpo frente a GIV generado en el ejemplo 1, SP173) usando diluyente de anticuerpo de VMSI (número de catálogo 95119) y se aplicó en un volumen de 85 µl en tejido de hígado y de cáncer colorrectal. El anticuerpo frente a GIV de Sigma Prestige mostró tinción negativa a todas las concentraciones sometidas a prueba. Como resultado, se excluyó este anticuerpo del análisis adicional.

Tras seleccionar un título inicial para anticuerpos de Santa Cruz (0,67 µg/ml), IBL (8 µg/ml) y SP173 (10 µg/ml), se optimizaron las condiciones de recuperación de antígeno y se examinaron los diluyentes de anticuerpo primario. Se sometieron a prueba los siguientes diluyentes: diluyente de anticuerpo de VMSI, números de catálogo 95119; 95028; 90039; 90040; y 90103. Se usaron casos de hígado normal y graso para servir como evaluación de especificidad para la optimización mediante IHC de GIV.

El diluyente óptimo para el anticuerpo de Santa Cruz fue 95119, 90039 para IBL (8 µg/ml), y 90040 para el anticuerpo frente a GIV SP173. Las condiciones de tratamiento previo óptimas fueron de 64 minutos de incubación a 95°C en reactivo de acondicionamiento de células CC1 (un tampón de acondicionamiento de células basado en Tris más suave) para los anticuerpos de Santa Cruz e IBL, y 48 minutos de incubación a 95°C en reactivo de acondicionamiento de células CC1 para el anticuerpo frente a GIV SP173. La cantidad óptima de tiempo de incubación en el anticuerpo primario fue de 16 minutos a 37°C para los anticuerpos de Santa Cruz e IBL, y de 12 minutos a 37°C para el anticuerpo frente a GIV SP173.

### Ejemplo 3

Tinción de muestras de hígado normal con anticuerpos frente a GIV

Se usaron las condiciones de ensayo óptimas identificadas descritas en el ejemplo 2 para cada anticuerpo frente a GIV en muestras de hígado de control, concretamente anticuerpo frente a GIV Santa Cruz 0,67 µg/ml en 95119, anticuerpo frente a GIV (IBL) 8 µg/ml en diluyente 90039 y Ac frente a GIV SP173 10 µg/ml en un diluyente 90040, para teñir muestras de hígado usando IHC.

Basándose en el nivel de ARNm de GIV anteriormente determinado en el hígado, los hepatocitos tenían que seguir siendo negativos pero todas las células inflamatorias (macrófagos de Kuppfer, células estrelladas) tenían que mostrar tinción positiva en los espacios sinusoidales. Se evaluó la inmunotinción de GIV por un patólogo. Dos clones de anticuerpo frente a GIV (IBL y el anticuerpo SP173 del ejemplo 1) satisficieron estos criterios. Ambos anticuerpos detectaron células sinusoides y estrelladas en muestras de hígado normal y graso con una intensidad de señal muy similar. Ninguno de los anticuerpos dio como resultado tinción en hepatocitos (control negativo) ni en ninguna muestra de hígado cirrótico. El anticuerpo IBL tiñó algunos vasos sanguíneos, por lo demás la tinción fue negativa. Por tanto, la IHC con el anticuerpo de IBL y el anticuerpo SP173 del ejemplo 1 mostró sinusoides positivos con tinción principalmente citoplasmática en células distintas de hepatocitos y fue completamente negativa en hepatocitos. Algunas células normales (conductos biliares) presentaron tinción nuclear. En cambio, el anticuerpo frente a GIV de Santa Cruz dio como resultado tinción negativa en células distintas de hepatocitos y rubor focal en hepatocitos, por tanto se excluyó este anticuerpo del análisis adicional.

### Ejemplo 4

Tinción de muestras de hígado y cáncer colorrectal con anticuerpos frente a GIV

Se tiñó un conjunto de 36 casos de hígado de pacientes normal, con hígado graso y con cirrosis (cohorte de hígado)

con los procedimientos de tinción optimizados (ejemplo 2) para servir como evaluación de especificidad para la IHC de GIV optimizada. Se tiñeron las muestras con el ensayo de IHC con anticuerpo frente a GIV SP173 optimizado del ejemplo 1 (tabla 1) y con el ensayo de IHC con anticuerpo frente a GIV-IBL (tabla 2).

5

Tabla 1: ensayo de IHC con anticuerpo SP173

- 1 Parafina [seleccionado]
- 2 Desparafinización [seleccionado]
- 3 Acondicionamiento de células [seleccionado]
- 4 CC1 [seleccionado]
- 5 CC1, 8 min [seleccionado]
- 6 CC1, 16 min [seleccionado]
- 7 CC1, 24 min [seleccionado]
- 8 CC1, 32 min [seleccionado]
- 9 CC1, 40 min [seleccionado]
- 10 CC1, 46 min [seleccionado]
- 11 Inhibición de peroxidasa primaria previa [seleccionado]
- 12 Anticuerpo primario [seleccionado]
- 13 Temperatura de anticuerpo primario [seleccionado]
- 14 Calentar portaobjetos hasta temperaturas de incubación de Ac [anticuerpo primario]
- 15 Aplicar cubreobjetos, una gota de [anticuerpo 10] (anticuerpo) e incubar durante [0 h 12 min]
- 16 Contratinción [seleccionado]
- 17 Aplicar una gota de [hematoxilina II] (contratinción), aplicar cubreobjetos e incubar durante [4 minutos]
- 18 Contratinción posterior [seleccionado]
- 19 Aplicar una gota de [reactivo de tinción azul] (contratinción posterior), aplicar cubreobjetos e incubar durante [4 minutos]

Tabla 2: Ensayo de IHC con anticuerpo de IBL

- 1 Parafina [seleccionado]
- 2 Desparafinización [seleccionado]
- 3 Acondicionamiento de células [seleccionado]
- 4 CC1 [seleccionado]
- 5 CC1, 8 min [seleccionado]
- 6 CC1, 16 min [seleccionado]
- 7 CC1, 24 min [seleccionado]
- 8 CC1, 32 min [seleccionado]
- 9 CC1, 40 min [seleccionado]
- 10 CC1, 48 min [seleccionado]
- 11 CC1, 56 min [seleccionado]
- 12 CC1, 64 min [seleccionado]
- 13 Inhibición de peroxidasa primaria previa [seleccionado]
- 14 Anticuerpo primario [seleccionado]
- 15 Temperatura de anticuerpo primario [seleccionado]
- 16 Calentar portaobjetos hasta temperaturas de incubación de Ac [anticuerpo primario]
- 17 Aplicar cubreobjetos, una gota de [anticuerpo 8] (anticuerpo) e incubar durante [0 h 16 min]
- 18 Contratinción [seleccionado]

- 19 Aplicar una gota de [hematoxilina] (contratinción). Aplicar cubreobjetos e incubar durante [4 minutos]
- 20 Contratinción posterior [seleccionado]
- 21 Aplicar una gota de [reactivo de tinción azul] (contratinción posterior). Aplicar cubreobjetos e incubar durante [4 minutos]

Ambos anticuerpos, frente a GIV-IBL y Ac frente a GIV SP173, detectaron proteína GIV en todas las muestras de hígado con fibrosis de moderada a intensa mientras que GIV siguió siendo indetectable en hígados normales. Entre los pacientes con hepatitis C, la tinción con los dos anticuerpos no mostró mucha correlación con las puntuaciones de inflamación, o con esteatosis hepática, pero sí mostró la correlación anteriormente observada con su puntuación de intensidad de fibrosis.

Para someter a prueba la capacidad de pronóstico de la IHC de GIV, se tiñó una cohorte de 10 pacientes con CRC (tabla 3) con los mismos procedimientos de tinción optimizados y se puntuaron por un patólogo.

Tabla 3. Resultado de IHC de GIV en la cohorte de CRC

ID de caso	GIV-IBL	GIV-Spring	Supervivencia global	Desenlace de paciente
9838872	negativo	negativo	0,8	desconocido
9610517	negativo	negativo	14,35	vivo
973446	negativo	negativo	13,47	vivo
012982A5	negativo	negativo	8,93	choque séptico, insuficiencia respiratoria
012768A7	negativo	negativo	8,98	hemorragia GI masiva
96118110	negativo	positivo	14,33	pérdida en el seguimiento
071207A8	negativo	positivo	N/A	septicemia, colangitis
012688A5	negativo	positivo	2,93	metástasis a hígado/pulmón
9835799	negativo	positivo	11,57	vivo
981154	negativo	positivo	2,78	metástasis a hígado, pulmón, suprarrenal

Aunque el anticuerpo de IBL y el anticuerpo SP173 tenían la misma especificidad en casos de hígado, la sensibilidad y especificidad de estos anticuerpos fueron diferentes en el tejido colorrectal. El anticuerpo frente a GIV SP173 fue más sensible y dio como resultado una tinción más fuerte que el anticuerpo de IBL, pero también tuvo algo de tinción no específica en colon normal (posiblemente depósitos cromogénicos) (figura 2A). Sin embargo, esta tinción no específica no tuvo ningún efecto sobre la tinción tumoral; la tinción del área de tumor siguió siendo muy específica (figura 2B). La IHC de GIV con el anticuerpo frente a GIV SP173 identificó a 5 pacientes positivos para GIV y 2 de ellos presentaron recidiva. La IHC de GIV con anticuerpo de IBL dio como resultado una fuerte tinción positiva en células estromales pero una tinción débil, principalmente negativa, en el citoplasma de las células tumorales (figura 2B). Estos resultados demuestran que el anticuerpo frente a GIV SP173 es más sensible ya que pudo detectar todos los casos de cáncer colorrectal con recidiva. Por tanto, se eligió este anticuerpo para su análisis adicional.

Ejemplo 5

Tinción de muestras de cáncer y tejidos de ratón deficiente para GIV con anticuerpos frente a GIV

Este ejemplo describe métodos usados para optimizar adicionalmente la tinción de IHC de GIV.

Se usó el ensayo de IHC de GIV usando el anticuerpo monoclonal de conejo anti-GIV SP173 (véase el ejemplo 2). Las condiciones de tinción nominal para el dispositivo de tinción automatizado BenchMark XT (VMSI) se indican en la tabla 4. La concentración de anticuerpo primario usada fue de 10 µg/ml en diluyente 90040. La contratinción se logró incubando portaobjetos con hematoxilina II y reactivo de tinción azul para potenciar la señal de DAB. Usando la formulación de anticuerpo primario optimizada junto con las condiciones establecidas en tejido de hígado, se tiñeron de manera positiva las células distintas de hepatocitos (sinusoides, células estrelladas) mientras que los hepatocitos siguieron siendo negativos.

Tabla 4. Condiciones de ensayo para IHC de GIV

Procedimiento	XT OptiView DAB IHC
Antígeno	Proteína GIV de longitud completa
Tipo de muestra	Casos de cáncer colorrectal (sección de 4 µm)
Parafina	Seleccionado
Desparafinización	Seleccionado
Acondicionamiento de células	CC1, 48 min

Inhibición de peroxidasa primaria previa	Seleccionado
Temp. de Ac primario	Seleccionado, 37°C
Incubación de Ac primario	12 min
Amplificación	No seleccionado
Contratinción	Hematoxilina II, 4 min
	Reactivo de tinción azul, 4 min

Se usaron líneas de células cancerosas indicadas (la expresión de proteína GIV-fl se determinó previamente mediante RT-PCR) para someter a prueba la especificidad y sensibilidad del ensayo de IHC de GIV:

- 5 • DLD1, de colon invasivo: ARNm y/o proteína de GIV-fl detectable,
- HT29, de colon poco invasivo: ARNm y/o proteína de GIV-fl no detectable,
- 10 • Ls174T, de colon poco invasivo: ARNm y/o proteína de GIV-fl no detectable,
- MDA MB231, de mama invasivo: ARNm y/o proteína de GIV-fl detectable,
- MCF7, de mama no invasivo: ARNm y/o proteína de GIV-fl no detectable.

15 Según los datos publicados, las líneas celulares altamente invasivas tienen 20-50 veces más nivel de proteína GIV de longitud completa que sus homólogos no invasivos. Las células no invasivas contienen principalmente la proteína GIV truncada C-terminal (creada mediante corte y empalme alternativo del ARNm de longitud completa), por tanto estas líneas celulares no deben demostrar mucha reactividad con anticuerpo frente a GIV (fl) preparado frente al extremo C-terminal (SP173, véase el ejemplo 1). Se aplicó el ensayo de IHC de GIV descrito anteriormente en estas  
20 líneas celulares. Se evaluaron los portaobjetos teñidos por un patólogo.

De manera compatible con los datos publicados, el ensayo de IHC de GIV dio como resultado tinción positiva en líneas celulares MDA MB231 de mama invasiva y DLD1 de colon mientras que las líneas celulares no invasivas o poco invasivas fueron principalmente negativas para la proteína GIV de longitud completa (figura 2C). No se observó  
25 ninguna diferencia de la expresión de GIV-fl de células en estado estacionario, privadas de alimentos o estimuladas por EGF mediante IHC.

Se evaluó el ensayo de IHC de GIV en órganos de ratón deficientes para GIV disecados. Aunque muestras heterocigóticas y homocigóticas mostraron tinción de GIV reducida en comparación con el tipo natural, el  
30 agotamiento completo de proteína GIV no se detectó mediante IHC. Con el fin de hacer coincidir el estado homo (-/-) o heterocigótico (-/+) para girdina, se redujo la concentración de anticuerpo primario desde 10 hasta 5; 2,5 y 1 µg/ml. Los órganos de ratones deficientes mostraron tinción positiva incluso a una concentración de Ac frente a GIV de 1 µg/ml.

35 Dado que era poco probable que se produjera el agotamiento completo de GIV en ratones mutantes, se usaron las líneas celulares de control indicadas y muestras de hígado normal para finalizar la concentración de anticuerpo frente a GIV. Se repitió el ensayo de IHC de GIV con las condiciones óptimas pero usando 5, 2,5 y 1 µg/ml de anticuerpo primario. Aunque la línea de células de cáncer de mama siguió siendo positiva incluso a 1 µg/ml de anticuerpo primario, se observó o bien una señal significativamente reducida o bien una pérdida completa de señal  
40 en hígado normal y línea celular de colon invasiva a 5 µg/ml de anticuerpo (figuras 3A-3C).

También se sometió a prueba la tinción de GIV con una concentración de anticuerpo inferior en la cohorte de 10 pacientes con CRC (tabla 3) (desenlace mejor y peor). Dado que un título de GIV de 5 µg/ml no cambió el estado de GIV en casos de colon (figuras 4A-4B) más bien disminuyó la tinción de fondo no necesaria, por tanto se  
45 estableció la concentración de anticuerpo frente a GIV final a 7,5 µg/ml.

#### Ejemplo 6 (profético)

Evaluación del nivel de expresión génica de GIV-fl mediante qRT-PCR

50 Se usan en este experimento muestras de pacientes con CRC. Se aísla ARN a partir de tejido reciente o congelado o FFPE usando, por ejemplo, el protocolo descrito en Molecular Cloning. A Laboratory Manual de T Maniatis, E F Fritsch y J Sambrook, Cold Spring Harbor Laboratory, Nueva York. 1982, o la patente estadounidense n.º 6.248.535 respectivamente.

55 En este ejemplo, la amplificación de la diana de GIV-fl usa un cebador directo, un cebador inverso y la sonda de detección específica para el ARNm de GIV-fl. Uno de los cebadores es específico para el último exón codificante del gen de GIV. Una reacción en paralelo usa un cebador directo, un cebador inverso y la sonda de detección específica

para el gen de mantenimiento GADPH. Una mezcla de reacción a modo de ejemplo comprende 0,075-0,2  $\mu\text{M}$  de cada uno del cebador directo, el cebador inverso y la sonda de detección, nucleósido trifosfatos,  $\text{MgCl}_2$  3 mM, tricina 50 mM pH 8,0, acetato de potasio 55 mM, 160-200  $\mu\text{M}$  de cada uno de dATP, dCTP y dGTP, dTTP 160  $\mu\text{M}$  (u opcionalmente dUTP 320  $\mu\text{M}$  y uracil-N-glicosilasa 0,2 U/ $\mu\text{l}$ ), ADN polimerasa termoestable con actividad transcriptasa inversa, EDTA 0,1 mM, DMSO al 1,25%-2%, acetato de magnesio 2,5 mM y ADN diana (molde). Se realizaron la amplificación y el análisis usando el instrumento Roche LightCycler® 480 (Roche Applied Science, Indianápolis, Ind.). Un perfil de temperatura a modo de ejemplo es: 50°C 5 minutos; 2 ciclos de 95°C (10 segundos) a 55-65°C (30 segundos) seguido por realización de ciclos desde 93°C (10 segundos) hasta 55-65°C (30 segundos) 40-60 veces, 1 ciclo de enfriamiento hasta 37°C (10 segundos), y 1 ciclo de enfriamiento hasta 25°C (10 segundos). Se recopilan datos de fluorescencia al comienzo de cada etapa de 55-65°C y se determinan valores de  $C_t$  para la reacción que amplifica el ARNm de GIV-fl diana y el ARNm de GADPH de control en cada muestra. Se mide la expresión relativa del gen de GIV-fl como la diferencia entre los valores de  $C_t$  de los genes de diana y de control.

#### Ejemplo 7

##### Validación de ensayo en cáncer colorrectal (CRC)

Este ejemplo describe métodos usados para validar de manera analítica la expresión de GIV mediante inmunohistoquímica (IHC) en una gran cohorte de muestras de CRC de estadio II con desenlaces clínicos conocidos.

Se usó un conjunto de 192 casos de cáncer colorrectal de estadio II para validar la expresión de GIV como biomarcador predictivo para predecir adicionalmente la recidiva/pronóstico del tumor para CRC competente para MMR (pMMR) de estadio II. Se tiñeron las muestras con el ensayo de inmunohistoquímica de GIV optimizado (tabla 1). Para la tinción negativa, se usó Ig de control negativo monoclonal de conejo como anticuerpo primario (VMSI, n.º de catálogo 790-4795; tabla 5).

Tabla 5: Inmunoensayo de Ig de control negativo monoclonal de conejo

- 1 Parafina [seleccionado]
- 2 Desparafinización [seleccionado]
- 3 Acondicionamiento de células [seleccionado]
- 4 CC1 [seleccionado]
- 5 CC1, 8 min [seleccionado]
- 6 CC1, 16 min [seleccionado]
- 7 CC1, 24 min [seleccionado]
- 8 CC1, 32 min [seleccionado]
- 9 CC1, 40 min [seleccionado]
- 10 CC1, 46 min [seleccionado]
- 11 CC1, 56 min [seleccionado]
- 12 CC1, 64 min [seleccionado]
- 13 Inhibición de peroxidasa primaria previa [seleccionado]
- 14 Anticuerpo primario [seleccionado]
- 15 Temperatura de anticuerpo primario [seleccionado]
- 16 Calentar portaobjetos hasta temperatura de incubación de Ac [anticuerpo primario]
- 17 Aplicar cubreobjetos, una gota de [anticuerpo 30] (anticuerpo) e incubar durante [0 h 16 min]
- 18 Contratinción [seleccionado]
- 19 Aplicar una gota de [hematoxilina II] (contratinción). Aplicar cubreobjetos e incubar durante [4 minutos]
- 20 Contratinción posterior [seleccionado]
- 21 Aplicar una gota de [reactivo de tinción azul] (contratinción posterior). Aplicar cubreobjetos e incubar durante [4 minutos]

Se puntuaron los portaobjetos teñidos para determinar la intensidad de señal predominante y para determinar el porcentaje de tinción positiva de células tumorales (tabla 6).

ES 2 713 240 T3

Tabla 6. Resultados de IHC de GIV en las 192 muestras de CRC de estadio II

ID de caso	H&E (tumor presente: sí/no)	Control negativo	Intensidad de señal predominante/Gestalt (0-3+)	% positivo	Tinción nuclear presente (sí/no)
00A1026-1C	Sí	Aceptable	2+	35	No
00A6122-I	Sí	Aceptable	1+	15	No
01A1336-1C	Sí	Aceptable	1+	10	No
02A5647-1I	Sí	Aceptable	1+	10	No
04A14059-3B	sí	Aceptable	0	0	No
04A15855-1B	Sí	Aceptable	2+	50	No
04A20697-1D	Sí	Aceptable	1+	4	No
05A10353-D	Sí	Aceptable	1+	1	No
05A11669-B	Sí	Aceptable	1+	10	Sí
05A12666-1C	Sí	Aceptable	2+	60	No
05A13217-B	Sí	Aceptable	2+	85	No
05A14795-A	Sí	Aceptable	1+	10	No
05A16650-1E	Sí	Aceptable	2+	10	No
05A17166-2D	Sí	Aceptable	1+	50	No
05A19460-D	Sí	Aceptable	1+	20	No
05A21057-D	Sí	Aceptable	2+	30	No
05A21534-A	Sí	Aceptable	2+	85	No
05A2963-1E	Sí	Aceptable	2+	35	No
06A12643-F	Sí	Aceptable	1+	5	No
06A13463-L	Sí	Aceptable	1+	40	No
06A14696-2B	Sí	Aceptable	1+	<1	No
06A15628-E	Sí	Aceptable	2+	2	No
06A16584-A	Sí	Aceptable	1+	10	Sí
06A17444-1E	Sí	Aceptable	2+	10	No
06A18488-E	Sí	Aceptable	1+	40	No
06A18930-1A	Sí	Aceptable	2+	35	Sí
06A20990-1C	Sí	Aceptable	1+	3	No
06A21078-A	Sí	Aceptable	2+	5	No
06A21661-D	Sí	Aceptable	2+	7	No
06A22137-1B	Sí	Aceptable	1+	8	No
07A20580-C	Sí	Aceptable	1+	65	No
07A21258-B	Sí	Aceptable	1+	35	No
07A22295-1D	Sí	Aceptable	0	0	No
07A25123-C	Sí	Aceptable	2+	6	No
07A25327-1G	Sí	Aceptable	1+	4	No
07A25823-C	Sí	Aceptable	1+	4	No
07A26280-B	Sí	Aceptable	3+	60	Sí (3+; 90%)
07A27529-1B	Sí	Aceptable	2+	80	No
07A27620-B	Sí	Aceptable	0	0	No
07A28429-C	Sí	Aceptable	1+	90	No
07A29535-C	Sí	Aceptable	1+	5	No
07A30498-1D	Sí	Aceptable	1+	45	No
07A31038-F	Sí	Aceptable	2+	60	No
07A32490-C	Sí	Aceptable	1+	7	No
08A10093-C	Sí	Aceptable	2+	3	No
08A21989-C	Sí	Aceptable	1+	90	No
08A23446-1D	Sí	Aceptable	1+	80	No
08A24383-F	Sí	Aceptable	1+	80	No
08A26142-B	Sí	Aceptable	0	0	No
09A619-D	Sí	Aceptable	0	0	No
02A0517-1C	Sí	Aceptable	1+	10	No
02A18759-C	Sí	Aceptable	1+	95	No
02A3045-1C	Sí	Aceptable	2+	20	No
04A12674-B	Sí	Aceptable	0	0	No
06A2249-1N	Sí	Aceptable	2+	5	No
06A3482-1D	Sí	Aceptable	2+	8	No
06A3578-1G	Sí	Aceptable	0	0	No

ES 2 713 240 T3

06A4157-1C	Sí	Aceptable	1+	60	No
06A5014-A	Sí	Aceptable	2+	2	No
06A6684-1D	Sí	Aceptable	1+	2	No
06A7316-1C	Sí	Aceptable	1+	35	No
06A7985-1D	Sí	Aceptable	1+	25	No
06A9173-B	Sí	Aceptable	1+	20	No
06A9592-1M	Sí	Aceptable	0	0	No
07A10014-1E	Sí	Aceptable	1+	7	No
07A1016-1E	Sí	Aceptable	1+	2	Sí
07A10357-A	Sí	Aceptable	1+	55	No
07A1523-1E	Sí	Aceptable	1+	8	No
07A2051-D	Sí	Aceptable	1+	8	No
07A2577-D	Sí	Aceptable	1+	20	No
07A27758-C	Sí	Aceptable	1+	50	No
07A3796-1D	Sí	Aceptable	2+	20	No
07A4252-C	Sí	Aceptable	1+	75	No
07A6444-1B	Sí	Aceptable	2+	25	No
07A6924-1C	Sí	Aceptable	1+	20	No
07A8451-B	Sí	Aceptable	1+	5	No
07A8691-C	Sí	Aceptable	1+	4	No
07A9065-B	Sí	Aceptable	0	0	No
07A9116-C	Sí	Aceptable	2+	6	No
07A9194-E	Sí	Aceptable	1+	5	No
07A921-1C	Sí	Aceptable	1+	4	Sí
08A1198-B	Sí	Aceptable	2+	35	No
08A1577-C	Sí	Aceptable	2+	10	No
08A3217-D	Sí	Aceptable	1+	5	No
08A3404-D	Sí	Aceptable	2+	35	No
08A3746-C	Sí	Aceptable	2+	1	No
08A4872-D	Sí	Aceptable	1+	99	No
08A498-C	Sí	Aceptable	0	0	No
08A5142-C	Sí	Aceptable	1+	30	No
08A5453-B	Sí	Aceptable	1+	5	No
08A6122-D	Sí	Aceptable	1+	40	No
08A7715-1C	Sí	Aceptable	1+	35	No
08A822-B	Sí	Aceptable	2+	35	Sí
08A8610-E	Sí	Aceptable	0	0	No
08A9631-1F	Sí	Aceptable	2+	10	No
08A9717-C	Sí	Aceptable	1+	6	Sí
09A155-C	Sí	Aceptable	2+	2	No
09A96-E	Sí	Aceptable	2+	2	No
10A23348-E	Sí	Aceptable	1+	3	No
11A29407-1D	Sí	Aceptable	0	0	Sí (3+; 75%)
00A3119-E	Sí	Aceptable	1+	90	No
01A17541-B	Sí	Aceptable	2+	20	No
02A3063-1D	Sí	Aceptable	1+	<1	No
02A7072-3M	Sí	Aceptable	1+	4	No
03A3541-1D	Sí	Aceptable	2+	10	No
03A3673-1B	Sí	Aceptable	2+	40	No
03A4545-1C	Sí	Aceptable	1+	20	No
03A7890-1F	Sí	Aceptable	2+	80	No
03A14704-1C	Sí	Aceptable	1+	5	No
04A2285-1B	Sí	Aceptable	0	0	No
04A5521-1A	Sí	Aceptable	0	0	No
05A2500-1F	Sí	Aceptable	1+	1	No
05A13714-D	Sí	Aceptable	1+	70	Sí (2+)
05A19183-B	Sí	Aceptable	2+	40	No
05A19886-1E	Sí	Aceptable	1+	45	Sí
06A1251-E	Sí	Aceptable	0	0	No
06A1299-1C	Sí	Aceptable	1+	90	No
06A1518-1E	Sí	Aceptable	0	0	No
06A2200-1D	Sí	Aceptable	0	0	No
06A2603-1D	Sí	Aceptable	1+	3	No

ES 2 713 240 T3

06A2792-1F	Sí	Aceptable	0	0	No
06A3182-E	Sí	Aceptable	2+	35	No
06A9658-1D	Sí	Aceptable	1+	5	No
06A10044-2B	Sí	Aceptable	0	0	Sí (3+; 20%)
06A10707-D	Sí	Aceptable	1+	6	No
06A12718-F	Sí	Aceptable	0	0	No
06A13059-1E	Sí	Aceptable	1+	50	Sí
06A18530-1B	Sí	Aceptable	3+	25	Sí
06A19265-C	Sí	Aceptable	1+	45	Sí
06A19803-1E	Sí	Aceptable	2+	55	Sí
06A20116-B	Sí	Aceptable	1+	5	No
07A1514-1D	Sí	Aceptable	0	0	No
07A10191-1C	Sí	Aceptable	1+	10	No
07A21005-E	Sí	Aceptable	2+	75	No
07A22217-B	Sí	Aceptable	1+	10	No
07A24787-D	Sí	Aceptable	1+	15	No
07A26453-B	Sí	Aceptable	0	0	No
07A26589-C	Sí	Aceptable	1+	7	No
07A29013-B	Sí	Aceptable	1+	60	Sí
07A33075-E	Sí	Aceptable	1+	40	Sí (60%)
08A20458-D	Sí	Aceptable	1+	35	No
08A26455-E	Sí	Aceptable	2+	40	Sí
08A28427-E	Sí	Aceptable	1+	25	Sí (4+)
09A883-C	Sí	Aceptable	2+	10	No
09A1181-1D	Sí	Aceptable	1+	1	No
09A1215-E	Sí	Aceptable	0	0	No
09A3356-C	Sí	Aceptable	1+	25	No
09A3848-C	Sí	Aceptable	2+	40	Sí
10A22093-E	Sí	Aceptable	2+	70	Sí
6A110044-1C	Sí	Aceptable	2+	40	No
00-16804-B	Sí	Aceptable	2+	35	Sí
00-20289-C	Sí	Aceptable	1+	20	No
01-104530-C	Sí	Aceptable	1+	10	No
01-15728-D	Sí	Aceptable	1+	35	No
00A2038-D	Sí	Aceptable	2+	25	No
01A3315-1B	Sí	Aceptable	1+	7	No
01A4630-1B	Sí	Aceptable	2+	30	No
02A6377-1F	Sí	Aceptable	2+	40	No
02A11503-B	Sí	Aceptable	1+	4	No
02A17602-E	Sí	Aceptable	0	0	No
03A2250-1D	Sí	Aceptable	2+	10	No
03A2334-1E	Sí	Aceptable	1+	20	No
03A4041-1C	Sí	Aceptable	2+	5	No
03A14751-E	Sí	Aceptable	2+	25	No
04A7560-1A	Sí	Aceptable	1+	60	No
04A13501-C	Sí	Aceptable	1+	7	No
05A1060-1G	Sí	Aceptable	3+	94	No
05A1891-1B	Sí	Aceptable	2+	7	Sí
05A2558-1E	Sí	Aceptable	3+	80	No
05A4276-1	Sí	Aceptable	1+	25	No
05A4629-1C	Sí	Aceptable	1+	3	No
05A5756-1E	Sí	Aceptable	0	0	Sí
05A6341-E	Sí	Aceptable	2+	65	No
05A6414-E	Sí	Aceptable	1+	50	No
05A7548-1D	Sí	Aceptable	2+	35	No
05A7834-1D	Sí	Aceptable	2+	60	No
05A17127-A	Sí	Aceptable	1+	2	No
05A19004-1E	Sí	Aceptable	1+	1	Sí
06A165-1G	Sí	Aceptable	3+	5	No
06A177-1D	Sí	Aceptable	0	0	No
06A14020-E	Sí	Aceptable	1+	5	No
06A18238-A	Sí	Aceptable	2+	15	No
06A18241-D	Sí	Aceptable	1+	40	No

07A0882-1F	Sí	Aceptable	1+	35	No
07A7276-E	Sí	Aceptable	1+	4	No
07A7601-B	Sí	Aceptable	2+	1	No
07A10206-1C	Sí	Aceptable	2+	2	No
07A25413-E	Sí	Aceptable	1+	10	No
07A27032-1B	Sí	Aceptable	0	0	No
07A29654-C	Sí	Aceptable	1+	35	Sí
08A26322-E	Sí	Aceptable	2+	15	No
11A25489-D	Sí	Aceptable	1+	60	Sí (2+; 55%)

Tal como se muestra en la tabla 6, pudo evaluarse IHC de GIV en todos los casos de cáncer colorrectal. Los tejidos estromales presentaron sistemáticamente tinción fuertemente positiva, mientras que los epitelios tumorales mostraron un patrón de tinción variable (tinción citoplasmática y/o nuclear) con intensidad de tinción y porcentaje de células tumorales positivas variables. Las figuras 5A-5D muestran ejemplos de tinción de IHC de GIV en cánceres colorrectales humanos.

Ejemplo 8

10 Desarrollo de algoritmo de puntuación de GIV-fl

Este ejemplo describe métodos usados para desarrollar un algoritmo de puntuación para la tinción de IHC de GIV, basándose en los datos descritos en el ejemplo 6 para las 192 muestras de CRC.

- 15 Se usaron datos de IHC de GIV para desarrollar un algoritmo de puntuación. Se evaluaron once métricas de puntuación que incorporaban la intensidad de la tinción y el grado de tinción positiva por separado o en combinación (tabla 7). Siete de estas requirieron una agrupación de porcentaje de tinción en cuatro categorías y después se les asignó un número de rango (0-3) que o bien se sumó a o bien se multiplicó por la intensidad de tinción. Después se basó el estado de GIV positivo y negativo en puntos de corte de estos productos de suma. Las cuatro métricas restantes se desarrollaron basándose o bien sólo en la intensidad de tinción o bien sólo en el porcentaje de tinción y después se usaron dos tipos diferentes de puntos de corte para cada una de estas métricas para definir el estado de GIV positivo y negativo.

Tabla 7. Visualiza métricas y explicaciones de métodos candidatos para puntuar la expresión de GIV, evaluados en cuanto a capacidad para distinguir entre pacientes que es probable que experimenten una recidiva. Se evaluaron un total de 11 sistemas de puntuación (5 algoritmos de puntuación, cada uno con múltiples puntos de corte para carácter positivo) en este análisis.

Marcador (nombres de variables)	Intensidad de tinción	Porcentaje de tratamiento de tinción positiva	Método de composición	Definiciones de negativo / positivo
Algoritmos de puntuación sólo de intensidad de GIV	Intervalo: [0, 1, 2, 3]	-	-	0 / 1-3 0-1 / 2-3
Algoritmos de puntuación compuestos de GIV	Intervalo: [0, 1, 2, 3]	<u>Método de agrupación n.º</u> 1: [0, 1, 2, 3] 0: 0%-10% 1: 11%-25% 2: 26%-50% 3: 51%-100%	SUMA (+) Intervalo: [0, 1, 2, 3, 4, 5, 6]	0-2 / 3-6 0-3 / 4-6
	Intervalo: [0, 1, 2, 3]	<u>Método de agrupación n.º</u> 2: [0, 1, 2, 3] 0: 0%-10% 1: 11%-35% 2: 36%-50% 3: 51%-100%	SUMA (+) Intervalo: [0, 1, 2, 3, 4, 5, 6]	0-2 / 3-6 0-3 / 4-6 0-4 / 5-6
	Intervalo: [0, 1, 2, 3]	<u>Método de agrupación n.º</u> 2 (véase anteriormente)	PRODUCTO (*) Intervalo: [0, 1, 2, 3, 4, 6, 9]	0-3 / 4, 6, 9 0-4 / 6, 9
Algoritmos de puntuación sólo de porcentaje de GIV	Intervalo: [0%-100%]	<u>Dicotomizado:</u> Mediana como punto de corte, Q3 como punto de corte	-	0%-10% / 11%+ 0%-35% / 36%+

- 25 En un contexto estadístico, se demuestra la asociación mediante la diferencia del desenlace para pacientes con marcador positivo y marcador negativo. Esto se estableció examinando la separación de curvas de supervivencia entre pacientes positivos para GIV-fl y negativos para GIV-fl. Esto es diferente de la predicción estadística; en general, la asociación es una indicación necesaria, pero no suficiente, para un valor predictivo (Pepe *et al.*, Am J

Epidemiol 159:882-90, 2004).

Aunque todas las métricas de puntuación mostraron una fuerte correlación entre la expresión de GIV y la progresión, sólo la puntuación de grado e intensidad de GIV-fl (en negrita y subrayado en la tabla 7) demostraron una asociación estadísticamente significativa (valor de  $p = 0,0212$ ) con el desenlace de tiempo hasta la progresión en pacientes pMMR, que no habían recibido previamente quimioterapia (figura 6). La figura 6 muestra la separación que se logra estratificando por estado de GIV-fl en la población pMMR de muestras de CRC de estadio II usando el sistema de puntuación de la puntuación de grado e intensidad de GIV-fl. Las líneas desde arriba hacia abajo muestran empeoramiento del pronóstico, es decir, menos probabilidad de supervivencia a lo largo del tiempo. La línea superior muestra muestras dMMR, mientras que la inferior muestra muestras positivas para GIV y pMMR. La curva de supervivencia para la población pMMR se muestra con fines comparativos. El valor de  $p$  para esta prueba de rangos logarítmicos es de  $0,0212$ , lo cual demuestra la separación estadística en las experiencias de supervivencia entre los grupos positivo y negativo para GIV-fl. Esto establece que GIV-fl puede proporcionar un valor predictivo.

Por tanto, en algunos ejemplos, se evalúa la tinción de GIV-fl en una muestra de cáncer de colon de estadio II (tal como estadio IIa) que es pMMR, determinando en primer lugar un grado de tinción de GIV-fl positiva para la muestra en una escala de 0 a 3, en el que al grado de tinción positiva se le asigna 0 si del 0% al 10% del área total de la muestra se tiñe de manera positiva, en el que al grado de tinción positiva se le asigna 1 si el 11%-35% del área total de la muestra se tiñe de manera positiva, en el que al grado de tinción positiva se le asigna 2 si el 36%-50% del área total de la muestra se tiñe de manera positiva, y en el que al grado de tinción positiva se le asigna 3 si el 51%-100% del área total de la muestra se tiñe de manera positiva. Después se añade el valor resultante (0, 1, 2 ó 3) a la intensidad de tinción de GIV-fl para la muestra (una puntuación de intensidad de en una escala de 0 (negativa), 1 (débil), 2 (moderada) a 3 (fuerte)), para proporcionar un valor de puntuación de grado e intensidad de GIV-fl. Por tanto, si un paciente tiene un grado de tinción de GIV-fl positiva del 8% con una intensidad de tinción de GIV-fl de 2, entonces recibirá un 0 para el porcentaje de carácter positivo, el valor de puntuación de grado e intensidad de GIV-fl será de  $0 + 2 = 2$ . Si el valor de puntuación de grado e intensidad de GIV-fl es de 0-2, entonces se asigna la muestra a negativa para la tinción de GIV-fl, mientras que un valor de puntuación de grado e intensidad de GIV-fl de 3-6 se asigna a positivo para la tinción de GIV-fl. Por tanto, cada paciente o muestra es por tanto o bien positivo o bien negativo basándose en una puntuación agrupada para el porcentaje de tinción global y la intensidad global.

Se desarrolló una métrica de puntuación más sencilla que puede usarse en lugar del algoritmo para la puntuación de la puntuación de grado e intensidad de GIV-fl en la tabla 7. Este método también se basa en la tinción de la muestra usando un Ac frente a GIV-fl. En la métrica de puntuación de GIV-fl más sencilla, denominada puntuación predictiva de GIV-fl, se considera que un caso o muestra es positivo para GIV si (1) su porcentaje de tinción global es mayor del 10% para cualquier intensidad de tinción o (2) si la intensidad de tinción predominante es de 3+ con cualquier porcentaje. Por tanto, en algunos ejemplos, se evalúa la tinción de GIV-fl en una muestra de cáncer de colon pMMR de estadio II (tal como estadio IIa), puntuando la muestra como positiva para GIV-fl si el porcentaje de tinción de GIV-fl global en la muestra es mayor del 10% (con cualquier intensidad de tinción), o si la intensidad de tinción de GIV-fl predominante en la muestra es de 3+ (independientemente del grado de tinción). En cambio, si la muestra de cáncer de colon pMMR de estadio II tiene menos del 10% de tinción de GIV-fl global y tiene una intensidad de tinción de GIV-fl predominante de menos de 3+, se asigna a negativa para GIV-fl.

Tal como se muestra en las figuras 7A-7B, ambas métricas de puntuación (puntuación de grado e intensidad de GIV-fl y puntuación predictiva de GIV-fl) proporcionaron distinción sobre la supervivencia, con razones de riesgos instantáneos (HR) de 2,03 y 1,75, respectivamente.

El nuevo ensayo de IHC puede detectar proteína GIV de longitud completa (GIV-fl) en tejido fijado en formalina, incrustado en parafina. En primer lugar se evaluaron 192 casos colorrectales mediante IHC para determinar proteínas MMR y después GIV. De las 192 muestras, 102 casos fueron pacientes pMMR, que no habían recibido previamente quimioterapia, y sólo 32/102 pacientes mostraron recidiva de enfermedad (progresión = sí). Basándose en los algoritmos de puntuación optimizados, 16/32 (50%; puntuación de grado e intensidad de GIV-fl) o 18/32 (56%; puntuación predictiva de GIV-fl) pacientes con recidiva tenían un tumor positivo para GIV (tabla 8). Por tanto, si un CRC de estadio II (tal como estadio IIa) es pMMR y positivo para GIV-fl, esto indica que es más probable que el paciente experimente una progresión o recidiva, por ejemplo dentro del plazo de 12 a 96 meses, tal como dentro del plazo de 12 meses, dentro del plazo de 24 meses, dentro del plazo de 36 meses, dentro del plazo de 48 meses, dentro del plazo de 60 meses, dentro del plazo de 72 meses, dentro del plazo de 84 meses o dentro del plazo de 96 meses. La recidiva puede ser una recidiva local (volver a presentar cáncer en la misma zona) o progresión del cáncer o bien a nodos locales (estadio III) o bien a nodos distantes (estadio IV, metastásico) o bien a otros sitios (por ejemplo, hígado o pulmones).

Tabla 8: Capacidad de pronóstico de IHC de GIV en pacientes con CRC pMMR que no han recibido previamente quimioterapia usando algoritmos de puntuación de grado e intensidad de GIV-fl o de puntuación predictiva de GIV-fl

Puntuación de grado e intensidad de GIV-fl		Progresión	
		No	Sí
Tinción de GIV	Negativa	50	16

	Positiva	20	16
Puntuación predictiva de GIV-fl			
		No	Sí
Tinción de GIV	Negativa	43	14
	Positiva	27	18

Los datos demuestran que la detección de GIV mediante IHC puede usarse como biomarcador de pronóstico en la definición del riesgo individual para la recidiva en pacientes con cánceres colorrectales pMMR, de estadio II (tal como estadio IIa), no tratados anteriormente con quimioterapia adyuvante.

5

Ejemplo 9

Modelo de predicción estadística de la expresión de GIV-fl y tiempo hasta la progresión en CRC de estadio II

10 Este ejemplo describe métodos usados para evaluar otros marcadores en combinación con pMMR y expresión de GIV como indicadores de pronóstico/predictivos para pacientes con CRC de estadio II.

15 Se desarrolló un modelo estadístico a partir del subconjunto de pacientes que no habían recibido previamente quimioterapia de la cohorte descrita en el ejemplo 7. Se continuó con la puntuación predictiva de GIV-fl para el modelado predictivo estadístico. Después se evaluó este modelo estadístico aplicando el modelo de predicción estadística ajustado al subconjunto de pacientes que recibieron quimioterapia. El desarrollo del modelo de predicción estadística se emprendió en cuatro etapas: 1) establecimiento de asociación entre biomarcador y desenlace (supervivencia libre de progresión, SLP); 2) selección de modelo; 3) evaluación de capacidad predictiva estadística; y 4) demostración de capacidad predictiva a nivel individual. Por último, se determinó la validez del modelo para 20 informar sobre riesgo de pacientes individuales; así como demostrar la capacidad del modelo predictivo estadístico, incluyendo el biomarcador GIV-fl, para predecir la respuesta al tratamiento.

25 La cohorte descrita en el ejemplo 7 incluía 103 pacientes pMMR, que no habían recibido previamente quimioterapia, experimentando el 31% (32/103) de los pacientes evaluables recidiva de enfermedad. La tabla 9 describe la distribución de variables clínicas y patológicas que describen a los 103 pacientes pMMR, que no habían recibido previamente quimioterapia. Se sobremuestreó esta cohorte para la recidiva, para garantizar una caracterización apropiada del desenlace. Con fines del algoritmo de puntuación, se usaron los 103 pacientes. Para el desarrollo del modelo de predicción estadística, se limitó la población a pacientes de estadio IIa, ya que este subgrupo de 30 pacientes necesita una clasificación adicional de riesgo alto y bajo, y aclaración de decisiones sobre quimioterapia adyuvante.

Tabla 9. Características de paciente

Variable	N	Proporción con progresión
LVI		
No	75	0,27
No notificado	7	0,14
Sí	21	0,52
Edad <sup>a</sup>		
[50,9, 65,8)	26	0,27
[65,8, 71,7)	26	0,38
[71,7, 79,5)	26	0,31
[79,5, 92,4]	25	0,32
Número de nodos		
<12	27	0,33
≥12	76	0,30
Sexo		
M	46	0,37
H	57	0,26
Diferenciación tumoral		
Moderada	84	0,27
Mala	18	0,44
Buena	1	1,00
Estadio T (clase de TMN)		
3	91	0,29
4	12	0,50
Lado		
izquierdo	59	0,29
derecho	44	0,34

Global	103	0,31
ªcuartiles basados en edad expresada continuamente en el diagnóstico		

Algoritmo de puntuación

- 5 Se evaluaron once algoritmos de puntuación que incorporaban la intensidad de tinción y el porcentaje de tinción. Esto es similar a lo que se realizó en el ejemplo 7, excepto porque en el ejemplo 7 se analizaron las 192 muestras de CRC de estadio II, mientras que en este caso sólo se analizó el subconjunto de 103 pacientes que no habían recibido previamente quimioterapia que tenían estadio patológico de tumor o bien 3 o bien 4 (por ejemplo, T3/4). Algunas de estas métricas se crearon agrupando el porcentaje de tinción y la intensidad obteniendo después una puntuación (o bien multiplicativa o bien aditiva) que incluía ambas de estas medidas. Otras métricas usaron un método que optimizó el porcentaje de tinción, hallando el porcentaje de tinción asociado con el dato estadístico máximo de la prueba de rangos, lo que significa el punto al que el porcentaje de tinción alto y bajo mostró la mayor diferencia entre curvas de supervivencia (Larson y Schumacher, Biometrics, 48, 73-85, 1992).
- 10
- 15 La tabla 10 resume las métricas más robustas evaluadas y su rendimiento en la separación mediante supervivencia libre de progresión. La métrica sencilla (puntuación predictiva de GIV-fl) que incorporó un porcentaje de tinción "óptimo" (>10%) y también incluye intensidad alta (3+), puntuación predictiva de GIV-fl (véase el ejemplo 7), y es el algoritmo de puntuación con el que se continuó para el modelado predictivo estadístico. El cuarenta y cuatro por ciento (45/103) de los pacientes de estadio II (T3+T4) fueron positivos para GIV-fl; el cuarenta y siete por ciento (42/90) de los pacientes de estadio II fueron positivos para GIV-fl. La razón de riesgos instantáneos para la puntuación predictiva de GIV-fl cuando se aplicó a la población de estadio II sola fue de 2,56 (IC: 1,15, 5,87).
- 20

Tabla 10. Resumen de posibles algoritmos de puntuación, basándose en 103 casos de estadio II, pMMR, que no habían recibido previamente quimioterapia (tanto T3 como T4).

MÉTRICA DE PUNTUACIÓN	% positivo para GIV (n)	Razón de riesgos instantáneos (IC del 95%)
<i>Métricas compuestas: usan tanto la intensidad de tinción (0-3) como el porcentaje de tinción (0%-100%). Para "Chundong, et al.", "Percentil" y "Compuesto" 1-3, se usó un índice basado en porcentaje de tinción agrupado y se sumó a la intensidad de tinción. Los grupos y puntos de corte se definen debajo de cada métrica.</i>		
Puntuación predictiva de GIV-fl (>10% o 3+ intensidad)	43,69% (45)	1,92 (0,94, 3,92)
Chundong <i>et al.</i> , Anticancer Res 31: 1141-5, 2011 (0: 0%, 1: 1-25%, 2: 26-50%, 3: >50%)		
Suma con intensidad (neg: 0-3 / pos: 4-6)	26,21% (27)	1,37 (0,64, 2,91)
Percentil (0: 0-2%, 1: 3-9%, 2: 10-34%, 3: >35%)	41,75% (43)	1,56 (0,77, 3,16)
Suma con intensidad (neg: 0-3 / pos: 4-6)		
Compuesto 1 (0: 0-10%, 1: 11-25%, 2: 26-50%, 3: >50%)	38,83% (40)	1,84 (0,91, 3,73)
Suma con intensidad (neg: 0-2 / pos: 3-6)		
Compuesto 2 (esta puntuación de grado e intensidad de GIV-fl a partir de la tabla 7)		
(0: 0-10%, 1: 11-35%, 2: 36-50%, 3: >50%)	34,95% (36)	2,19 (1,08, 4,43)
Suma con intensidad (neg: 0-2 / pos: 3-6)		
Compuesto 3 (0: 0-10%, 1: 11-35%, 2: 36-50%, 3: >50%)	18,45%(19)	1,59 (0,71, 3,56)
Suma con intensidad (neg: 0-3 / pos: 4-6)		
<i>Métricas sólo de porcentaje: usando sólo el porcentaje de tinción. Los puntos de corte se definen debajo de cada métrica.</i>		
Liu <i>et al.</i> , Mol Biol Rep 39: 8717-22, 2012 (neg: 0% /pos: 1%+)	84,47% (87)	1,23 (0,43, 3,51)
Mediana del porcentaje (neg: 0%-10% / pos: 11%+)	42,72% (44)	1,73 (0,85, 3,51)
Q3 del porcentaje (neg: 0%-35% / pos: 36%+)	20,39% (21)	1,63 (0,75, 3,54)

25 Establecimiento de asociación estadística entre marcador y progresión

- 30 En un contexto estadístico, la asociación se demuestra mediante la diferencia del desenlace para pacientes positivos para marcador y negativos para marcador. Esto se estableció en el presente documento examinando la separación de curvas de supervivencia entre pacientes positivos para GIV-fl y negativos para GIV-fl. Esto es diferente de la

predicción estadística; en general, la asociación es una indicación necesaria, pero no suficiente, para un valor predictivo (Pepe, *Am J Epidemiol* 159:882-90, 2004).

5 La figura 8 muestra la separación que se logra estratificando por estado de GIV-fl en la población pMMR para los 103 pacientes que no habían recibido previamente quimioterapia usando el algoritmo de puntuación predictiva de GIV-fl. La curva de supervivencia para la población dMMR se muestra con fines comparativos. El valor de p para esta prueba de rangos logarítmicos es de 0,0209, lo cual demuestra la separación estadística en las experiencias de supervivencia entre los grupos positivo y negativo para GIV-fl. Esto demuestra que GIV-fl proporciona un valor predictivo. El cuarenta por ciento (18/45) de los pacientes positivos para GIV-fl experimentaron una recidiva; el  
10 veintiséis por ciento (14/57) de los pacientes negativos para GIV-fl presentaron recidiva.

#### Selección de variables y modelo proporcional de Cox

15 Para identificar variables, además de GIV-fl, para incluir en el modelo de predicción estadística, se determinó en primer lugar cuántos grados de libertad disponibles asignar a un modelo. Para análisis de supervivencia, generalmente puede ajustarse hasta el número de acontecimientos dividido entre 10 ó 20 sin sobreajuste. El sobreajuste se manifiesta en la predicción estadística como un rendimiento que se sobreestima, esto significaría que cuando se aplique el modelo estadístico en la práctica no funcionará tan bien como se espera. Para esta muestra particular, se esperaba poder ajustar aproximadamente 2 grados de libertad sin sobreajuste de modelo. Se  
20 identificaron las variables consideradas más importantes en el modelo estadístico usando la  $\chi^2$  parcial (ajustada para los grados de libertad que aporta cada variable). Estos datos estadísticos de prueba se basan en la comparación de la desviación, una medida estadística de la bondad de ajuste que compara la diferencia de probabilidades del modelo completo en comparación con el modelo con cada variable retirada.

25 Las variables más críticas, con respecto a describir la supervivencia libre de progresión, tienen una  $\chi^2$  parcial grande, mientras que variables menos críticas tienen valores menores. Si el tamaño de muestra es lo suficientemente grande, generalmente es mejor usar toda la información clínica y descriptiva disponible que esté disponible; sin embargo, cuando se elige entre posibles variables importantes, se prefiere elegir basándose en  $\chi^2$  parcial antes que un método de selección que se basa en métodos de selección por etapas.  
30

Tal como se muestra en la figura 9, hay una clara delimitación entre las dos primeras variables (positivo para GIV-fl e invasión linfovascular (LVI), los dos puntos arriba a la derecha), y las otras variables clínicas (los puntos a la izquierda). Esto indica que puede usarse un modelo predictivo con GIV-fl y LVI para determinar qué muestras pMMR de CRC de estadio II (tal como estadio IIa) se beneficiarán de quimioterapia o bioterapia.  
35

La tabla 11 es un resumen que visualiza resultados de los modelos de riesgos instantáneos proporcionales de Cox para una única variable, múltiples variables (incluye todos los posibles factores de predicción indicados en la tabla 11) y un modelo final tan sólo con las variables GIV-fl y LVI. Las razones de riesgos instantáneos eran compatibles (con respecto al sentido de efecto) para todos los modelos, con más LVI y niveles de GIV-fl altos asociados con probabilidad superior de recidiva. La tabla 11 se modela de una manera similar a los estudios de validación de puntuación de recidiva de 12 genes (Genomic Health, CA) usando las cohortes de estudio QUASAR y CALGB (Gray *et al.*, *J. Clin. Oncol.* 29:4611-4619, 2011; Venook *et al.*, *J. Clin. Oncol.* 31:1775-81, 2013); en cuanto al sentido la mayor parte de estas variables son similares a lo que se observa en esas cohortes. Sutiles diferencias (por ejemplo, riesgo más alto de recidiva en mujeres y tumores en el lado derecho) pueden deberse al pequeño tamaño de muestra en esta cohorte, estas variables no demostraron diferencias estadísticamente significativas en la supervivencia libre de progresión (SLP).  
40  
45

Tabla 11. Razones de riesgos instantáneos y valores de P para modelos proporcionales de Cox (pacientes pMMR que no habían recibido previamente quimioterapia, excepto cuando se indique lo contrario).											
Variable	N	Única covariable			GIV y variables clinicopatológicas			Modelo propuesto: LVI y GIV			Sentido
		HR	IC del 95%	P	HR	IC del 95%	P	HR	IC del 95%	P	
Dicotómica											
Invasión linfovascular <sup>1</sup>	85	2,62	de 1,16 a 5,92	0,0208	2,31	de 0,95 a 5,61	0,0645	2,07	de 0,90 a 4,76	0,0872	La invasión es peor
Estadio de T: T4 frente a T3 <sup>2</sup>	103	2,39	de 0,98 a 5,83	0,0553	NA			NA			El estadio de T 4 es peor
Lado de sitio	91	1,26	de 0,58 a 2,73	0,5553	1,48	de 0,60 a 3,67	0,3918	NA			El lado derecho es peor
Sexo: mujer frente a hombre	91	1,53	de 0,71 a 3,17	0,2793	1,40	de 0,58 a 3,34	0,4512	NA			Mujer es peor
Rendimiento de ganglios linfáticos: <12 frente a ≥12	91	0,77	de 0,34 a 1,73	0,5252	1,17	de 0,48 a 2,85	0,7290	NA			<12 es peor
Estado de MMR <sup>3</sup>	114	3,45	de 0,82 a 14,56	0,0916	NA			NA			Competente para MMR es peor
Estado de MMR <sup>4</sup>	128	4,18	de 1,00 a 17,45	0,0499	NA			NA			Competente para MMR es peor
Estado de GIV	91	2,49	de 1,11 a 5,58	0,0273	2,28	de 0,94 a 5,53	0,0684	2,56	de 1,12 a 5,87	0,0265	Positivo para GIV es peor
Continua											
Edad	91	1,02	de 0,98 a 1,06	0,4261	1,02	de 0,97 a 1,07	0,4312	NA			Mayor es peor

1. El análisis como una única covariable no incluyó casos con LVI registrado como "no notificado".  
 2. El análisis incluyó casos pMMR tanto de T3 como de T4 (de estadio IIa y IIb).  
 3. El análisis incluyó casos de T3 (estadio IIa) tanto pMMR como dMMR.  
 4. El análisis incluyó casos tanto pMMR como dMMR que eran tanto de T3 como de T4 (estadio IIa y IIb).

Evaluación de la capacidad predictiva

- 5 Se evaluó la capacidad predictiva del modelo de predicción estadística de dos maneras. En primer lugar, se evaluó lo bien que clasificó el modelo a los pacientes como de riesgo alto y bajo, usando el área bajo la curva de ROC (AUC). Se determinó la validación interna del/de los modelo(s) midiendo el sesgo en el AUC que se debe al sobreajuste del modelo; el sesgo se estima usando remuestreo con reposición. Las remuestras con reposición son muestras aleatorias que se toman con una nueva colocación. Para este problema, se usaron 200 remuestras, y para cada una de esas remuestras, se obtuvo una medida del AUC. El sobreajuste se estima como optimismo que se observa con modelos ajustados en comparación con las remuestras; el AUC ajustada es una manera de ajustar el posible AUC con exceso de optimismo que puede observarse cuando se incluyen más variables de las que puede ajustar de manera adecuada el tamaño de muestra.
- 10
- 15 Los modelos comparados son el modelo propuesto como el modelo predictivo estadístico más útil para esta cohorte:

(1) un modelo que incluye sólo las variables clínicas/descriptivas, ya que este modelo contiene en teoría la información que se usa actualmente en la práctica para evaluar el riesgo de paciente; y (2) el modelo completo, un modelo que incluye tanto el marcador como las variables en la práctica actual; y el modelo de GIV-fl (marcador) solo (como referencia). Se espera que el modelo completo presente un rendimiento mejor a todos los demás modelos, ya que usa toda la información de pacientes. Sin embargo, para estos datos puede ser difícil evaluar el rendimiento de este modelo estadístico debido a un sobreajuste.

En las figuras 10A y 10B se muestran curvas de ROC para la SLP a los 2 años y 5 años. El AUC mostrada en las leyendas de las figuras no está ajustada para el posible sobreajuste, en vez de eso, esto se muestra en la tabla 12. Cuanto mayor es el AUC mejor son la sensibilidad y la especificidad (también denominados valor verdadero positivo y verdadero negativo) del marcador. El AUC es la más alta a Máx(sens, espec), y generalmente valores “buenos” de AUC son superiores a 0,70. La tabla 12 muestra que cuando se añaden más de las dos variables en el modelo, entonces la diferencia entre el AUC sin ajustar y ajustada es mayor. Específicamente, tanto el modelo completo (todas las variables clínicas/descriptivas y el marcador GIV-fl) como el modelo clínico (sólo las variables clínicas/descriptivas) tienen valores de AUC sin ajustar mucho mejores; sin embargo cuando se ajusta para el sobreajuste, el modelo de LVI + GIV-fl funciona igual de bien que el modelo completo para la SLP tanto a los 2 años como a los 5 años.

Tabla 12. Resumen de valores de AUC para modelos de predicción estadística comparativos

Modelo	SLP a los 2 años		SLP a los 5 años	
	Sin ajustar	Ajustado <sup>a</sup>	Sin ajustar	Ajustado <sup>a</sup>
Sólo GIV-fl	0,61	0,62	0,63	0,62
LVI +GIV-fl	0,69	0,68	0,74	0,69
Todas las variables clínicas (las de la tabla 9)	0,65	0,62	0,71	0,65
Modelo completo (todos los factores de predicción + GIV-fl)	0,71	0,68	0,74	0,69

<sup>a</sup>valores tras el ajuste para el sesgo estimados a partir de 200 remuestras con reposición

Capacidad predictiva a nivel individual

Aunque el AUC, sensibilidad, especificidad, puntuación de Brier y otras métricas son medidas de la capacidad predictiva estadística, lo que con frecuencia falta es la integración de estas medidas con medidas de predicción. El método descrito en Pepe (J. Epidemiol. 167:362, 2008), denominado curva de capacidad de predicción, se usó para combinar estas dos medidas de clasificación y predicción de riesgo. El eje de las y de la curva de capacidad de predicción es el desenlace predicho para cada paciente (en este caso, la razón de riesgos instantáneos, a escala logarítmica), y el eje de las x es el riesgo acumulativo de la clasificación. Estas probabilidades a nivel individual para el marcador GIV-fl se codificaron por color (negativo para GIV-fl rojo, positivo para GIV-fl azul).

La figura 11 muestra el gráfico de capacidad de predicción para los pacientes con CRC de estadio IIa que no habían recibido previamente quimioterapia basándose en el modelo estadístico de GIV-fl y LVI. La escala de riesgos instantáneos es a escala logarítmica para facilidad de interpretación, dado que la escala de la razón no es simétrica; esto desplaza la escala de “significación” desde uno hasta cero, de modo que los valores por encima de cero demuestran una probabilidad superior de progresión, y los valores por debajo de cero muestran una probabilidad inferior de progresión. Para este modelo estadístico, justo por debajo del 50% de los pacientes tienen un riesgo superior de progresión, y la mayoría de esos pacientes son positivos para GIV-fl. Hay 5 pacientes en el extremo inferior de la escala de riesgo/riesgo instantáneo logarítmico y sin embargo son positivos para GIV-fl, y 6 pacientes con riesgo alto de progresión que son negativos para GIV-fl; pero en general, los pacientes positivos para GIV-fl tienen una alta probabilidad de progresión, y se clasifican como de riesgo alto, en comparación con los pacientes negativos para GIV-fl que generalmente tienen un riesgo bajo y una baja probabilidad de progresión.

Validez de modelo

Se determinó la capacidad del modelo para predecir en una submuestra de pacientes para los que está destinada la predicción. Se aplicó el modelo de predicción estadística de GIV-fl y LVI a pacientes de la cohorte que se sometieron a quimioterapia adyuvante (tablas 13 y 14). La expectativa es que los pacientes que se predijo que se habían beneficiado de la quimioterapia adyuvante realmente se beneficiaron. Dado que esto es una población submuestreada de la cohorte, no hay ningún modelo externo de validez, de modo que el enfoque se encontraba en el valor predictivo del modelo estadístico (y marcador). Se usó el máximo tanto de la sensibilidad como de la especificidad como punto de corte para las probabilidades predichas cuando se aplica el modelo de predicción estadística ajustado a la población de pacientes tratados con quimioterapia. Por tanto, se clasificó cada sujeto como de riesgo alto y riesgo bajo basándose en estos puntos de corte, sometiendo a prueba la suposición de que es probable que los pacientes con riesgo alto (probabilidad predicha  $\geq 0,22$  para SLP a los 2 años y  $0,24$  para SLP a los 5 años) tengan un alto valor predictivo positivo.

Las tablas 15 y 16 muestran el beneficio estimado basado en las probabilidades predichas del modelo estadístico de GIV-fl y LVI. El modelo predijo que 20/37 personas se habrían beneficiado de la quimioterapia a los 2 años (tabla 13). De hecho, 15/20 respondieron a la quimioterapia (valor predictivo positivo (VPP) = 0,75). Además, se predijo que 25/37 personas se habrían beneficiado de la quimioterapia (tabla 14) a los 5 años. De hecho, 20/25 respondieron a la quimioterapia (VPP = 0,80). Estos valores indican un nivel moderadamente alto de valor predictivo para clasificar pacientes que se beneficiarán de la quimioterapia adyuvante.

Tabla 13. Tabulación cruzada de SLP a los 2 años predicha frente a observada

SLP a los 2 años (predicha)	SLP a los 2 años (observada)		
	Sin recidiva	Recidiva	Total
Riesgo bajo	15	2	17
Riesgo alto	15	5	20
Total	30	7	37

Tabla 14. Tabulación cruzada de SLP a los 5 años predicha frente a observada

SLP a los 5 años (predicha)	SLP a los 5 años (observada)		
	Sin recidiva	Recidiva	Total
Riesgo bajo	10	2	12
Riesgo alto	20	5	25
Total	30	7	37

Se determinó el valor predicho positivo del modelo completo (todos los factores de predicción + marcaje de GIV-fl) y se muestra en las tablas 15 y 16. Las tablas 15 y 16 muestran la utilidad predictiva para pacientes con estadio Ila (T3) usando un modelo predictivo estadístico para GIV-fl y todas las variables clinicopatológicas. Tal como se muestra en la tabla 15, el modelo predijo que 12/37 personas se habrían beneficiado de la quimioterapia, 10/12 respondieron a la quimioterapia (VPP = 0,83). Tal como se muestra en la tabla 16, el modelo predijo que 19/37 personas se habrían beneficiado de la quimioterapia, 16/19 respondieron a la quimioterapia (VPP = 0,84). Los valores resultantes de 0,83 y 0,84 para la SLP a los 2 años y a los 5 años, respectivamente, demuestran una alta utilidad predictiva.

Tabla 15. Tabulación cruzada de SLP a los 2 años predicha frente a observada

SLP a los 2 años (predicha)	SLP a los 2 años (observada)		
	Sin recidiva	Recidiva	Total
Riesgo bajo	20	5	25
Riesgo alto	20	2	12
Total	30	7	37

Tabla 16. Tabulación cruzada de SLP a los 5 años predicha frente a observada

SLP a los 5 años (predicha)	SLP a los 2 años (observada)		
	Sin recidiva	Recidiva	Total
Riesgo bajo	14	4	18
Riesgo alto	16	3	19
Total	30	7	37

En resumen, cuando se usa GIV-fl junto con otras variables clinicopatológicas tales como LVI, edad, número de ganglios linfáticos positivo, sexo, diferenciación tumoral, estadio T o en qué lado está presente el tumor, puede usarse para clasificar a pacientes en estadio II que no han recibido previamente quimioterapia en poblaciones de riesgo alto y bajo. Los clasificados como de riesgo alto usando estos métodos pueden asignarse a recibir quimioterapia, mientras que los clasificados como de riesgo bajo usando estos métodos pueden asignarse a no recibir quimioterapia.

En un ejemplo, el modelo consistió en estado de GIV-fl y LVI. Un experto en la técnica apreciará que pueden incluirse otras variables clinicopatológicas, tales como una o más de edad, número de ganglios linfáticos positivo, sexo, diferenciación tumoral, estadio T o en qué lado está presente el tumor, en el modelo. Cuando se aplicó este modelo de predicción estadística a un subgrupo tratado con quimioterapia, el modelo tuvo un alto valor predicho positivo (VPP). Este alto VPP, junto con el rendimiento del modelo estadístico (por ejemplo, AUC) proporciona evidencias de utilidad de pronóstico.

*Validación de modelo usando BioGrid 2*

Las tablas 17 y 18 proporcionan resúmenes de datos de dos cohortes (denominadas BioGrid 1 y BioGrid 2).

Tabla 17 (BioGrid 1)

Variable	Categorías	Recidiva		Sin recidiva		Total	
		N	%	N	%	N	%
MMR	Deficiente	3	6,2%	36	25,5%	39	20,6%
	Competente	45	93,8%	105	74,5%	150	79,4%
Quimioterapia	No	34	70,8%	91	64,5%	125	66,1%
	Sí	14	29,2%	50	35,5%	64	33,9%
LVI	No	26	54,2%	99	70,2%	125	66,1%
	Sí	19	39,6%	31	22%	50	26,5%
	Sin notificar/NA	3	6,2%	11	7,8%	14	7,4%
Número de nodos	[2, 12)	15	31,2%	35	24,8%	50	26,5%
	[12, 15)	11	22,9%	29	20,6%	40	21,2%
	[15, 21)	10	20,8%	38	27%	48	25,4%
	[21, 56]	12	25%	39	27,7%	51	27%
Rendimiento de Ln	<12	15	31,2%	35	24,8%	50	26,5%
	>=12	33	68,8%	106	75,2%	139	73,5%
Sexo	M	24	50%	71	50,4%	95	50,3%
	H	24	50%	70	49,6%	94	49,7%
Dif. tumoral	Mala-moderada	13	27,1%	28	19,9%	41	21,7%
	Moderada-buena	35	72,9%	110	78%	145	76,7%
	Sin notificar / NA	0	0%	3	2,1%	3	1,6%
Estadio T	3	36	75%	123	87,2%	159	84,1%
	4	12	25%	18	12,8%	30	15,9%
Lado del sitio	izquierdo	25	52,1%	68	48,2%	93	49,2%
	derecho	23	47,9%	73	51,8%	96	50,8%
dfs		19,7	(16,5)		62(20)	51,2	(26,6)
Total		48	25,4%	141	74,6%	189	

5

Tabla 18 (BioGrid 2)

Variable	Categorías	Recidiva		Sin recidiva		Total	
		N	%	N	%	N	%
MMR	Deficiente	1	2,9%	60	21,1%	61	19,1%
	Competente	33	97,1%	225	78,9%	258	80,9%
Quimioterapia	No	25	73,5%	240	84,2%	265	83,1%
	Sí	9	26,5%	43	15,1%	52	16,3%
	Falta	0	0%	2	0,7%	2	0,6%
LVI	No	13	38,2%	206	72,3%	219	68,7%
	Sí	18	52,9%	63	22,1%	81	25,4%
	Sin notificar/NA	3	8,8%	16	5,6%	19	6%
Número de nodos	[2, 12)	6	17,6%	54	18,9%	60	18,8%
	[12, 15)	7	20,6%	47	16,5%	54	16,9%
	[15, 21)	5	14,7%	92	32,3%	97	30,4%
	[21, 56]	15	44,1%	89	31,2%	104	32,6%
	Falta	1	2,9%	3	1,1%	4	1,3%

ES 2 713 240 T3

Rendimiento de Ln	<12	6	17,6%	56	19,6%	62	19,4%
	>=12	28	82,4%	229	80,4%	257	80,6%
Sexo	M	11	32,4%	126	44,2%	137	42,9%
	H	23	67,6%	159	55,8%	182	57,1%
Dif. tumoral	Mala-moderada	6	17,6%	65	22,8%	71	22,3%
	Moderada-buena	28	82,4%	216	75,8%	244	76,5%
	Sin notificar/NA	0	0%	4	1,4%	4	1,3%
Estadio T	3	23	67,6%	248	87%	271	85%
	4	11	32,4%	37	13%	48	15%
Lado del sitio	izquierdo	20	58,8%	140	49,1%	160	50,2%
	derecho	14	41,2%	145	50,9%	159	49,8%
rfs		21,2	(15,9)	52,7	(37,3)	49,4	(37)
Total		34	10,7%	285	89,3%	319	

Razón de riesgos instantáneos de BioGrid 1 y 2

5 Las tablas 19, 20 y 21 presentan razones de riesgos instantáneos (HR) y los intervalos de confianza del 95% y valores de p asociados para diversos modelos.

La tabla 19 muestra HR de grupos de riesgo alto frente a riesgo bajo que se estratifican mediante los modelos de riesgo. Todas las estratificaciones de riesgos se basan en el modelo desarrollado en un conjunto de entrenamiento desarrollado en BioGrid 1.

10

Tabla 19: Razón de riesgos instantáneos para modelos de riesgo

Modelo	Quimioterapia	HR de B1	Valor de P de B1	HR de B2	Valor de P de B2
GIV	No tratado previamente	2,37 (1,05, 5,32)	0,037	2,36 (0,84, 6,61)	0,104
GIV	Tratado	2,48 (0,48, 12,78)	0,279	2,26 (0,37, 13,58)	0,375
GIV + LVI	No tratado previamente	3,74 (1,50, 9,32)	0,005	7,83 (1,03, 59,54)	0,047
GIV + LVI	Tratado	Inf	0,999	Inf	0,999

15 Las tablas 20 y 21 muestran HR de cada variable tanto en modelos de variables individuales como en el modelo de múltiples variables que incluye GIV y LVI.

La tabla 20 demuestra la razón de riesgos instantáneos para GIV y variables clínicas en la población BioGrid 1, pMMR, T3, que no ha recibido previamente quimioterapia. Las col. 3-5 muestran HR, IC y valor de P para modelos de variables individuales. Las col. 6-8 muestran HR, IC y valor de P para cada variable en el modelo de GIV+ LVI.

20

Tabla 20: Razón de riesgos instantáneos para BioGrid 1

	N	HR	IC del 95%	Valor de p	HR 2	IC del 95% 2	Valor de p 2
1vi	83	2,54	de 1,12 a 5,74	0,03	2,09	de 0,9 a 4,86	0,09
Giv	89	2,37	de 1,05 a 5,32	0,04	2,49	de 1,07 a 5,78	0,03
Lado del sitio	89	1,30	de 0,6 a 2,8	0,51			
Sexo	89	1,46	de 0,67 a 3,15	0,33			
edad	89	1,01	de 0,97 a 1,06	0,11			

25 La tabla 21 demuestra la razón de riesgos instantáneos para GIV y variables clínicas en la población BioGrid 1, pMMR, T3, que no ha recibido previamente quimioterapia. Las col. 3-5 muestran HR, IC y valor P para modelos de variables individuales. Las col. 6-8 muestran HR, IC y valor P para cada variable en el modelo de GIV+ LVI.

Tabla 21: Razón de riesgos instantáneos para BioGrid 2

	N	HR	IC del 95%	Valor de p	HR 2	IC del 95% 2	Valor de p 2
Ivi	175	3,36	de 1,22 a 9,27	0,02	3,44	de 1,24 a 9,49	0,02
Giv	188	2,36	de 0,84 a 6,61	0,1	2,21	de 0,7 a 6,98	0,18
Lado del sitio	188	0,87	de 0,34 a 2,25	0,78			
Sexo	188	0,58	de 0,19 a 1,75	0,33			
edad	188	1,04	de 0,99 a 1,09	0,11			

*AUC de BioGrid 2*

5 La tabla 22 proporciona el área bajo la curva de ROC (AUC) para diversos modelos. Todos los modelos se desarrollaron en el conjunto de entrenamiento desarrollado en BioGrid 1 y después se aplicaron a datos de BioGrid 2/pMMR/que no han recibido previamente quimioterapia.

10 Tabla 22

	T3	T3+T4
Clínica	0,639	0,656
GIV	0,596	0,577
LVI	0,628	0,652
GIV + LVI	0,682	0,677
GIV + Clínica	0,697	0,695

*Predicción de riesgo de BioGrid 1 y BioGrid 2*

15 Las tablas 23-26 proporcionan tablas de 2 en 2 de recidiva observada frente a predicción de riesgo a los 5 años. Todas las predicciones de riesgo se basan en el modelo desarrollado en el conjunto de entrenamiento.

Tabla 23: Predicción de riesgo, GIV+LVI, BioGrid 1 / que no han recibido previamente quimioterapia

	Sin recidiva	Recidiva
Riesgo bajo	34	5
Riesgo alto	26	18

20 Tabla 24: Predicción de riesgo, GIV+LVI, BioGrid 1 / tratados con quimioterapia

	Sin recidiva	Recidiva
Riesgo bajo	10	0
Riesgo alto	20	5

25 Tabla 25: Predicción de riesgo, GIV+LVI, BioGrid 2 / que no han recibido previamente quimioterapia

	Sin recidiva	Recidiva
Riesgo bajo	62	1
Riesgo alto	99	13

Tabla 26: Predicción de riesgo, GIV+LVI, BioGrid 3 / tratados con quimioterapia

	Sin recidiva	Recidiva
Riesgo bajo	12	0
Riesgo alto	11	5

30 La tabla 27 proporciona el VPP y las tasas de cálculo erróneo. VPP = Número de riesgo alto y no recidiva / número

de riesgo alto.

Tabla 27

Modelo	Cohorte	Quimioterapia	VPP	Clasificación errónea
GIV + LVI	BioGrid 1	No tratado previamente	0,59	0,37
GIV + LVI	BioGrid 1	Tratado	0,80	0,57
GIV + LVI	BioGrid 2	No tratado previamente	0,88	0,57
GIV + LVI	BioGrid 2	Tratado	0,69	0,39

- 5 *Curvas de Kaplan-Meier*
- 10 Las figuras 12-13 proporcionan curvas de Kaplan-Meier para diversas combinaciones de marcador/LVI a partir de BioGrid 2. Todas las estratificaciones de riesgos se basan en el modelo desarrollado en el conjunto de entrenamiento anterior.
- Tal como puede observarse a partir de las figuras y tablas anteriores, se ha validado GIV a lo largo de dos cohortes independientes como biomarcador predictivo y de pronóstico reproducible en CRC de estadio II.
- 15 A la vista de las muchas realizaciones posibles a las que pueden aplicarse los principios de la divulgación, debe reconocerse que los ejemplos ilustrados sólo son ejemplos de la divulgación y no deben interpretarse como limitativos del alcance de la invención. En vez de eso, el alcance de la invención se define por las siguientes reivindicaciones. Por tanto, se reivindica como invención todo lo que entra dentro del alcance de estas reivindicaciones.
- 20 **Lista de secuencias**
- <110> Ventana Medical Systems, Inc. *et al.*
- 25 <120> PROTEÍNA ASOCIADA A VESÍCULA QUE INTERACCIONA CON G-ALFA (GIV) COMO MARCADOR PREDICTIVO EN CÁNCER COLORRECTAL DE ESTADIO II
- <130> R69606PC
- 30 <150> Documento US61/940.705
- <151> 17-02-2014
- <160> 2
- 35 <170> PatentIn versión 3.5
- <210> 1
- 40 <211> 1870
- <212> PRT
- <213> *Homo sapiens*
- 45 <400> 1

ES 2 713 240 T3

Met Glu Asn Glu Ile Phe Thr Pro Leu Leu Glu Gln Phe Met Thr Ser  
 1 5 10 15

Pro Leu Val Thr Trp Val Lys Thr Phe Gly Pro Leu Ala Ala Gly Asn  
 20 25 30

Gly Thr Asn Leu Asp Glu Tyr Val Ala Leu Val Asp Gly Val Phe Leu  
 35 40 45

Asn Gln Val Met Leu Gln Ile Asn Pro Lys Leu Glu Ser Gln Arg Val  
 50 55 60

Asn Lys Lys Val Asn Asn Asp Ala Ser Leu Arg Met His Asn Leu Ser  
 65 70 75 80

Ile Leu Val Arg Gln Ile Lys Phe Tyr Tyr Gln Glu Thr Leu Gln Gln  
 85 90 95

Leu Ile Met Met Ser Leu Pro Asn Val Leu Ile Ile Gly Lys Asn Pro  
 100 105 110

Phe Ser Glu Gln Gly Thr Glu Glu Val Lys Lys Leu Leu Leu Leu Leu  
 115 120 125

Leu Gly Cys Ala Val Gln Cys Gln Lys Lys Glu Glu Phe Ile Glu Arg  
 130 135 140

Ile Gln Gly Leu Asp Phe Asp Thr Lys Ala Ala Val Ala Ala His Ile  
 145 150 155 160

ES 2 713 240 T3

Gln Glu Val Thr His Asn Gln Glu Asn Val Phe Asp Leu Gln Trp Met  
 165 170 175

Glu Val Thr Asp Met Ser Gln Glu Asp Ile Glu Pro Leu Leu Lys Asn  
 180 185 190

Met Ala Leu His Leu Lys Arg Leu Ile Asp Glu Arg Asp Glu His Ser  
 195 200 205

Glu Thr Ile Ile Glu Leu Ser Glu Glu Arg Asp Gly Leu His Phe Leu  
 210 215 220

Pro His Ala Ser Ser Ser Ala Gln Ser Pro Cys Gly Ser Pro Gly Met  
 225 230 235 240

Lys Arg Thr Glu Ser Arg Gln His Leu Ser Val Glu Leu Ala Asp Ala  
 245 250 255

Lys Ala Lys Ile Arg Arg Leu Arg Gln Glu Leu Glu Glu Lys Thr Glu  
 260 265 270

Gln Leu Leu Asp Cys Lys Gln Glu Leu Glu Gln Met Glu Ile Glu Leu  
 275 280 285

Lys Arg Leu Gln Gln Glu Asn Met Asn Leu Leu Ser Asp Ala Arg Ser  
 290 295 300

Ala Arg Met Tyr Arg Asp Glu Leu Asp Ala Leu Arg Glu Lys Ala Val  
 305 310 315 320

Arg Val Asp Lys Leu Glu Ser Glu Val Ser Arg Tyr Lys Glu Arg Leu  
 325 330 335

His Asp Ile Glu Phe Tyr Lys Ala Arg Val Glu Glu Leu Lys Glu Asp  
 340 345 350

Asn Gln Val Leu Leu Glu Thr Lys Thr Met Leu Glu Asp Gln Leu Glu  
 355 360 365

Gly Thr Arg Ala Arg Ser Asp Lys Leu His Glu Leu Glu Lys Glu Asn  
 370 375 380

Leu Gln Leu Lys Ala Lys Leu His Asp Met Glu Met Glu Arg Asp Met  
 385 390 395 400

Asp Arg Lys Lys Ile Glu Glu Leu Met Glu Glu Asn Met Thr Leu Glu  
 405 410 415

ES 2 713 240 T3

Met Ala Gln Lys Gln Ser Met Asp Glu Ser Leu His Leu Gly Trp Glu  
420 425 430

Leu Glu Gln Ile Ser Arg Thr Ser Glu Leu Ser Glu Ala Pro Gln Lys  
435 440 445

Ser Leu Gly His Glu Val Asn Glu Leu Thr Ser Ser Arg Leu Leu Lys  
450 455 460

Leu Glu Met Glu Asn Gln Ser Leu Thr Lys Thr Val Glu Glu Leu Arg  
465 470 475 480

Thr Thr Val Asp Ser Val Glu Gly Asn Ala Ser Lys Ile Leu Lys Met  
485 490 495

Glu Lys Glu Asn Gln Arg Leu Ser Lys Lys Val Glu Ile Leu Glu Asn  
500 505 510

Glu Ile Val Gln Glu Lys Gln Ser Leu Gln Asn Cys Gln Asn Leu Ser  
515 520 525

Lys Asp Leu Met Lys Glu Lys Ala Gln Leu Glu Lys Thr Ile Glu Thr  
530 535 540

Leu Arg Glu Asn Ser Glu Arg Gln Ile Lys Ile Leu Glu Gln Glu Asn  
545 550 555 560

Glu His Leu Asn Gln Thr Val Ser Ser Leu Arg Gln Arg Ser Gln Ile  
565 570 575

Ser Ala Glu Ala Arg Val Lys Asp Ile Glu Lys Glu Asn Lys Ile Leu  
580 585 590

His Glu Ser Ile Lys Glu Thr Ser Ser Lys Leu Ser Lys Ile Glu Phe  
595 600 605

Glu Lys Arg Gln Ile Lys Lys Glu Leu Glu His Tyr Lys Glu Lys Gly  
610 615 620

Glu Arg Ala Glu Glu Leu Glu Asn Glu Leu His His Leu Glu Lys Glu  
625 630 635 640

Asn Glu Leu Leu Gln Lys Lys Ile Thr Asn Leu Lys Ile Thr Cys Glu  
645 650 655

Lys Ile Glu Ala Leu Glu Gln Glu Asn Ser Glu Leu Glu Arg Glu Asn  
660 665 670

ES 2 713 240 T3

Arg Lys Leu Lys Lys Thr Leu Asp Ser Phe Lys Asn Leu Thr Phe Gln  
675 680 685

Leu Glu Ser Leu Glu Lys Glu Asn Ser Gln Leu Asp Glu Glu Asn Leu  
690 695 700

Glu Leu Arg Arg Asn Val Glu Ser Leu Lys Cys Ala Ser Met Lys Met  
705 710 715 720

Ala Gln Leu Gln Leu Glu Asn Lys Glu Leu Glu Ser Glu Lys Glu Gln  
725 730 735

Leu Lys Lys Gly Leu Glu Leu Leu Lys Ala Ser Phe Lys Lys Thr Glu  
740 745 750

Arg Leu Glu Val Ser Tyr Gln Gly Leu Asp Ile Glu Asn Gln Arg Leu  
755 760 765

Gln Lys Thr Leu Glu Asn Ser Asn Lys Lys Ile Gln Gln Leu Glu Ser  
770 775 780

Glu Leu Gln Asp Leu Glu Met Glu Asn Gln Thr Leu Gln Lys Asn Leu  
785 790 795 800

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

Asn Lys Ser Leu Glu Gln Glu Thr Ser Gln Leu Glu Lys Asp Lys Lys  
820 825 830

Gln Leu Glu Lys Glu Asn Lys Arg Leu Arg Gln Gln Ala Glu Ile Lys  
835 840 845

Asp Thr Thr Leu Glu Glu Asn Asn Val Lys Ile Gly Asn Leu Glu Lys  
850 855 860

Glu Asn Lys Thr Leu Ser Lys Glu Ile Gly Ile Tyr Lys Glu Ser Cys  
865 870 875 880

Val Arg Leu Lys Glu Leu Glu Lys Glu Asn Lys Glu Leu Val Lys Arg  
885 890 895

Ala Thr Ile Asp Ile Lys Thr Leu Val Thr Leu Arg Glu Asp Leu Val  
900 905 910

Ser Glu Lys Leu Lys Thr Gln Gln Met Asn Asn Asp Leu Glu Lys Leu

ES 2 713 240 T3

915	920	925																			
Thr	His	Glu	Leu	Glu	Lys	Ile	Gly	Leu	Asn	Lys	Glu	Arg	Leu	Leu	His						
930						935					940										
Asp	Glu	Gln	Ser	Thr	Asp	Asp	Arg	Tyr	Lys	Leu	Leu	Glu	Ser	Lys	Leu						
945					950					955					960						
Glu	Ser	Thr	Leu	Lys	Lys	Ser	Leu	Glu	Ile	Lys	Glu	Glu	Lys	Ile	Ala						
				965					970					975							
Ala	Leu	Glu	Ala	Arg	Leu	Glu	Glu	Ser	Thr	Asn	Tyr	Asn	Gln	Gln	Leu						
			980						985				990								
Arg	Gln	Glu	Leu	Lys	Thr	Val	Lys	Lys	Asn	Tyr	Glu	Ala	Leu	Lys	Gln						
		995					1000					1005									
Arg	Gln	Asp	Glu	Glu	Arg	Met	Val	Gln	Ser	Ser	Pro	Pro	Ile	Ser							
1010						1015					1020										
Gly	Glu	Asp	Asn	Lys	Trp	Glu	Arg	Glu	Ser	Gln	Glu	Thr	Thr	Arg							
1025						1030					1035										
Glu	Leu	Leu	Lys	Val	Lys	Asp	Arg	Leu	Ile	Glu	Val	Glu	Arg	Asn							
1040						1045					1050										
Asn	Ala	Thr	Leu	Gln	Ala	Glu	Lys	Gln	Ala	Leu	Lys	Thr	Gln	Leu							
1055						1060					1065										
Lys	Gln	Leu	Glu	Thr	Gln	Asn	Asn	Asn	Leu	Gln	Ala	Gln	Ile	Leu							
1070						1075					1080										
Ala	Leu	Gln	Arg	Gln	Thr	Val	Ser	Leu	Gln	Glu	Gln	Asn	Thr	Thr							
1085						1090					1095										
Leu	Gln	Thr	Gln	Asn	Ala	Lys	Leu	Gln	Val	Glu	Asn	Ser	Thr	Leu							
1100						1105					1110										
Asn	Ser	Gln	Ser	Thr	Ser	Leu	Met	Asn	Gln	Asn	Ala	Gln	Leu	Leu							
1115						1120					1125										
Ile	Gln	Gln	Ser	Ser	Leu	Glu	Asn	Glu	Asn	Glu	Ser	Val	Ile	Lys							
1130						1135					1140										
Glu	Arg	Glu	Asp	Leu	Lys	Ser	Leu	Tyr	Asp	Ser	Leu	Ile	Lys	Asp							
1145						1150					1155										

ES 2 713 240 T3

His Glu Lys Leu Glu Leu Leu His Glu Arg Gln Ala Ser Glu Tyr  
 1160 1165 1170

Glu Ser Leu Ile Ser Lys His Gly Thr Leu Lys Ser Ala His Lys  
 1175 1180 1185

Asn Leu Glu Val Glu His Arg Asp Leu Glu Asp Arg Tyr Asn Gln  
 1190 1195 1200

Leu Leu Lys Gln Lys Gly Gln Leu Glu Asp Leu Glu Lys Met Leu  
 1205 1210 1215

Lys Val Glu Gln Glu Lys Met Leu Leu Glu Asn Lys Asn His Glu  
 1220 1225 1230

Thr Val Ala Ala Glu Tyr Lys Lys Leu Cys Gly Glu Asn Asp Arg  
 1235 1240 1245

Leu Asn His Thr Tyr Ser Gln Leu Leu Lys Glu Thr Glu Val Leu  
 1250 1255 1260

Gln Thr Asp His Lys Asn Leu Lys Ser Leu Leu Asn Asn Ser Lys  
 1265 1270 1275

Leu Glu Gln Thr Arg Leu Glu Ala Glu Phe Ser Lys Leu Lys Glu  
 1280 1285 1290

Gln Tyr Gln Gln Leu Asp Ile Thr Ser Thr Lys Leu Asn Asn Gln  
 1295 1300 1305

Cys Glu Leu Leu Ser Gln Leu Lys Gly Asn Leu Glu Glu Glu Asn  
 1310 1315 1320

Arg His Leu Leu Asp Gln Ile Gln Thr Leu Met Leu Gln Asn Arg  
 1325 1330 1335

Thr Leu Leu Glu Gln Asn Met Glu Ser Lys Asp Leu Phe His Val  
 1340 1345 1350

Glu Gln Arg Gln Tyr Ile Asp Lys Leu Asn Glu Leu Arg Arg Gln  
 1355 1360 1365

Lys Glu Lys Leu Glu Glu Lys Ile Met Asp Gln Tyr Lys Phe Tyr  
 1370 1375 1380

Asp Pro Ser Pro Pro Arg Arg Arg Gly Asn Trp Ile Thr Leu Lys  
 1385 1390 1395

ES 2 713 240 T3

Met Arg Lys Leu Ile Lys Ser Lys Lys Asp Ile Asn Arg Glu Arg  
 1400 1405 1410

Gln Lys Ser Leu Thr Leu Thr Pro Thr Arg Ser Asp Ser Ser Glu  
 1415 1420 1425

Gly Phe Leu Gln Leu Pro His Gln Asp Ser Gln Asp Ser Ser Ser  
 1430 1435 1440

Val Gly Ser Asn Ser Leu Glu Asp Gly Gln Thr Leu Gly Thr Lys  
 1445 1450 1455

Lys Ser Ser Met Val Ala Leu Lys Arg Leu Pro Phe Leu Arg Asn  
 1460 1465 1470

Arg Pro Lys Asp Lys Asp Lys Met Lys Ala Cys Tyr Arg Arg Ser  
 1475 1480 1485

Met Ser Met Asn Asp Leu Val Gln Ser Met Val Leu Ala Gly Gln  
 1490 1495 1500

Trp Thr Gly Ser Thr Glu Asn Leu Glu Val Pro Asp Asp Ile Ser  
 1505 1510 1515

Thr Gly Lys Arg Arg Lys Glu Leu Gly Ala Met Ala Phe Ser Thr  
 1520 1525 1530

Thr Ala Ile Asn Phe Ser Thr Val Asn Ser Ser Ala Gly Phe Arg  
 1535 1540 1545

Ser Lys Gln Leu Val Asn Asn Lys Asp Thr Thr Ser Phe Glu Asp  
 1550 1555 1560

Ile Ser Pro Gln Gly Val Ser Asp Asp Ser Ser Thr Gly Ser Arg  
 1565 1570 1575

Val His Ala Ser Arg Pro Ala Ser Leu Asp Ser Gly Arg Thr Ser  
 1580 1585 1590

Thr Ser Asn Ser Asn Asn Asn Ala Ser Leu His Glu Val Lys Ala  
 1595 1600 1605

Gly Ala Val Asn Asn Gln Ser Arg Pro Gln Ser His Ser Ser Gly  
 1610 1615 1620

Glu Phe Ser Leu Leu His Asp His Glu Ala Trp Ser Ser Ser Gly  
 1625 1630 1635

ES 2 713 240 T3

Ser Ser Pro Ile Gln Tyr Leu Lys Arg Gln Thr Arg Ser Ser Pro  
 1640 1645 1650

Val Leu Gln His Lys Ile Ser Glu Thr Leu Glu Ser Arg His His  
 1655 1660 1665

Lys Ile Lys Thr Gly Ser Pro Gly Ser Glu Val Val Thr Leu Gln  
 1670 1675 1680

Gln Phe Leu Glu Glu Ser Asn Lys Leu Thr Ser Val Gln Ile Lys  
 1685 1690 1695

Ser Ser Ser Gln Glu Asn Leu Leu Asp Glu Val Met Lys Ser Leu  
 1700 1705 1710

Ser Val Ser Ser Asp Phe Leu Gly Lys Asp Lys Pro Val Ser Cys  
 1715 1720 1725

Gly Leu Ala Arg Ser Val Ser Gly Lys Thr Pro Gly Asp Phe Tyr  
 1730 1735 1740

Asp Arg Arg Thr Thr Lys Pro Glu Phe Leu Arg Pro Gly Pro Arg  
 1745 1750 1755

Lys Thr Glu Asp Thr Tyr Phe Ile Ser Ser Ala Gly Lys Pro Thr  
 1760 1765 1770

Pro Gly Thr Gln Gly Lys Ile Lys Leu Val Lys Glu Ser Ser Leu  
 1775 1780 1785

Ser Arg Gln Ser Lys Asp Ser Asn Pro Tyr Ala Thr Leu Pro Arg  
 1790 1795 1800

Ala Ser Ser Val Ile Ser Thr Ala Glu Gly Thr Thr Arg Arg Thr  
 1805 1810 1815

Ser Ile His Asp Phe Leu Thr Lys Asp Ser Arg Leu Pro Ile Ser  
 1820 1825 1830

Val Asp Ser Pro Pro Ala Ala Ala Asp Ser Asn Thr Thr Ala Ala  
 1835 1840 1845

Ser Asn Val Asp Lys Val Gln Glu Ser Arg Asn Ser Lys Ser Arg  
 1850 1855 1860

Ser Arg Glu Gln Gln Ser Ser  
 1865 1870

<210> 2

5

<211> 1871

<212> PRT

10 <213> *Homo sapiens*

<400> 2

ES 2 713 240 T3

Met Glu Asn Glu Ile Phe Thr Pro Leu Leu Glu Gln Phe Met Thr Ser  
 1 5 10 15

Pro Leu Val Thr Trp Val Lys Thr Phe Gly Pro Leu Ala Ala Gly Asn  
 20 25 30

Gly Thr Asn Leu Asp Glu Tyr Val Ala Leu Val Asp Gly Val Phe Leu  
 35 40 45

Asn Gln Val Met Leu Gln Ile Asn Pro Lys Leu Glu Ser Gln Arg Val  
 50 55 60

Asn Lys Lys Val Asn Asn Asp Ala Ser Leu Arg Met His Asn Leu Ser  
 65 70 75 80

Ile Leu Val Arg Gln Ile Lys Phe Tyr Tyr Gln Glu Thr Leu Gln Gln  
 85 90 95

Leu Ile Met Met Ser Leu Pro Asn Val Leu Ile Ile Gly Lys Asn Pro  
 100 105 110

Phe Ser Glu Gln Gly Thr Glu Glu Val Lys Lys Leu Leu Leu Leu Leu  
 115 120 125

Leu Gly Cys Ala Val Gln Cys Gln Lys Lys Glu Glu Phe Ile Glu Arg  
 130 135 140

Ile Gln Gly Leu Asp Phe Asp Thr Lys Ala Ala Val Ala Ala His Ile  
 145 150 155 160

Gln Glu Val Thr His Asn Gln Glu Asn Val Phe Asp Leu Gln Trp Met  
 165 170 175

Glu Val Thr Asp Met Ser Gln Glu Asp Ile Glu Pro Leu Leu Lys Asn  
 180 185 190

Met Ala Leu His Leu Lys Arg Leu Ile Asp Glu Arg Asp Glu His Ser  
 195 200 205

Glu Thr Ile Ile Glu Leu Ser Glu Glu Arg Asp Gly Leu His Phe Leu



ES 2 713 240 T3

Leu Glu Met Glu Asn Gln Ser Leu Thr Lys Thr Val Glu Glu Leu Arg  
 465 470 475 480  
 Thr Thr Val Asp Ser Val Glu Gly Asn Ala Ser Lys Ile Leu Lys Met  
 485 490 495  
 Glu Lys Glu Asn Gln Arg Leu Ser Lys Lys Val Glu Ile Leu Glu Asn  
 500 505 510  
 Glu Ile Val Gln Glu Lys Gln Ser Leu Gln Asn Cys Gln Asn Leu Ser  
 515 520 525  
 Lys Asp Leu Met Lys Glu Lys Ala Gln Leu Glu Lys Thr Ile Glu Thr  
 530 535 540  
 Leu Arg Glu Asn Ser Glu Arg Gln Ile Lys Ile Leu Glu Gln Glu Asn  
 545 550 555 560  
 Glu His Leu Asn Gln Thr Val Ser Ser Leu Arg Gln Arg Ser Gln Ile  
 565 570 575  
 Ser Ala Glu Ala Arg Val Lys Asp Ile Glu Lys Glu Asn Lys Ile Leu  
 580 585 590  
 His Glu Ser Ile Lys Glu Thr Ser Ser Lys Leu Ser Lys Ile Glu Phe  
 595 600 605  
 Glu Lys Arg Gln Ile Lys Lys Glu Leu Glu His Tyr Lys Glu Lys Gly  
 610 615 620  
 Glu Arg Ala Glu Glu Leu Glu Asn Glu Leu His His Leu Glu Lys Glu  
 625 630 635 640  
 Asn Glu Leu Leu Gln Lys Lys Ile Thr Asn Leu Lys Ile Thr Cys Glu  
 645 650 655  
 Lys Ile Glu Ala Leu Glu Gln Glu Asn Ser Glu Leu Glu Arg Glu Asn  
 660 665 670  
 Arg Lys Leu Lys Lys Thr Leu Asp Ser Phe Lys Asn Leu Thr Phe Gln  
 675 680 685  
 Leu Glu Ser Leu Glu Lys Glu Asn Ser Gln Leu Asp Glu Glu Asn Leu  
 690 695 700  
 Glu Leu Arg Arg Asn Val Glu Ser Leu Lys Cys Ala Ser Met Lys Met  
 705 710 715 720

ES 2 713 240 T3

Ala Gln Leu Gln Leu Glu Asn Lys Glu Leu Glu Ser Glu Lys Glu Gln  
725 730 735

Leu Lys Lys Gly Leu Glu Leu Leu Lys Ala Ser Phe Lys Lys Thr Glu  
740 745 750

Arg Leu Glu Val Ser Tyr Gln Gly Leu Asp Ile Glu Asn Gln Arg Leu  
755 760 765

Gln Lys Thr Leu Glu Asn Ser Asn Lys Lys Ile Gln Gln Leu Glu Ser  
770 775 780

Glu Leu Gln Asp Leu Glu Met Glu Asn Gln Thr Leu Gln Lys Asn Leu  
785 790 795 800

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

Asn Lys Ser Leu Glu Gln Glu Thr Ser Gln Leu Glu Lys Asp Lys Lys  
820 825 830

Gln Leu Glu Lys Glu Asn Lys Arg Leu Arg Gln Gln Ala Glu Ile Lys  
835 840 845

Asp Thr Thr Leu Glu Glu Asn Asn Val Lys Ile Gly Asn Leu Glu Lys  
850 855 860

Glu Asn Lys Thr Leu Ser Lys Glu Ile Gly Ile Tyr Lys Glu Ser Cys  
865 870 875 880

Val Arg Leu Lys Glu Leu Glu Lys Glu Asn Lys Glu Leu Val Lys Arg  
885 890 895

Ala Thr Ile Asp Ile Lys Thr Leu Val Thr Leu Arg Glu Asp Leu Val  
900 905 910

Ser Glu Lys Leu Lys Thr Gln Gln Met Asn Asn Asp Leu Glu Lys Leu  
915 920 925

Thr His Glu Leu Glu Lys Ile Gly Leu Asn Lys Glu Arg Leu Leu His  
930 935 940

Asp Glu Gln Ser Thr Asp Asp Ser Arg Tyr Lys Leu Leu Glu Ser Lys  
945 950 955 960

Leu Glu Ser Thr Leu Lys Lys Ser Leu Glu Ile Lys Glu Glu Lys Ile  
965 970 975

ES 2 713 240 T3

Ala Ala Leu Glu Ala Arg Leu Glu Glu Ser Thr Asn Tyr Asn Gln Gln  
980 985 990

Leu Arg Gln Glu Leu Lys Thr Val Lys Lys Asn Tyr Glu Ala Leu Lys  
995 1000 1005

Gln Arg Gln Asp Glu Glu Arg Met Val Gln Ser Ser Pro Pro Ile  
1010 1015 1020

Ser Gly Glu Asp Asn Lys Trp Glu Arg Glu Ser Gln Glu Thr Thr  
1025 1030 1035

Arg Glu Leu Leu Lys Val Lys Asp Arg Leu Ile Glu Val Glu Arg  
1040 1045 1050

Asn Asn Ala Thr Leu Gln Ala Glu Lys Gln Ala Leu Lys Thr Gln  
1055 1060 1065

Leu Lys Gln Leu Glu Thr Gln Asn Asn Asn Leu Gln Ala Gln Ile  
1070 1075 1080

Leu Ala Leu Gln Arg Gln Thr Val Ser Leu Gln Glu Gln Asn Thr  
1085 1090 1095

Thr Leu Gln Thr Gln Asn Ala Lys Leu Gln Val Glu Asn Ser Thr  
1100 1105 1110

Leu Asn Ser Gln Ser Thr Ser Leu Met Asn Gln Asn Ala Gln Leu  
1115 1120 1125

Leu Ile Gln Gln Ser Ser Leu Glu Asn Glu Asn Glu Ser Val Ile  
1130 1135 1140

Lys Glu Arg Glu Asp Leu Lys Ser Leu Tyr Asp Ser Leu Ile Lys  
1145 1150 1155

Asp His Glu Lys Leu Glu Leu Leu His Glu Arg Gln Ala Ser Glu  
1160 1165 1170

Tyr Glu Ser Leu Ile Ser Lys His Gly Thr Leu Lys Ser Ala His  
1175 1180 1185

Lys Asn Leu Glu Val Glu His Arg Asp Leu Glu Asp Arg Tyr Asn  
1190 1195 1200

Gln Leu Leu Lys Gln Lys Gly Gln Leu Glu Asp Leu Glu Lys Met

ES 2 713 240 T3

1205		1210		1215
Leu Lys Val Glu Gln Glu Lys Met Leu Leu Glu Asn Lys Asn His 1220		1225		1230
Glu Thr Val Ala Ala Glu Tyr Lys Lys Leu Cys Gly Glu Asn Asp 1235		1240		1245
Arg Leu Asn His Thr Tyr Ser Gln Leu Leu Lys Glu Thr Glu Val 1250		1255		1260
Leu Gln Thr Asp His Lys Asn Leu Lys Ser Leu Leu Asn Asn Ser 1265		1270		1275
Lys Leu Glu Gln Thr Arg Leu Glu Ala Glu Phe Ser Lys Leu Lys 1280		1285		1290
Glu Gln Tyr Gln Gln Leu Asp Ile Thr Ser Thr Lys Leu Asn Asn 1295		1300		1305
Gln Cys Glu Leu Leu Ser Gln Leu Lys Gly Asn Leu Glu Glu Glu 1310		1315		1320
Asn Arg His Leu Leu Asp Gln Ile Gln Thr Leu Met Leu Gln Asn 1325		1330		1335
Arg Thr Leu Leu Glu Gln Asn Met Glu Ser Lys Asp Leu Phe His 1340		1345		1350
Val Glu Gln Arg Gln Tyr Ile Asp Lys Leu Asn Glu Leu Arg Arg 1355		1360		1365
Gln Lys Glu Lys Leu Glu Glu Lys Ile Met Asp Gln Tyr Lys Phe 1370		1375		1380
Tyr Asp Pro Ser Pro Pro Arg Arg Arg Gly Asn Trp Ile Thr Leu 1385		1390		1395
Lys Met Arg Lys Leu Ile Lys Ser Lys Lys Asp Ile Asn Arg Glu 1400		1405		1410
Arg Gln Lys Ser Leu Thr Leu Thr Pro Thr Arg Ser Asp Ser Ser 1415		1420		1425
Glu Gly Phe Leu Gln Leu Pro His Gln Asp Ser Gln Asp Ser Ser 1430		1435		1440

ES 2 713 240 T3

Ser Val Gly Ser Asn Ser Leu Glu Asp Gly Gln Thr Leu Gly Thr  
 1445 1450 1455

Lys Lys Ser Ser Met Val Ala Leu Lys Arg Leu Pro Phe Leu Arg  
 1460 1465 1470

Asn Arg Pro Lys Asp Lys Asp Lys Met Lys Ala Cys Tyr Arg Arg  
 1475 1480 1485

Ser Met Ser Met Asn Asp Leu Val Gln Ser Met Val Leu Ala Gly  
 1490 1495 1500

Gln Trp Thr Gly Ser Thr Glu Asn Leu Glu Val Pro Asp Asp Ile  
 1505 1510 1515

Ser Thr Gly Lys Arg Arg Lys Glu Leu Gly Ala Met Ala Phe Ser  
 1520 1525 1530

Thr Thr Ala Ile Asn Phe Ser Thr Val Asn Ser Ser Ala Gly Phe  
 1535 1540 1545

Arg Ser Lys Gln Leu Val Asn Asn Lys Asp Thr Thr Ser Phe Glu  
 1550 1555 1560

Asp Ile Ser Pro Gln Gly Val Ser Asp Asp Ser Ser Thr Gly Ser  
 1565 1570 1575

Arg Val His Ala Ser Arg Pro Ala Ser Leu Asp Ser Gly Arg Thr  
 1580 1585 1590

Ser Thr Ser Asn Ser Asn Asn Asn Ala Ser Leu His Glu Val Lys  
 1595 1600 1605

Ala Gly Ala Val Asn Asn Gln Ser Arg Pro Gln Ser His Ser Ser  
 1610 1615 1620

Gly Glu Phe Ser Leu Leu His Asp His Glu Ala Trp Ser Ser Ser  
 1625 1630 1635

Gly Ser Ser Pro Ile Gln Tyr Leu Lys Arg Gln Thr Arg Ser Ser  
 1640 1645 1650

Pro Val Leu Gln His Lys Ile Ser Glu Thr Leu Glu Ser Arg His  
 1655 1660 1665

His Lys Ile Lys Thr Gly Ser Pro Gly Ser Glu Val Val Thr Leu  
 1670 1675 1680

ES 2 713 240 T3

Gln Gln Phe Leu Glu Glu Ser Asn Lys Leu Thr Ser Val Gln Ile  
 1685 1690 1695

Lys Ser Ser Ser Gln Glu Asn Leu Leu Asp Glu Val Met Lys Ser  
 1700 1705 1710

Leu Ser Val Ser Ser Asp Phe Leu Gly Lys Asp Lys Pro Val Ser  
 1715 1720 1725

Cys Gly Leu Ala Arg Ser Val Ser Gly Lys Thr Pro Gly Asp Phe  
 1730 1735 1740

Tyr Asp Arg Arg Thr Thr Lys Pro Glu Phe Leu Arg Pro Gly Pro  
 1745 1750 1755

Arg Lys Thr Glu Asp Thr Tyr Phe Ile Ser Ser Ala Gly Lys Pro  
 1760 1765 1770

Thr Pro Gly Thr Gln Gly Lys Ile Lys Leu Val Lys Glu Ser Ser  
 1775 1780 1785

Leu Ser Arg Gln Ser Lys Asp Ser Asn Pro Tyr Ala Thr Leu Pro  
 1790 1795 1800

Arg Ala Ser Ser Val Ile Ser Thr Ala Glu Gly Thr Thr Arg Arg  
 1805 1810 1815

Thr Ser Ile His Asp Phe Leu Thr Lys Asp Ser Arg Leu Pro Ile  
 1820 1825 1830

Ser Val Asp Ser Pro Pro Ala Ala Ala Asp Ser Asn Thr Thr Ala  
 1835 1840 1845

Ala Ser Asn Val Asp Lys Val Gln Glu Ser Arg Asn Ser Lys Ser  
 1850 1855 1860

Arg Ser Arg Glu Gln Gln Ser Ser  
 1865 1870

**REIVINDICACIONES**

1. Método para analizar una muestra de cáncer colorrectal (CRC) competente para reparación de apareamiento erróneo (pMMR) de estadio II obtenida de un sujeto, que comprende:
  - poner en contacto una muestra que comprende el CRC pMMR de estadio II con un agente de unión específica a proteína de proteína asociada a vesícula que interacciona con G-alfa de longitud completa (GIV-fl), en el que el agente de unión específica a proteína GIV-fl comprende un anticuerpo frente a GIV-fl, o poner en contacto ARN aislado de una muestra con una sonda de ácido nucleico específica para ARNm de proteína asociada a vesícula que interacciona con G-alfa de longitud completa (GIV-fl);
  - puntuar la expresión de ARNm o proteína GIV-fl en la muestra para determinar un estado de GIV-fl de la muestra;
  - determinar el estado de invasión linfovascular (LVI) del CRC en el sujeto con un agente de unión específica que permite una determinación de LVI en el que el agente de unión específica que permite una determinación de LVI comprende un anticuerpo específico para CD34 o endotelio linfático; y
  - analizar la muestra basándose en el estado de GIV-fl y estado de LVI, en el que el método comprende además determinar el estado de reparación de apareamiento erróneo (MMR) de la muestra con el agente de unión específica a proteína de reparación de apareamiento erróneo, en el que el agente de unión específica a proteína de reparación de apareamiento erróneo comprende uno o más anticuerpos específicos para homólogo de mutL 1 (MLH1); segregación posmeiótica aumentada 2 (PMS2); homólogo de proteína MutS 2 Msh2 (MSH2) y/u homólogo de proteína MutS 6 (MSH6); y
  - en el que el método es un método de predecir la supervivencia libre de progresión (SLP) probable del sujeto, en el que más LVI y niveles de GIV-fl altos están asociados con una probabilidad superior de recidiva.
2. Método según la reivindicación 1, que comprende además:
  - determinar una o más características del sujeto, en el que las una o más características incluyen edad del sujeto en el diagnóstico, número de ganglios linfáticos que son positivos para CRC; sexo del sujeto, estado de diferenciación tumoral, estadio T del cáncer; y en qué lado estaba presente el cáncer de colon; y
  - analizar la muestra basándose en el estado de GIV-fl, estado de LVI y las una o más características del sujeto.
3. Método según la reivindicación 1 ó 2, que comprende además:
  - introducir el estado de GIV-fl, estado de LVI y una o más de las características del sujeto en un ordenador; y
  - generar una salida del ordenador, analizando así la muestra.
4. Método según cualquiera de las reivindicaciones 1 a 3, en el que puntuar la expresión de proteína GIV-fl comprende:
  - a. determinar un grado de tinción de GIV-fl positiva para la muestra en una escala de 0 a 3, en el que al grado de tinción positiva se le asigna 0 si del 0% al 10% del área total de la muestra se tiñe de manera positiva, en el que al grado de tinción positiva se le asigna 1 si el 11%-35% del área total de la muestra se tiñe de manera positiva, en el que al grado de tinción positiva se le asigna 2 si el 36%-50% del área total de la muestra se tiñe de manera positiva, y en el que al grado de tinción positiva se le asigna 3 si el 51%-100% del área total de la muestra se tiñe de manera positiva;
  - b. determinar una intensidad de tinción de GIV-fl para la muestra en una escala de 0 (negativa), 1 (débil), 2 (moderada) a 3 (fuerte); puntuación de grado e intensidad de GIV-fl
  - c. sumar el grado de tinción de GIV-fl positiva y la intensidad de tinción de GIV-fl, generando así un valor de puntuación de GIV-fl de desde 0 hasta 6; y
  - d. determinar que la muestra es negativa para GIV-fl si el valor de puntuación de GIV-fl es de 0-2 o determinar que la muestra es positiva para GIV-fl si el valor de puntuación de GIV-fl es de 3-6.
5. Método según la reivindicación cualquiera de las reivindicaciones 1 a 3, en el que puntuar la expresión de

proteína GIV-fl comprende:

a. determinar si un área total de tinción de GIV-fl para la muestra es mayor del 10% o determinar si la intensidad de tinción de GIV-fl es de 3+ (fuerte); y

b. determinar que la muestra es positiva para GIV-fl si el área total de tinción de GIV-fl para la muestra es mayor del 10% con cualquier intensidad de tinción o si la intensidad de tinción de GIV-fl es de 3+ con cualquier porcentaje; o determinar que la muestra es negativa para GIV-fl si el área total de tinción de GIV-fl con una intensidad de tinción de 0, 1+ o 2+ para la muestra es menor del 10%.

6. Método según cualquiera de las reivindicaciones 1 a 7, en el que el método es un método de distinguir entre un sujeto que es probable que responda a tratamiento con quimioterapia o bioterapia de un sujeto que no es probable que responda a tratamiento con quimioterapia o bioterapia,

- particularmente que comprende además seleccionar el sujeto para tratamiento con la quimioterapia o bioterapia si se identifica al sujeto como un sujeto que es probable que responda a tratamiento con quimioterapia o bioterapia; y/o

- particularmente en el que la quimioterapia o bioterapia comprende 5-fluoracilo, leucovorina, panitumumab (VECTIBIX®), cetuximab (ERBITUX®), bevacizumab (AVASTIN®), ziv-aflibercept (ZALTRAP®), irinotecán (CAMPTOSAR®), oxaliplatino (ELOXATIN®) o combinaciones de los mismos.

7. Método según cualquiera de las reivindicaciones 1 a 6,

a) en el que el sujeto es un sujeto que no ha recibido previamente quimioterapia; y/o

b) en el que la muestra comprende una muestra de resección quirúrgica, biopsia tisular o aspirado de aguja fina, particularmente en el que la biopsia tisular comprende una sección tisular; y/o

c) en el que la muestra es una muestra fijada; y/o

d) en el que la muestra es una muestra fijada en formalina, incrustada en parafina (FFPE); y/o

e) en el que la muestra es una muestra de CRC pMMR de estadio IIa o una muestra de CRC pMMR de estadio IIb; y/o

f) en el que poner en contacto la muestra con el agente de unión específica a proteína GIV-fl se realiza con un dispositivo de tinción de tejido automatizado; y/o

g) en el que puntuar la expresión de proteína GIV-fl comprende inspección visual o análisis de imágenes de una imagen digital correspondiente, particularmente en el que la inspección visual se realiza usando microscopía óptica; y/o

h) en el que puntuar la expresión de proteína GIV-fl comprende inspección visual de un área total de la muestra; y/o

i) en el que puntuar la expresión de proteína GIV-fl en la muestra comprende detección directa o indirecta de unión del agente de unión específica a proteína GIV-fl a la muestra; y/o

j) en el que una o más etapas se realizan mediante un ordenador programado de manera adecuada.

8. Kit para realizar el método según la reivindicación 1, que comprende:

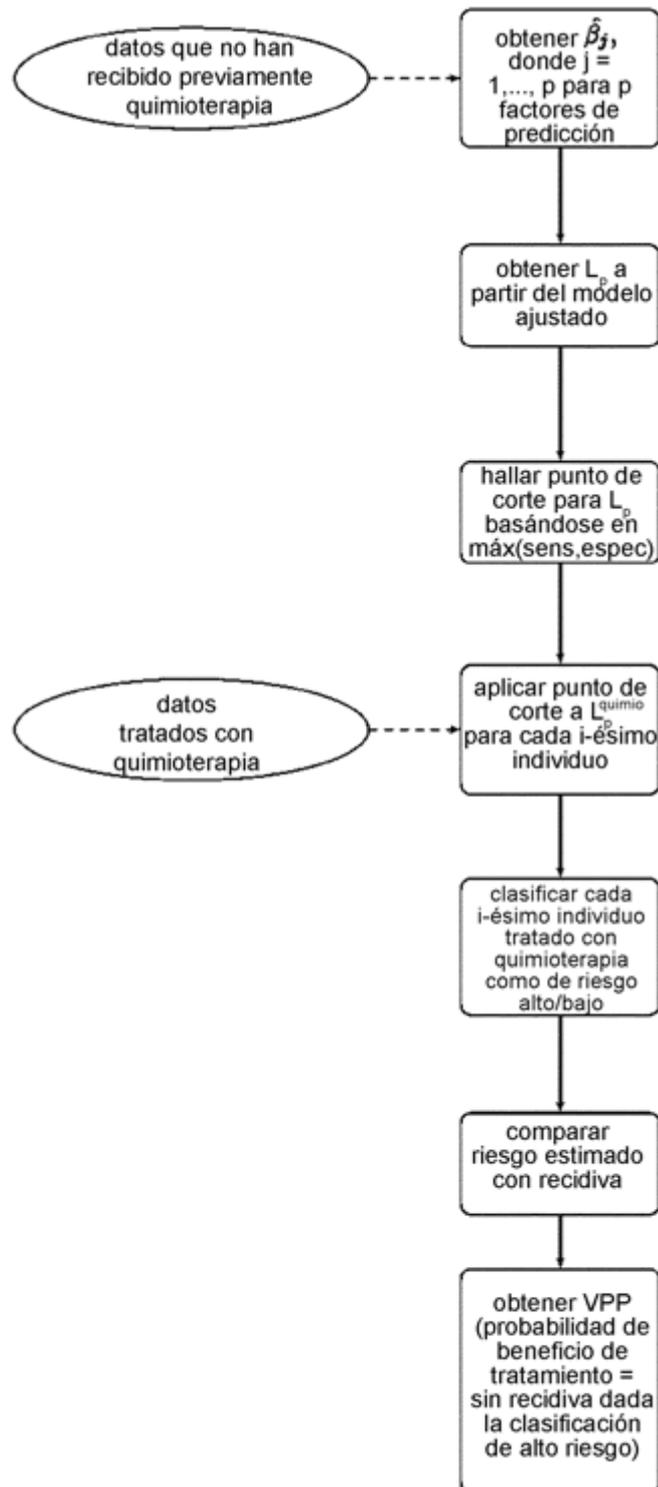
un agente de unión específica a proteína GIV-fl que comprende un anticuerpo frente a GIV-fl, o una sonda de ácido nucleico específica para el ARNm de GIV-fl y al menos un par de cebadores específicos para la secuencia génica de GIV-fl;

un agente de unión específica que permite una determinación de LVI que comprende un anticuerpo específico para CD34 o endotelio linfático;

un agente de unión específica a proteína de reparación de apareamiento erróneo que comprende uno o más anticuerpos específicos para homólogo de mutL 1 (MLH1); segregación posmeiótica aumentada 2 (PMS2); homólogo de proteína MutS 2 Msh2 (MSH2) y/u homólogo de proteína MutS 6 (MSH6); y opcionalmente

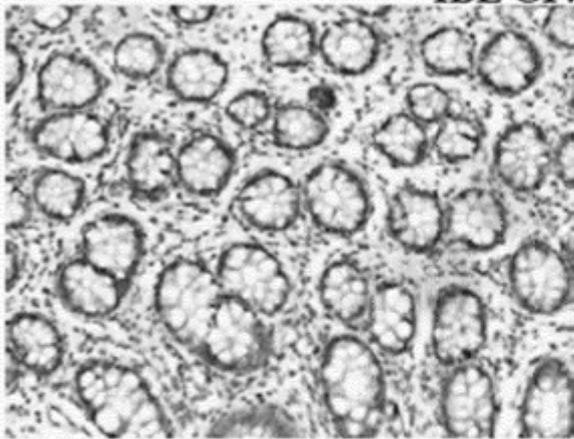
portaobjetos de microscopio;  
anticuerpos secundarios marcados; y  
tampones para IHC.

5



**Fig. 1**

Fig. 2A. Colon normal



**SP173-GIV**

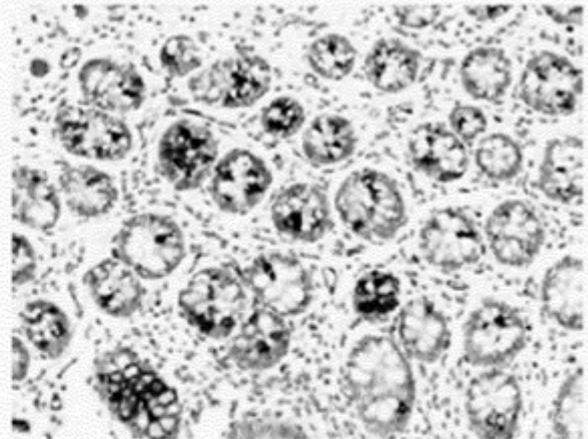
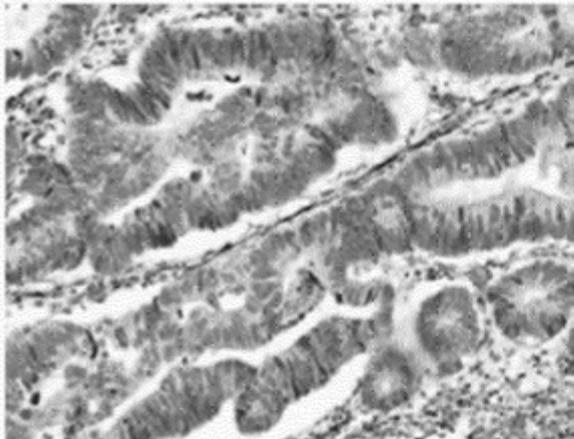


Fig. 2B. Cáncer de colon



**SP173-GIV**

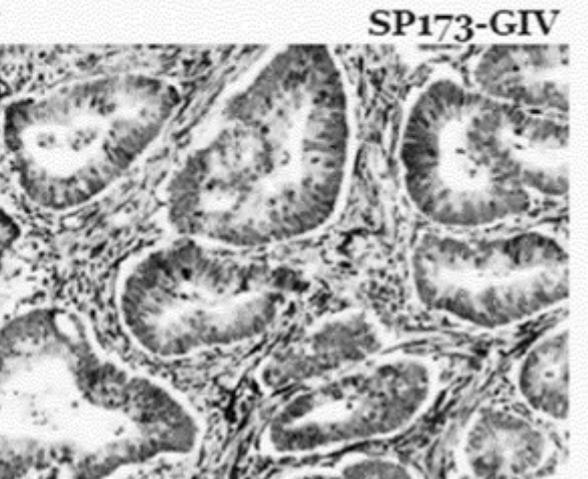
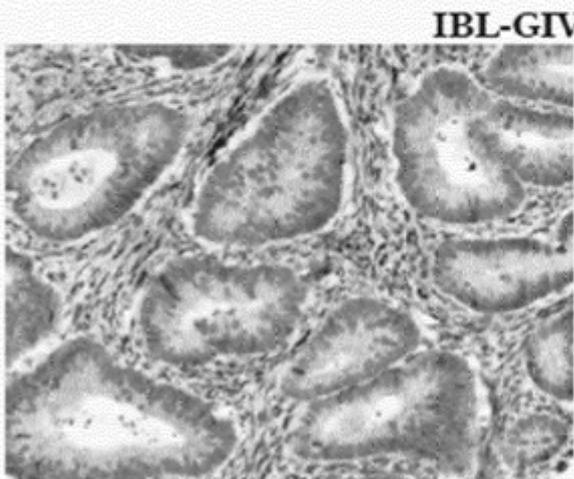
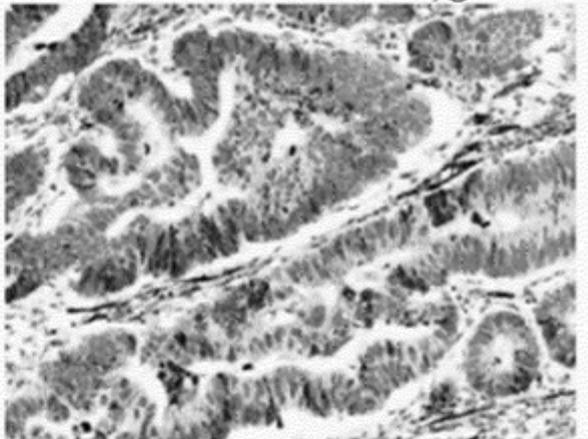


Fig. 2C

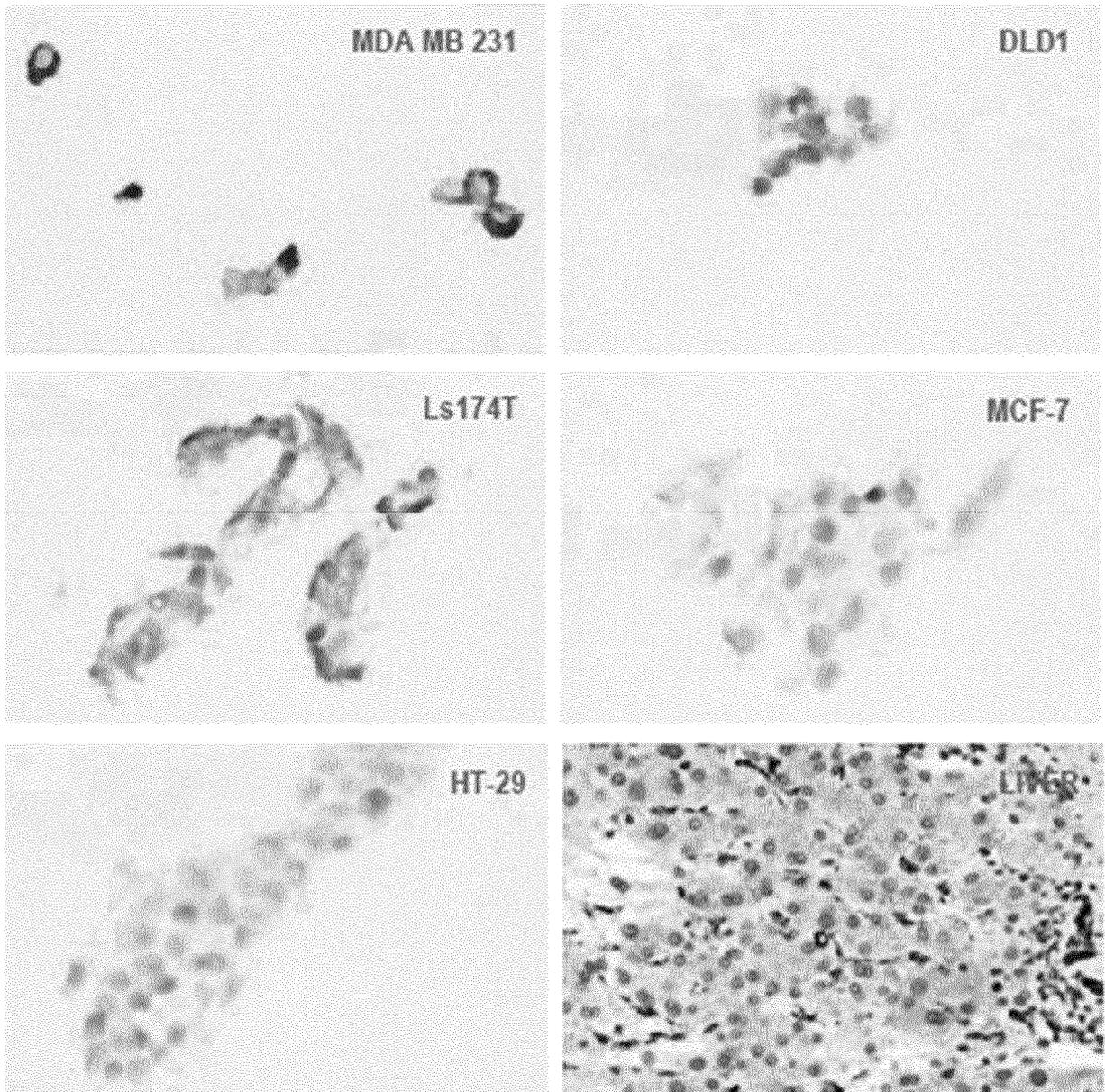


Fig. 3

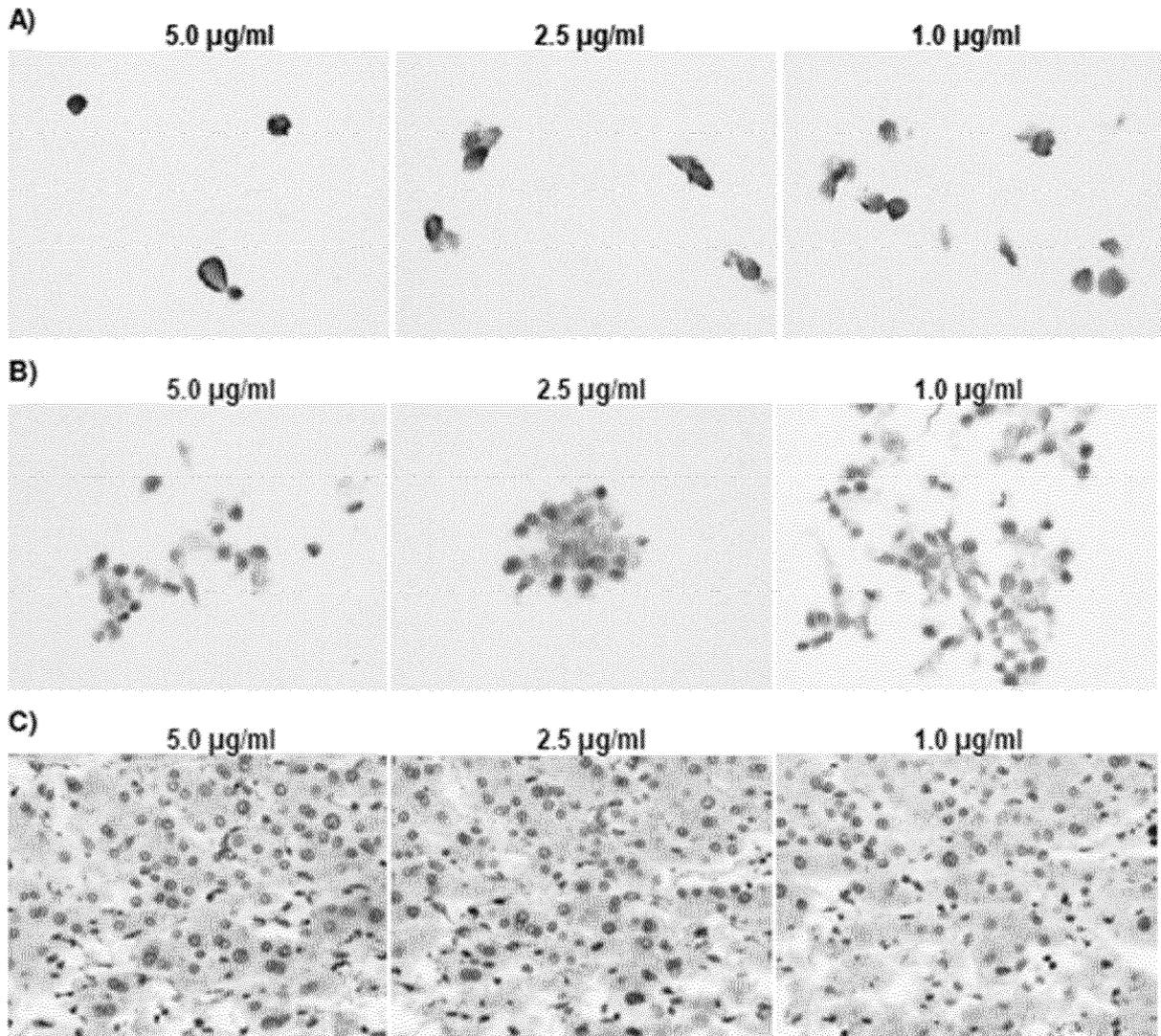
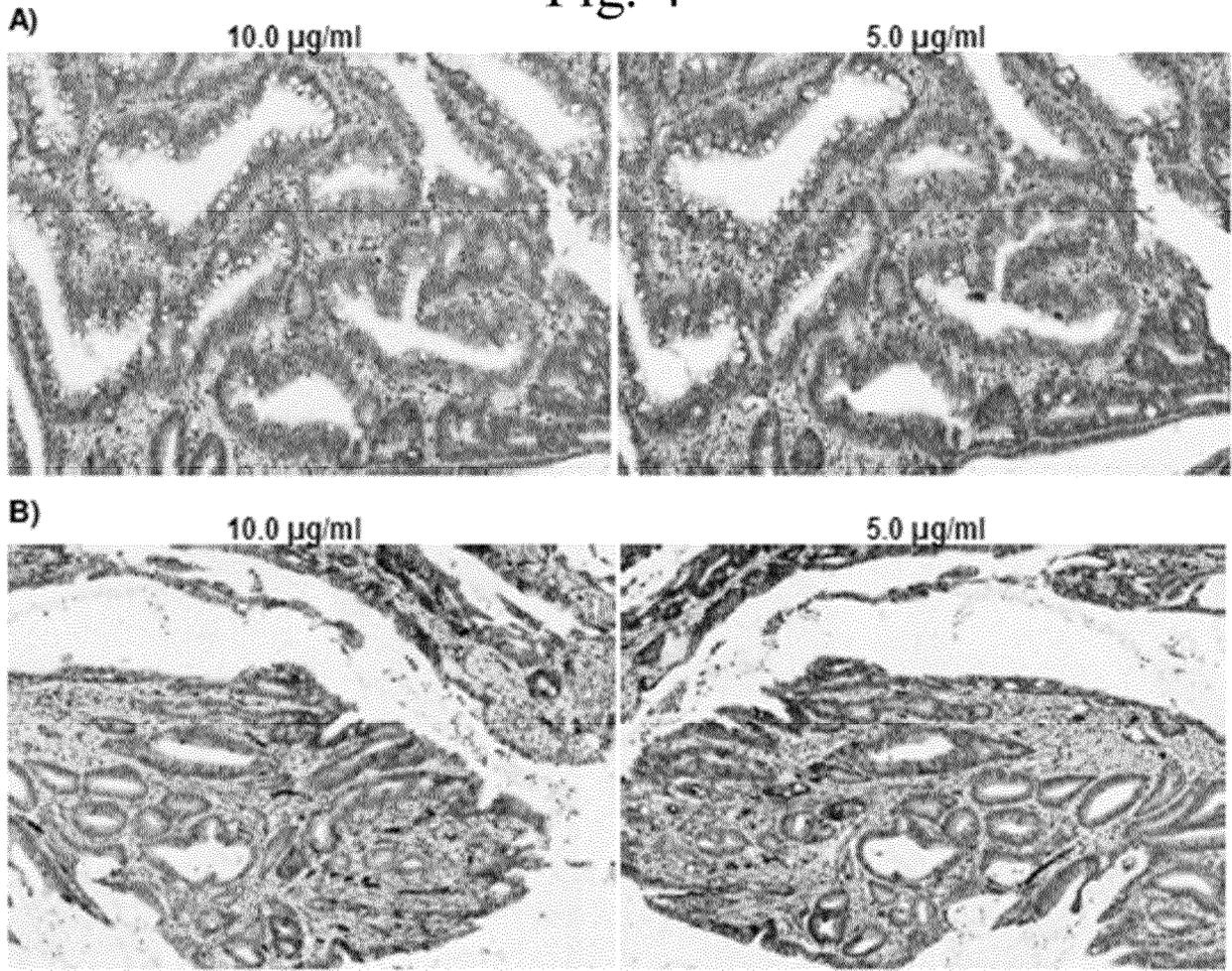
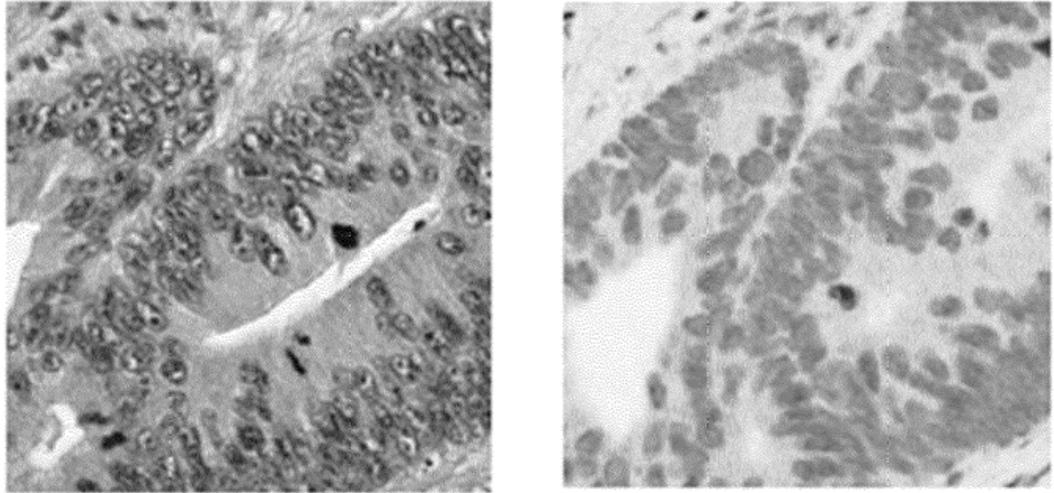


Fig. 4



**Fig. 5A. Tinción negativa para GIV en células tumorales**



**Fig. 5B. Tinción citoplasmática positiva para GIV (1+) en células tumorales**

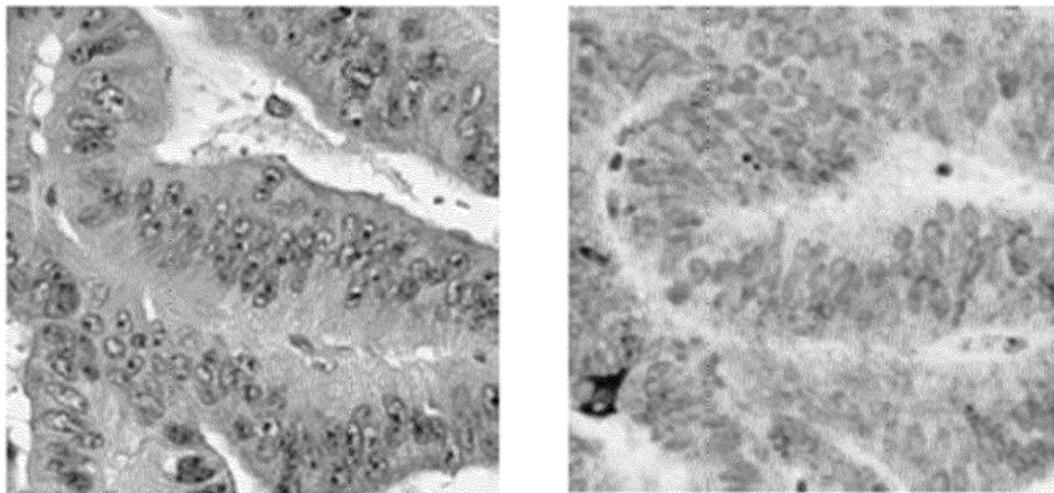


Fig. 5C. Tinción citoplasmática y nuclear positiva para GIV (2+) en células tumorales

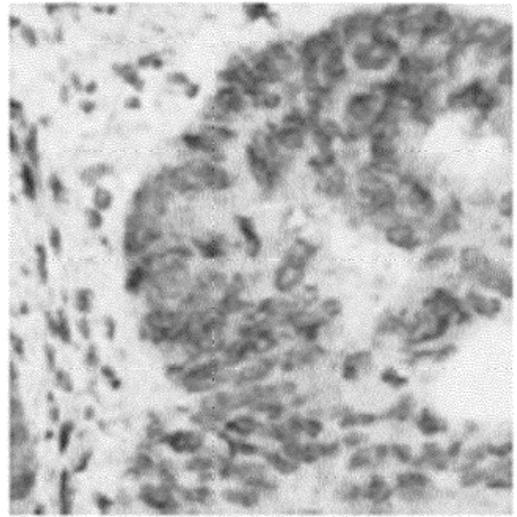
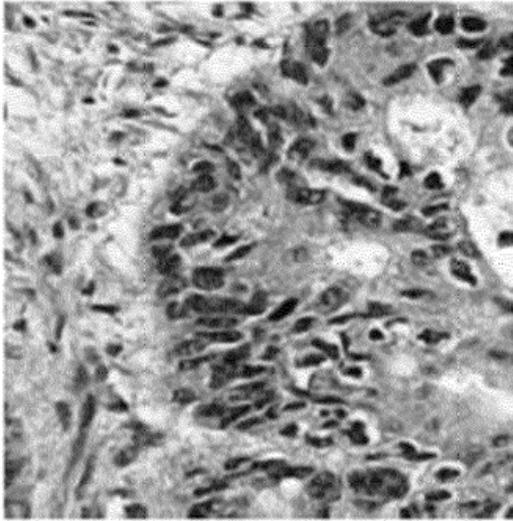


Fig. 5D. Tinción citoplasmática y nuclear positiva para GIV (3+) en células tumorales

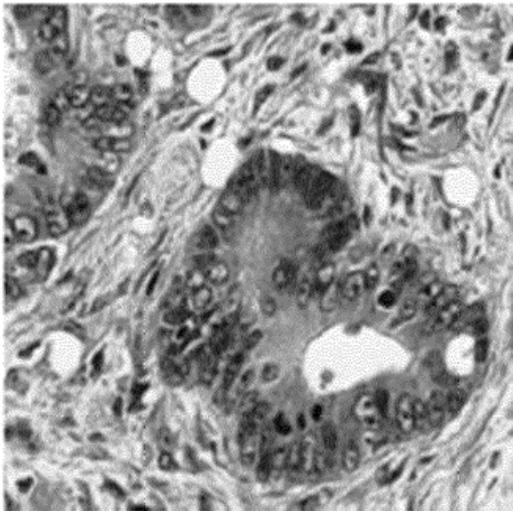


Fig. 6

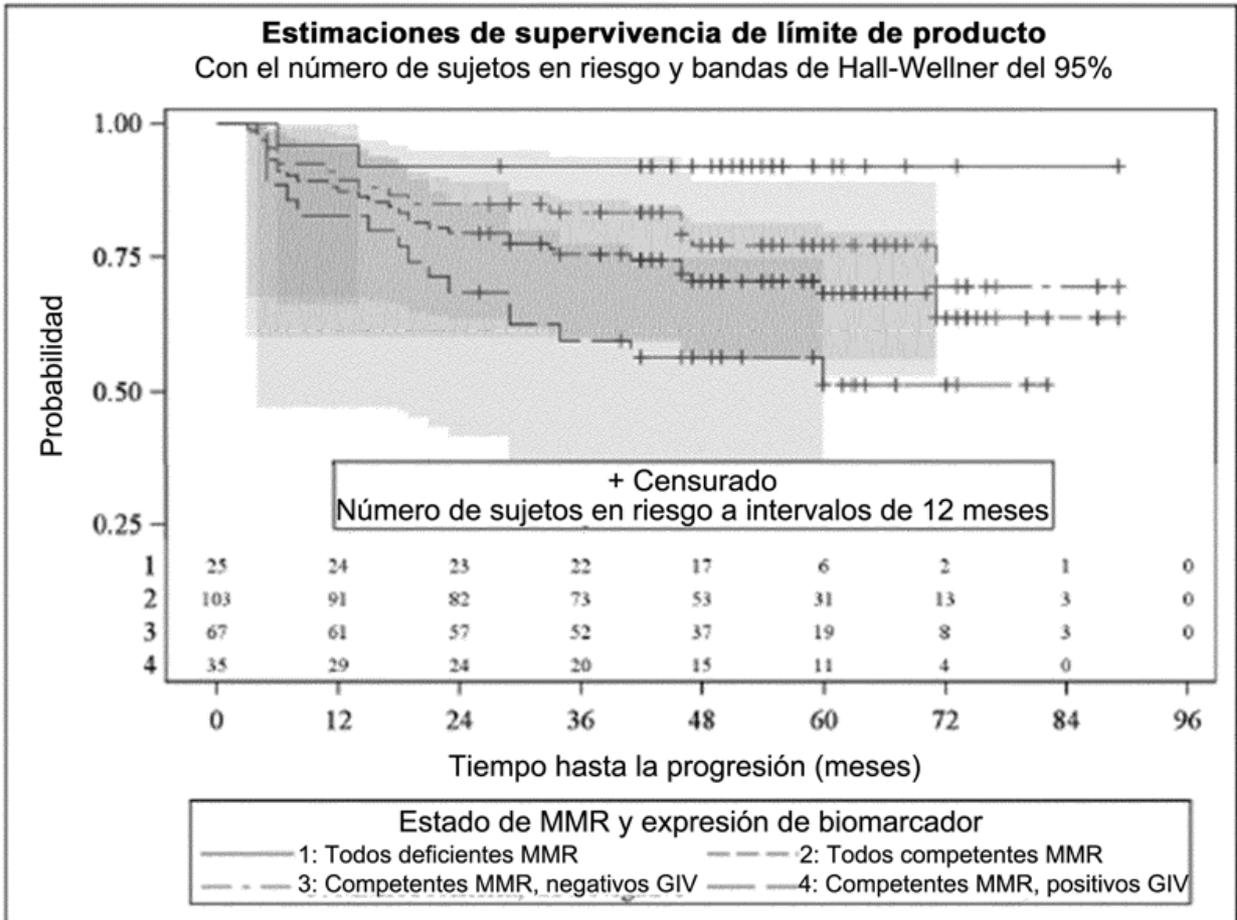
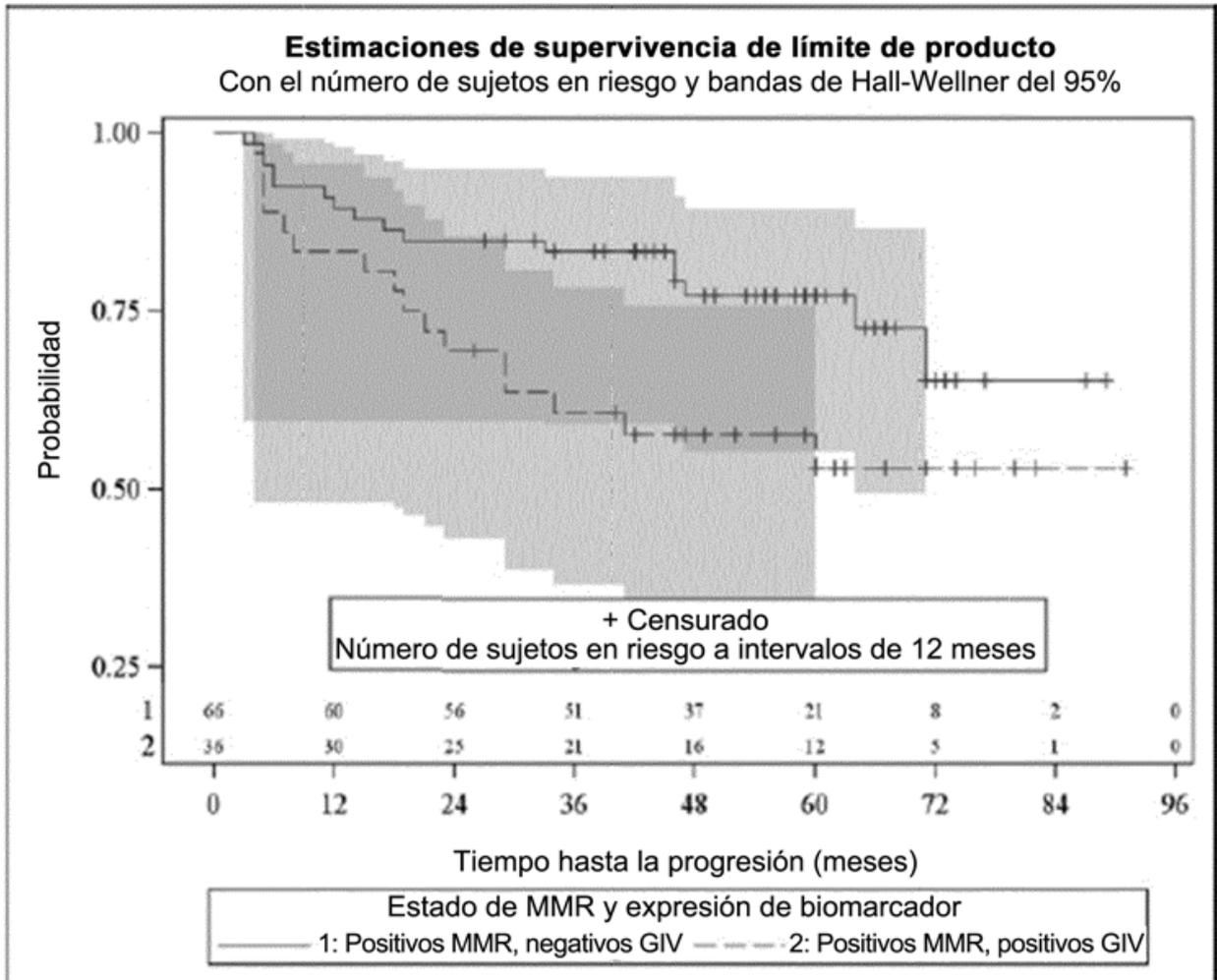
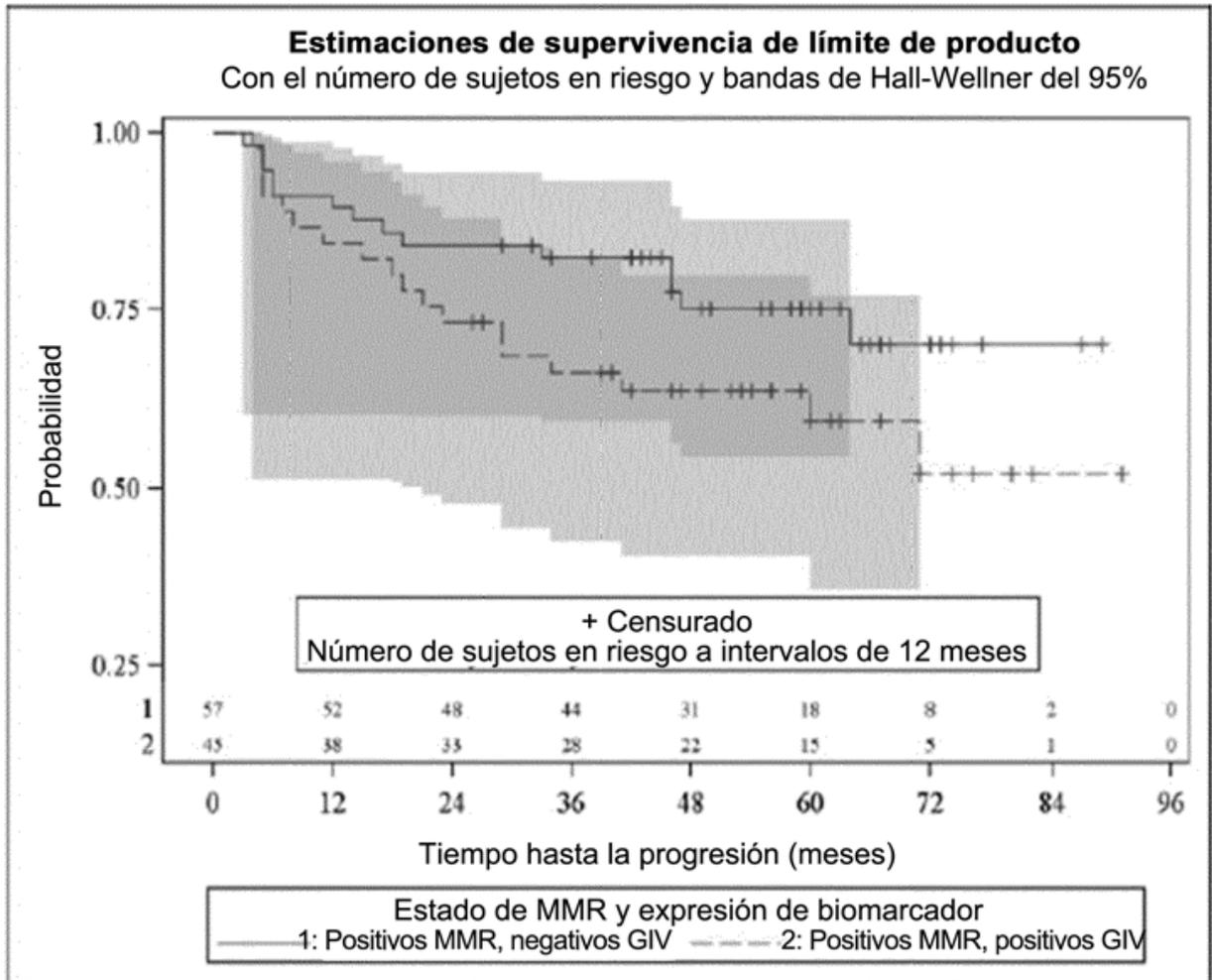


Fig. 7A



Porcentaje positivo (N)	HR (IC del 95%)
35.29 % ( 36 )	2.03 ( 1.02 , 4.07 )

Fig. 7B



Porcentaje positivo (N)	HR (IC del 95%)
44.12 % ( 45 )	1.75 ( 0.87 , 3.52 )

Fig. 8

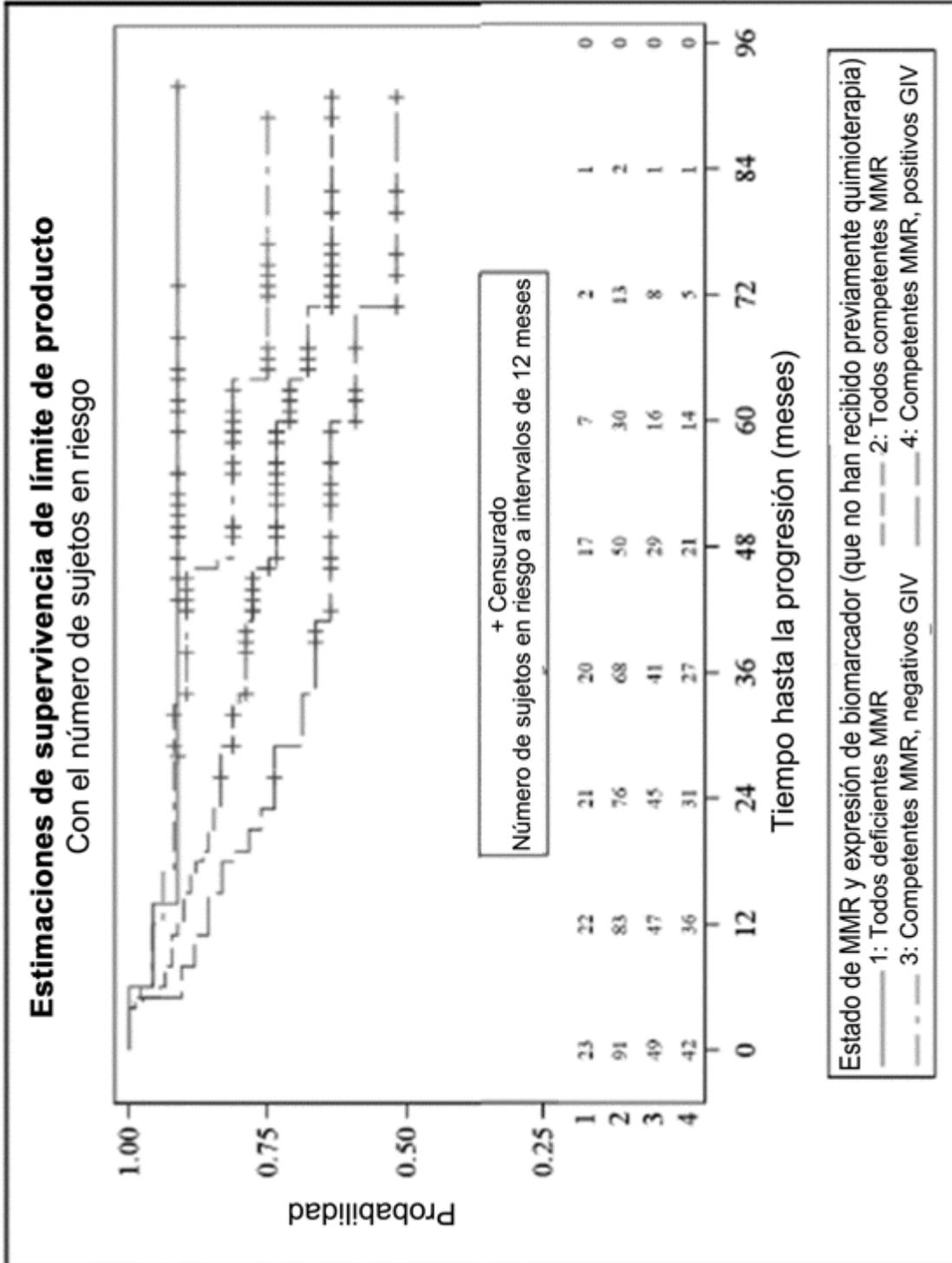


Fig. 9

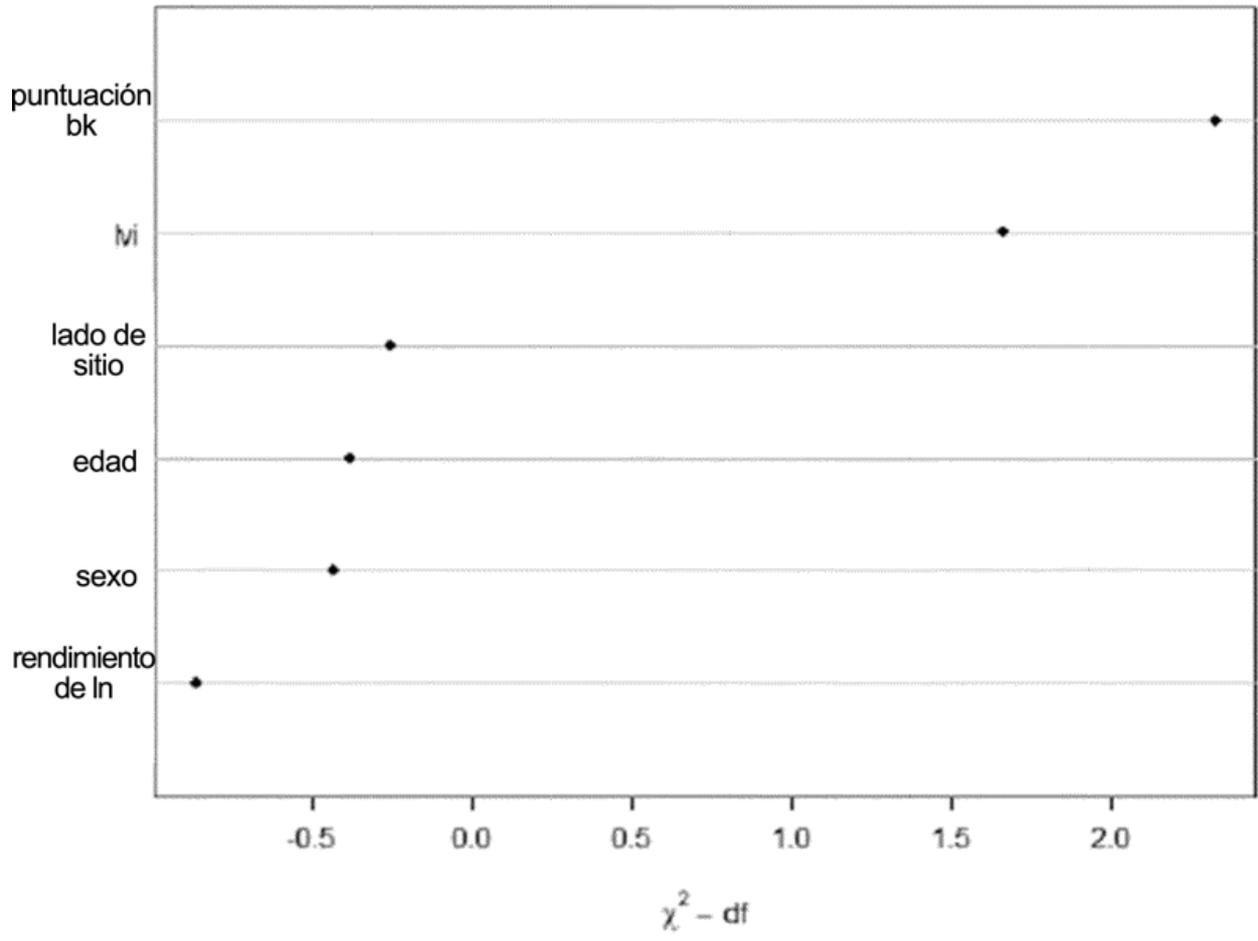
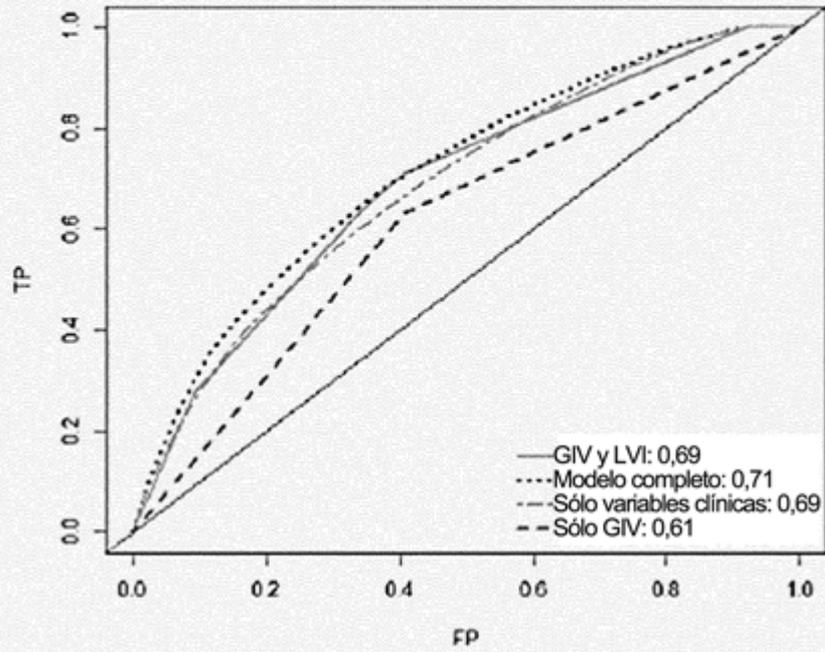


Fig. 10

**A. Supervivencia libre de progresión a los 2 años**



**B. Supervivencia libre de progresión a los 5 años**

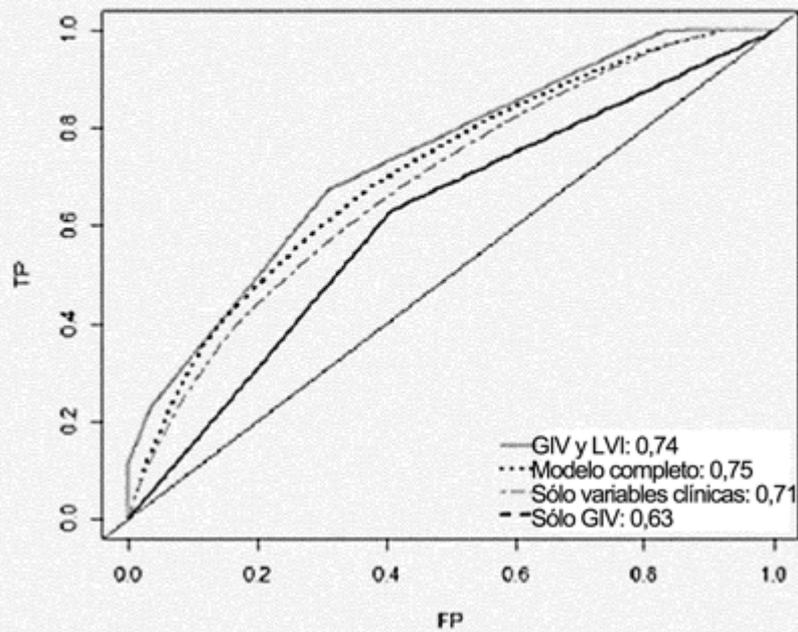


Fig. 11

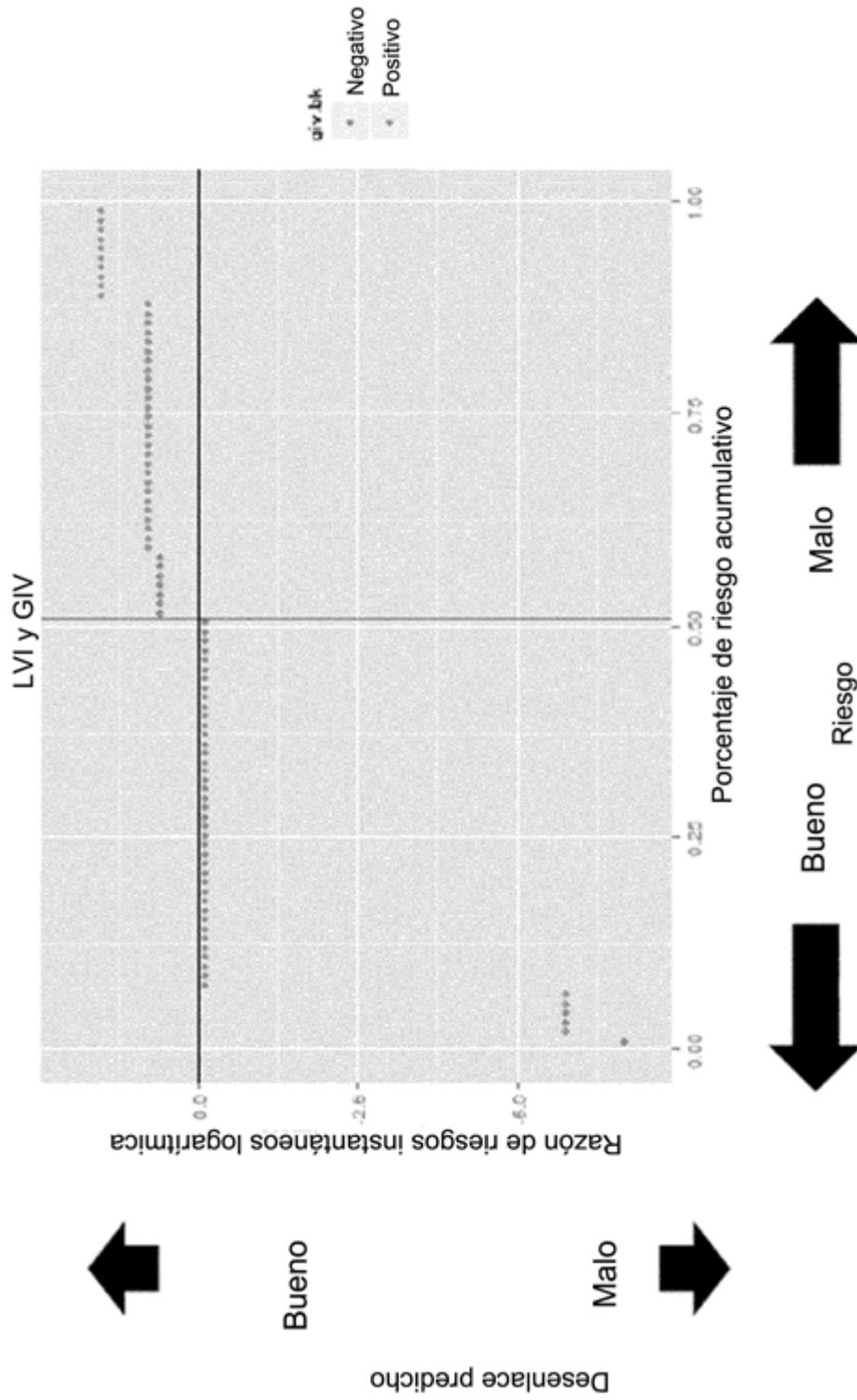
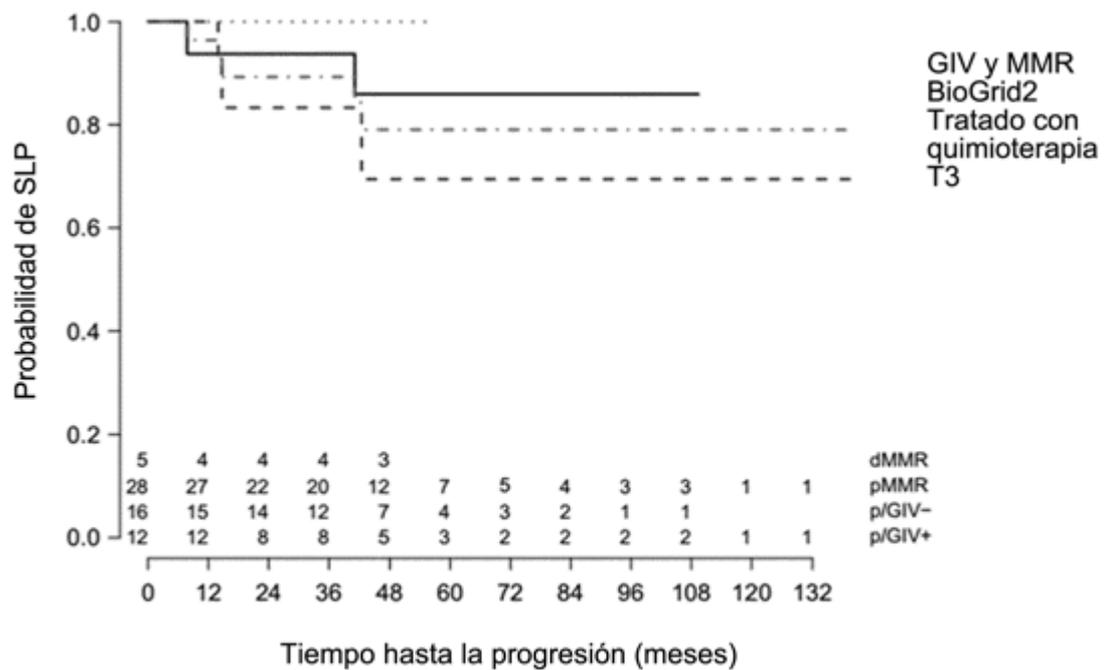
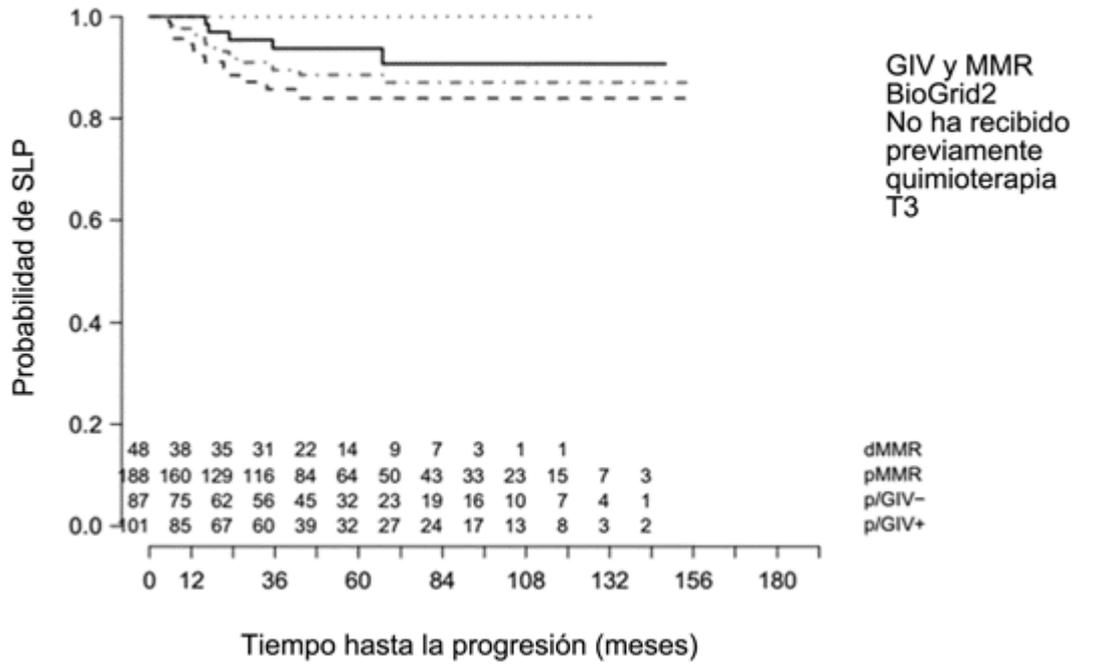


Fig. 12



..... Todos deficientes MMR	- - - Todos competentes MMR
— Competentes MMR, negativos GIV	- - Competentes MMR, positivos GIV

