

19



OFICINA ESPAÑOLA DE
PATENTES Y MARCAS

ESPAÑA



11 Número de publicación: **2 717 073**

21 Número de solicitud: 201731420

51 Int. Cl.:

C12N 9/00 (2006.01)

G01N 33/574 (2006.01)

12

SOLICITUD DE PATENTE

A1

22 Fecha de presentación:

18.12.2017

43 Fecha de publicación de la solicitud:

18.06.2019

71 Solicitantes:

**FUNDACIÓN PROFESOR NOVOA SANTOS
(100.0%)**

**1ª Planta Hospital Materno Infantil Teresa
Herrera, Xubias de Arriba, 84
15006 A Coruña ES**

72 Inventor/es:

**FIGUEROA CONDE-VALVÍS, Angélica;
ROCA-LEMA, Daniel;
MARTÍNEZ IGLESIAS, Olaia Anía;
CASAS PAIS, Alba y
DÍAZ DÍAZ, Andrea**

74 Agente/Representante:

FÚSTER OLAGUIBEL, Gustavo Nicolás

Observaciones:

La lista de secuencias está accesible al público en la página web de la OEPM para su descarga en formato electrónico.

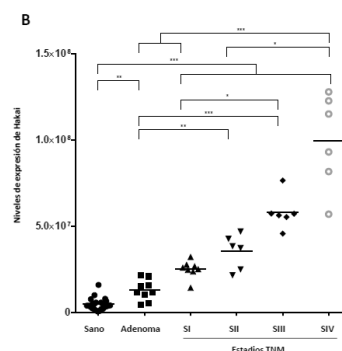
54 Título: **MÉTODO IN VITRO PARA EL DIAGNÓSTICO DE LA PROGRESIÓN DEL CÁNCER DE COLON**

57 Resumen:

Método in vitro para el diagnóstico de la progresión del cáncer de colon.

La presente invención demuestra que la determinación de Hakai proporciona una ventaja sustancial sobre la determinación de otros biomarcadores en el diagnóstico del cáncer de colon y la progresión tumoral del cáncer de colon. En particular, se puede determinar Hakai en una muestra de tejido, en particular, en una muestra de tejido tumoral obtenida de una biopsia y/u otras muestras quirúrgicas, teniendo un significado para el diagnóstico de cáncer de colon y para la progresión tumoral del cáncer de colon, en particular en el carcinoma de colon o adenocarcinoma, en un sujeto.

Fig. 1 (Cont.)



ES 2 717 073 A1

DESCRIPCIÓN

MÉTODO IN VITRO PARA EL DIAGNÓSTICO DE LA PROGRESIÓN DEL CÁNCER DE COLON**TEMA DE LA INVENCION**

5 En general, la presente invención se relaciona con ensayos de diagnóstico y pronóstico. En particular, la presente invención se refiere al uso de Hakai (sólo o en combinación con otros marcadores moleculares y características epidemiológicas y clínicas) como marcador diagnóstico y pronóstico de cáncer de colon, concretamente, como un marcador de diagnóstico de la progresión del cáncer de colon. Hakai también puede ser útil para estimar
10 el riesgo de cáncer de colon, para decidir si se debe iniciar un régimen médico y para determinar si el régimen médico iniciado es eficiente.

ANTECEDENTES DE LA INVENCION

El carcinoma es el tipo más común de cáncer y surge de la transformación de las células
15 epiteliales. Alrededor del 90% de las muertes relacionadas con el cáncer son consecuencia de las metástasis. En las primeras etapas de la progresión tumoral y la metástasis del carcinoma, las células tumorales epiteliales activan un programa crucial llamado transición epitelio-mesénquima (EMT), que se observa con frecuencia en el carcinoma humano. EMT es un programa altamente controlado descrito en primer lugar durante la embriogénesis
20 (EMT tipo I), y también en la cicatrización de heridas y reparación de tejidos (EMT tipo II). Además de estos EMT fisiológicos, este programa puede ocurrir durante condiciones patológicas tales como fibrosis de órganos y progresión tumoral (EMT tipo III). La EMT en cancer se caracteriza por la interrupción de los contactos célula-célula, de las adhesiones célula al sustrato celular y la pérdida de polaridad apico-basal, acompañada por la
25 reorganización del citoesqueleto. Todos estos cambios causan la pérdida del fenotipo epitelial y la adquisición de un fenotipo mesenquimal, que incluye una ganancia de capacidades migratorias e invasivas, importantes para la diseminación de las células cancerosas. Una de las características distintivas mejor caracterizadas de la EMT es la pérdida de la proteína E-cadherina en las células epiteliales.

30 La E-cadherina es el miembro prototipo de las cadherinas clásicas de las uniones adherentes de las células epiteliales, y su pérdida está asociada a la progresión de adenoma a carcinoma, por lo tanto, a la transición de un tumor benigno a un tumor maligno. Además de la pérdida de la proteína epitelial E-cadherina, el marcador mesenquimal N-cadherina se regula positivamente durante la EMT, considerándose este cambio entre las
35 cadherinas un sello distintivo del programa de EMT relacionado con el cáncer. Dada su

relevancia en el proceso de EMT, se ha estudiado ampliamente el mecanismo mediante el cual la E-cadherina se regula negativamente durante la EMT en el cáncer. Hakai es el primer regulador postraducciona descrito de la estabilidad de la proteína E-cadherin.

5 Hakai, una nueva clase de las tres familias de E3 ubiquitin-ligasas de tipo RING-*finger*, contiene un nuevo dominio llamado HYB (Hakai pTyr-binding) por el cual interactúa con la E-cadherina tirosina fosforilada por Src, induciendo su ubiquitinación y degradación, y en consecuencia se produce la alteración de los contactos célula-célula. Frecuentemente, el sistema de ubiquitinación señala para la degradación de la proteína vía lisosoma o
10 proteasoma. En general, se cree que las proteínas citosólicas y nucleares se degradan principalmente a través del proteosoma, mientras que las proteínas de la membrana se dirigen a la destrucción en el lisosoma. De hecho, la degradación de E-cadherina vía lisosoma en las adhesiones célula-célula durante la EMT es el mecanismo descrito en su disminución. Además de la acción de Hakai en los contactos célula-célula, se ha descrito su
15 implicación en la reducción de las adhesiones de las células al sustrato celular y en el aumento de la invasión en células epiteliales *in vitro*.

Hakai también está involucrada en la regulación de la proliferación celular de una manera independiente de E-cadherina, lo que sugiere que nuevos sustratos ubiquitinizados por
20 Hakai deben ser identificados. De hecho, se identificaron recientemente Cortactin y DOK1 como nuevas proteína sustrato de Hakai, describiéndose la interacción y ubiquitinización de una manera dependiente de la fosforilación por Src. Sin embargo, la relevancia fisiológica de estas interacciones (Hakai con estos sustratos) aún no está bien definida. A pesar de las funciones de Hakai dependientes de ubiquitina, se ha propuesto que Hakai puede estar
25 involucrada en varios procesos celulares de una manera independiente de ubiquitinización. De acuerdo con esto, en un análisis proteómico llevado a cabo en *Arabidopsis thaliana*, Hakai se identificó como una proteína que interactúa con varios reguladores post-transcripcionales, incluidos los miembros del complejo N6-metiladenosina (m6A). m6A es una modificación importante de ARNm que se encuentra en eucariotas y que está implicada
30 en procesos tales como el corte y empalme (*splicing*) de ARNm, la estabilidad del ARNm, o la exportación de ARNm entre otros. En este modelo, Hakai es funcionalmente necesario para la metilación del ARNm, lo que sugiere un posible papel similar en los mamíferos. Además, Hakai interactúa con PSF (Factor de *splicing* asociado a la proteína de unión al tracto de polipirimidina), y la sobreexpresión de Hakai aumenta la unión de PSF a transcritos
35 diana de ARNm que codifican proteínas específicas relacionadas con el cáncer. Hasta la fecha, la mayoría de las publicaciones relacionadas con el papel de Hakai sobre la

expresión de E-cadherina se han llevado a cabo en sistemas *in vitro*. Además del papel descrito de Hakai en *A. thaliana*, se realizó otro estudio *in vivo* en *Drosophila melanogaster*, donde se describió que la función de Hakai era más importante en etapas tempranas de la embriogénesis.

5

En la presente invención, hemos ampliado los resultados descritos anteriormente y examinado la función de Hakai en la progresión del cáncer empleando muestras de tejido humano de pacientes en diferentes etapas de la progresión tumoral del cáncer de colon así como el papel funcional de Hakai *in vivo* empleando un modelo de xenoinjertos tumorales en

10

BREVE DESCRIPCIÓN DE LA INVENCION

En el empleo de biomarcadores en el contexto del cáncer de colon, o el carcinoma de colon o el adenocarcinoma, los programas de cribado tienen un enorme potencial. En particular, discriminar si los nódulos de colon, encontrados fortuitamente o detectados en cribado, son

15

maligos o benignos es uno de los problemas clínicos más urgentes en la detección temprana del cáncer de colon. Lamentablemente, las herramientas predictivas actuales para discriminar los nódulos benignos de los malignos son subóptimas, y la investigación sobre el cáncer aún no ha logrado el objetivo de producir un marcador que pueda emplearse de

20

Sorprendentemente, la presente invención demuestra que la determinación de Hakai proporciona una ventaja sustancial sobre la determinación de otros biomarcadores en el diagnóstico del cáncer de colon y la progresión tumoral del cáncer de colon. En particular, se

25

puede determinar Hakai en una muestra de tejido, concretamente, en una muestra de tejido tumoral obtenida de una biopsia y/u otras muestras quirúrgicas, para el diagnóstico de cáncer de colon y la progresión tumoral del cáncer de colon, en particular en el carcinoma de colon o adenocarcinoma, en un sujeto (ver el ejemplo, en particular, primera parte de los resultados y figura 1).

30

Esta invención también pone de manifiesto que la cuantificación de Hakai puede proporcionar información para determinar si un nódulo canceroso indeterminado sospechoso es maligno o no. Además, esta información puede combinarse con datos epidemiológicos y clínicos para generar un modelo de diagnóstico para la predicción de malignidad. Esta

35

invención puede mejorar, de este modo, las eficacias de diagnóstico y cribado, particularmente al discriminar cuál de los nódulos, detectados de forma fortuita o por

cribado, puede necesitar un seguimiento más activo. La aplicación de esta invención se puede emplear así para mejorar el tratamiento clínico de los adenocarcinomas de colon, reduciendo potencialmente el número de procedimientos invasivos potencialmente dañinos llevados a cabo para diagnosticar la enfermedad, tales como las colonoscopias.

5

Además, esta invención también evidencia que la cuantificación de la intensidad de señal de la tinción de inmunohistoquímica de Hakai en células de cáncer de colon se incrementa gradualmente en todas los estadios TNM I-IV en comparación con el epitelio normal sano. Curiosamente, en muestras de adenoma de colon benigno, existe una expresión incrementada de Hakai que es estadísticamente significativa en comparación con los tejidos adyacentes normales. Estos datos indican claramente que Hakai no sólo se puede utilizar como biomarcador para la progresión maligna del cáncer de colon humano, sino que también se puede usar para detectar la tumorogénesis en etapas tempranas mediante su detección en una muestra de tejido, en particular en una muestra de tejido tumoral obtenida de una biopsia y/u otras muestras quirúrgicas. Además, la cuantificación de la intensidad de la señal de Hakai también se puede usar como biomarcador para estimar los diferentes estadios TNM (I-IV) de adenocarcinoma de colon.

En consecuencia, la primera realización de la presente invención se refiere a un método *in vitro* para el diagnóstico de cáncer de colon en un sujeto que comprende: a) determinar el nivel de al menos Hakai en una muestra obtenida del sujeto; comparar el nivel de Hakai determinado en el paso (a) con un nivel de control de referencia de Hakai, y en el que si el nivel de Hakai determinado en el paso (a) es superior al nivel de control de referencia, es indicativo de que el sujeto padece cáncer de colon y/o que los nódulos de colon o el adenocarcinoma presente en el sujeto se consideran malignos.

Además, la presente invención también se refiere a un método *in vitro* para el diagnóstico de la progresión del cáncer de colon en un sujeto que comprende: a) determinar los niveles de expresión de Hakai, en una muestra obtenida del sujeto; y opcionalmente comparar los niveles determinados en el paso (a) con niveles de control de referencia de ese biomarcador, donde la cuantificación de la intensidad o nivel de señal de Hakai, en comparación con los niveles de control de referencia, se usa como biomarcador para estimar los diferentes estadios TNM (I-IV) de los adenocarcinomas de colon.

Además, la presente invención se refiere a un método *in vitro* para el diagnóstico de la progresión del cáncer de colon en un sujeto que comprende: a) determinar los niveles de

expresión de Hakai, en una muestra obtenida del sujeto; y opcionalmente comparar los niveles determinados en el paso (a) con niveles de control de referencia de ese biomarcador, donde la cuantificación de la intensidad o nivel de señal de Hakai, en comparación con los niveles de control de referencia, se usa para detectar la tumorigénesis en etapas tempranas, preferiblemente mediante su detección en una muestra de tejido, en particular en una muestra de tejido tumoral obtenida de una biopsia y/u otras muestras quirúrgicas.

En una realización preferida de la invención, la muestra se selecciona de: sangre, plasma, suero, biopsia y muestras quirúrgicas. La biopsia y las muestras quirúrgicas son particularmente idóneas.

La segunda realización de la presente invención se refiere a un método *in vitro* para decidir o recomendar un tratamiento médico a un sujeto que padece cáncer de colon que comprende: determinar el nivel de al menos Hakai en una muestra obtenida del sujeto; y comparar el nivel de Hakai determinado en el paso (a) con un nivel de control de referencia de Hakai, y si el nivel de Hakai determinado en el paso (a) es mayor que el nivel de control de referencia, se recomienda un tratamiento médico; o si se determina que el nivel de Hakai en el paso (a) no es mayor que el nivel de control de referencia, entonces se recomienda un seguimiento. Alternativamente, la presente invención se refiere a un método *in vitro* para decidir o recomendar un tratamiento médico a un sujeto que padece cáncer de colon que comprende: a) determinar los niveles de expresión de Hakai, en una muestra obtenida del sujeto; y opcionalmente comparar los niveles determinados en el paso (a) con niveles de control de referencia de ese biomarcador, donde la cuantificación de la intensidad o nivel de señal de Hakai, en comparación con los niveles de control de referencia, se usa como biomarcador para estimar los diferentes estadios TNM (I-IV) de los adenocarcinomas de colon y, por lo tanto, para clasificar la muestra como perteneciente a uno de esos estadios, en donde esta clasificación se utiliza para recomendar el tratamiento médico. En una realización favorita de la invención, la muestra se selecciona de: sangre, plasma, suero, biopsia y muestras quirúrgicas. La biopsia y las muestras quirúrgicas son particularmente preferidas.

La tercera realización de la presente invención se refiere a un método *in vitro* para determinar la eficacia de un régimen médico en un paciente ya diagnosticado con cáncer de colon que comprende: a) medir el nivel de al menos Hakai en una muestra obtenida del paciente antes de la administración del régimen médico; b) medir el nivel de Hakai en una

muestra del paciente una vez que comenzó la administración del régimen médico; y c) comparar los niveles de Hakai medidos en los pasos (a) y (b), de tal forma que si el nivel de Hakai medido en el paso (b) es inferior al nivel de Hakai medido en el paso (a), es indicativo de que el régimen médico es efectivo en el tratamiento del cáncer de colon.

5

La cuarta realización de la presente invención se refiere a un método *in vitro* para determinar la eficacia de un régimen médico en un paciente ya diagnosticado con cáncer de colon que comprende: a) medir el nivel de Hakai en una muestra del paciente una vez iniciada la administración del régimen médico; b) comparar el nivel de Hakai medido en el paso (a) con un nivel de control de referencia del Hakai o con el nivel del Hakai en una muestra del mismo paciente, bajo el mismo régimen médico, tomada en un momento posterior a la muestra tomada en el paso (a) y c) en donde, si el nivel de Hakai medido en el paso a) es más alto que el nivel medido en el paso (b), es indicativo de que el régimen médico es efectivo en el tratamiento del colon cáncer.

15

La quinta realización de la invención se refiere al uso de al menos Hakai en el diagnóstico *in vitro* de cáncer de colon o para la determinación *in vitro* de si un nódulo cancerígeno indeterminado o adenoma, identificado por ejemplo mediante el uso de una técnica de imagen (tal como colonoscopia), es o no maligno.

20

Como se explicó anteriormente, es importante tener en cuenta que las técnicas (como una colonoscopia) se utilizan comúnmente en la actualidad para diagnosticar el cáncer de colon y que dichas técnicas indicadas están asociadas con un alto porcentaje de falsos positivos, particularmente en el caso de la detección indeterminada de nódulos. Desafortunadamente, las herramientas actuales para discriminar los nódulos benignos de los malignos son subóptimos, y la investigación sobre el cáncer aún no ha logrado el objetivo de producir un marcador que pueda usarse de forma rutinaria en la clínica. En consecuencia, a un alto porcentaje de pacientes se les diagnostica erróneamente que padecen cáncer de colon y se los somete a procedimientos invasivos innecesarios que aumentan el coste del Sistema Nacional de Salud.

30

En consecuencia, una realización preferida de la presente invención se dirige a técnicas complementarias con la información de diagnóstico/pronóstico obtenida de los biomarcadores, como se describe en las realizaciones uno a cinco de la presente invención. Se enfatiza que esta realización requiere practicar la técnica (colonoscopia) en un paciente y la información obtenida de la técnica indicada se complementa con la información

35

proporcionada por el biomarcador como se describe en las realizaciones de uno a cinco de la presente invención; tal combinación de características aporta mucho más que si fuese un fenómeno natural o una idea abstracta. Dado que la medición del nivel de Hakai ofrece una mayor sensibilidad y especificidad que las técnicas comúnmente utilizadas, como las colonoscopias, el porcentaje de falsos positivos se reduce. En consecuencia, también se reduce el número de técnicas invasivas que generalmente se realizan una vez que se obtiene un resultado positivo de las técnicas. Por lo tanto, la presente invención ofrece significativamente más en comparación con los procedimientos estándares actuales para el diagnóstico de cáncer de colon ya que la combinación de la técnica, en particular colonoscopia, con la determinación del nivel de este biomarcador mejora el diagnóstico de un paciente con riesgo de cáncer de colon que ha sido diagnosticado erróneamente con técnicas previas o de un paciente que presenta un nódulo indeterminado de colon.

En consecuencia, la sexta realización de la invención se dirige a un método *in vitro* para el diagnóstico de cáncer de colon en un sujeto que comprende: a) practicar una colonoscopia en el sujeto para cáncer de colon; y determinar el nivel de al menos Hakai en una muestra apropiada (biopsia o muestra quirúrgica) del sujeto poniendo en contacto la muestra de prueba con un reactivo que se une selectivamente a la proteína Hakai (ver materiales y métodos de los ejemplos); b) comparar el nivel de Hakai determinado en la etapa a) con un nivel de control de referencia de ese biomarcador, y c) donde la toma de imágenes y el paso de determinación (a) pueden tomarse en cualquier orden; y en el que si el nivel de Hakai determinado en el paso (a) es mayor que el nivel de control de referencia, es indicativo de que el sujeto padece cáncer de colon y o que los nódulos presentes en el colon en un sujeto son considerados malignos.

Además, una séptima realización de la invención se dirige a un método *in vitro* para el diagnóstico de cáncer de colon en un sujeto que comprende: a) determinar el nivel de al menos Hakai en una muestra apropiada (biopsia o espécimen quirúrgico) del sujeto poniendo en contacto la muestra con un reactivo que se une selectivamente a la proteína Hakai (ver materiales y métodos de los ejemplos); y b) comparar el nivel de Hakai determinado en el paso a) con un nivel de control de referencia de ese biomarcador, y c) donde sólo si el nivel de Hakai determinado en el paso (a) es mayor que el nivel de control de referencia, es indicativo de que el sujeto padece cáncer de colon y/o que los nódulos de colon presentes en el sujeto se consideran malignos y, por lo tanto, sólo en ese caso, se practicaría una colonoscopia para el cáncer de colon en el sujeto.

Para el objetivo de la presente invención, se proporcionan las siguientes definiciones:

- 5 El término " que comprende " significa que incluye, pero no se limita a, aquellos que sigue a la palabra "que comprende". Por lo tanto, el uso del término "que comprende" indica que los elementos enumerados son requeridos u obligatorios, pero que otros elementos son opcionales y pueden o no estar presentes.
- 10 Por "que consiste en" se entiende que incluye, y se limita a, lo que sigue a la frase "que consiste en". Por lo tanto, la frase "que consta de" indica que los elementos enumerados son requeridos u obligatorios, y que no pueden estar presentes otros elementos.
- 15 El término "referencia" o "nivel de control", cuando se refiere al nivel de la proteína Hakai descrito en la presente invención, puede referirse al nivel observado en pacientes que no padecen cáncer de colon o a cualquier nivel específico que identifique una etapa del cáncer de colon o adenocarcinoma de colon. Es probable que el paciente sufra de cáncer de colon con una sensibilidad y especificidad dadas si los niveles anteriores en el paciente indicados anteriormente son de "referencia", o "nivel de control" en pacientes que no padecen cáncer de colon o en cualquier nivel específico que identifique un estadio del cáncer de colon o adenocarcinoma de colon. Además, es probable que el paciente presente un estadio específico de cáncer de colon con una sensibilidad y especificidad dadas si los niveles en el

20 paciente están por encima, iguales o por debajo del de "referencia" o "nivel de control" indicados que identifican una etapa del cáncer de colon o adenocarcinoma de colon.
- 25 El término "Hakai" es una proteína E3 ubiquitina-ligasa. El gen que codifica la E3 ubiquitina-ligasa Hakai se denomina CBLL1. El proto-oncogen Cbl-1 like [Homo sapiens] La secuencia que codifica Hakai (CDS) contiene 491 aminoácidos como se indica a continuación:

MDHTDNELQGTNSSGSLGGLDVRRRIPIKLISKQANKAKPAPRTQRTINRMPAKAPP
 GDEEGFDYNEEERYDCKGGELFANQRRFPGHLFWDFQINILGEKDDTPVHFCDKC
 30 GLPIKIYGRMIPCKHVFCYDCAILHEKKGDKMCPGCSDPVQRIEQCTRGS LFMCSIV
 QGCKRTYLSQRDLQAHINHRHMRAGKPVTRASLENVHPPIAPPPTEIPERFIMPPDK
 HHMSHIPPKQHIMMPPPPLQHVPHEHYNQPHEDIRAPPAELSMAPPPRSVSQETF
 RISTRKHSNLITVPIQDDSN SGAREPPPPAPAPAHHHPEYQGQPVVSHPHIMPPQQ
 HYAPPPPPPPPI SHPMPPHPQAAGTPHLVYSQAPPPM TSAPPPITPPPGHIIAQMP

PYMNHPPPGPPPPQHGGPPVTAPPPHHYNPNSLPQFTEDQGTLSPFFTQPGGMS
PGIWPAPRGPPPPRLQGPPSQTLPGPHHPDQTRYRPYYQ.

En *Homo sapiens* la proteína E3 ubiquitina-ligasa Hakai isoforma 1 esta codificada por el variante 1 del transcrito. NCBI Reference Sequence: NP_079090.2; que contiene 491 aminoácidos: https://www.ncbi.nlm.nih.gov/protein/NP_079090.2

Variante 1 del transcrito, ARNm: https://www.ncbi.nlm.nih.gov/nucore/NM_024814.3

En *Homo sapiens* la proteína E3 ubiquitina-ligasa Hakai isoforma 2 esta codificada por la variante 3 del transcrito. NCBI Reference Sequence: NP_001271220.1, que contiene 490 aminoácidos: https://www.ncbi.nlm.nih.gov/protein/NP_001271220.1

Variante 3 del transcrito ARNm:

https://www.ncbi.nlm.nih.gov/nucore/NM_001284291.1

En *Homo sapiens* el protoncogen Cbl like 1 (CBLL1), variante 2 del transcrito, es un ARN no-codificante. Esta variante (2) incluye un exon alternativo que introduce un codon stop y hace que la transcripción sea candidata para el proceso de degradación del ARN mensajero mediada por mutación sin sentido o terminadora (NMD). Variante 2 del transcrito ARNm: https://www.ncbi.nlm.nih.gov/nucore/NR_024199.2

- En base a la presente descripción los marcadores, el biomarcador Hakai, se definen principalmente según el nivel de expresión, la diferencia en el nivel de expresión o los cambios en el nivel de expresión en el ARNm o de proteína en comparación con la muestra de referencia a través de varios métodos de análisis cuantitativos, semicuantitativos y/o cualitativos conocidos de vanguardia.
- El análisis cuantitativo, semicuantitativo y cualitativo de los marcadores de cáncer de colon o progresión del carcinoma de colon de acuerdo con la presente divulgación se puede realizar por diversos métodos de vanguardia conocidos que pueden detectar las proteínas y ARNm de forma cuantitativa y cualitativamente. Por ejemplo, los métodos incluyen un western blot, un ELISA, un radioinmunoensayo, una inmunodifusión, una inmunoelectroforesis, una inmunotinción, una inmunoprecipitación, un ensayo de fijación del complemento, un sistema basado en acoplamiento de *beads* o gránulos, en donde el anticuerpo se acopla en solución/suspensión y se detecta por citometría de flujo, o espectrometría de masas, o similares. Estos métodos son conocidos y documentados como la electroforesis capilar basada en chips: Colyer et al. 1997. J Chromatogr A. 781(1-2):271-6; mass spectroscopy: Petricoin et al. 2002. Lancet 359: 572-77; eTag systems: Chan-Hui et al. 2004. Clinical Immunology 111:162-174; microparticle-enhanced nephelometric immunoassay: Montagne et al. 1992. Eur J Clin Chem Clin Biochem. 30:217-22. A

modo de ejemplo, un inmunoensayo empleando un sistema en sandwich como el ELISA (Enzyme Linked Immuno Sorbent Assay), o RIA (Radio Immuno Assay) y similar pueden ser empleados para la detección cuantitativa y/o cualitativa de los marcadores presentes. En este sistema, las muestras reaccionan con el primer anticuerpo fijado a un soporte/substrato sólido como cristal, plástico (por ejemplo poliestireno), polisacáridos, beads, nylon o membrana de nitrocelulosa o una microplaca para formar un complejo el cual luego reacciona con un anticuerpo secundario que es marcado normalmente con agentes que pueden ser detectados directa o indirectamente, como son sustancias radioactivas como H3 o I125, materiales fluorescentes, sustancias quimioluminiscentes, haptenos, biotina, digoxigenina o similar. En algunos casos, los materiales marcados son conjugados con enzimas como son la peroxidasa de rábano, la fosfatasa alcalina o la malato deshidrogenasa que es capaz de producir colores o cambios de color o iluminarse en presencia de los sustratos adecuados.

- También se pueden utilizar otros métodos basados en la reacción inmune. En este sentido, se puede usar una inmunolectroforesis tal como una placa de Ouchterlony, una transferencia de Western, una IE cruzada, una Rocket IE, una fused Rocket IE o una IE de afinidad, que pueden detectar los marcadores simplemente por reacción antígeno-anticuerpo. Los agentes o materiales que pueden usarse en los métodos descritos anteriormente son conocidos de vanguardia. Por ejemplo, los marcadores pueden detectarse mediante una reacción antígeno-anticuerpo, o una reacción con un sustrato, aptámeros peptídicos o de ácidos nucleicos, receptores o ligandos que reconocen específicamente los presentes marcadores, o cofactores o usando espectrometría de masas. Los agentes o materiales que se unen o interactúan específicamente con los marcadores de la presente divulgación se pueden utilizar por medio de un chip o con nanopartículas. Los métodos de inmunoensayo o inmunotinción descritos anteriormente se describen en las siguientes publicaciones: Enzyme Immunoassay, E.; Gaastra, W., Enzyme-linked immunosorbent assay (ELISA), in Methods in Molecular Biology, Vol. 1, Walker, J.M. ed., Humana Press, NJ, 1984 etc. Las intensidades de las señales generadas por el inmunoensayo mencionado anteriormente se analizan luego, y se comparan concretamente con las señales de los controles apropiados para la determinación.
- Además, también pueden ser empleados los métodos para medir el nivel de expresión del biomarcador revelado aquí utilizando un material que detecta al menos la presencia, o la cantidad o el patrón de expresión del ARNm y/o de la proteína

codificada por el gen. Preferiblemente, el material para medir el nivel de expresión del gen es, al menos, un cebador, una sonda, un aptámero y un antisentido que se unen específicamente al menos a una seleccionada del grupo que *consiste en* una secuencia de nucleótidos del gen, una secuencia complementaria de la misma, un fragmento del nucleótido y una secuencia complementaria del mismo. Más preferiblemente, el material para medir el nivel de expresión del gen es al menos uno seleccionado entre los siguientes: oligopéptidos, anticuerpos monoclonales, anticuerpos policlonales, anticuerpos quiméricos, fragmentos de anticuerpos, ligandos, ácidos nucleicos peptídicos (PNA), aptámeros, multímeros de aidez y peptidomiméticos que se une específicamente a al menos un de los polipéptido codificados por una secuencia de nucleótidos del gen, un polipéptido codificado por una secuencia complementaria al mismo, y un polipéptido codificado por un fragmento de la secuencia de nucleótidos. Todavía más preferiblemente, el material para medir el nivel de expresión del gen es un reactivo de detección para medir la expresión génica mediante al menos un método de reacción en cadena de la polimerasa con transcripción inversa, una reacción en cadena de la polimerasa competitiva (PCR competitiva), una reacción en cadena de la polimerasa en tiempo real, un ensayo de protección de nucleasas (RNasa, ensayo de nucleasa S1), un método de hibridación *in situ*, un método de microarrays de ADN, northern-blot, western-blot, un ensayo inmunoabsorbente ligado a enzimas (ELISA), un radioinmunoensayo, un método de inmunodifusión, inmunolectroforesis, inmunotinción en tejido, un ensayo de inmunoprecipitación, un ensayo de fijación del complemento, FACS, espectrometría de masas y microarray de proteínas. Más preferiblemente, el reactivo que detecta al menos la presencia, o cantidad y/o patrón de abundancia de la proteína Hakai útil para practicar cualquiera de los métodos de la presente invención es un anticuerpo o un fragmento del mismo o un aptámero. Preferiblemente, el reactivo indicado se une a cualquiera de los péptidos GPHPDQTRYRPYYQ ó DHTDNELQGTNSSG.

BREVE DESCRIPCIÓN DE LAS FIGURAS

Figura 1: Niveles de expresión de Hakai en muestras humanas de pacientes con cáncer colorrectal. (A) Inmunorreactividad representativa de Hakai en la mucosa colónica normal, adenoma y cáncer colorrectal (estadios I-IV de TNM). Las imágenes se obtuvieron con un objetivo 20x. **(B)** Cuantificación estadística de la intensidad de tinción de Hakai en células de cáncer epitelial en diferentes estadios de cáncer de colon y en tejidos de

adenoma y colon normal (mucosa colónica normal, n=26; adenoma, n=10; cáncer colorrectal, n=20 de todos los estadios). Se cuantificaron cinco fotografías de cada tejido. Los datos se representan como diagrama de dispersión. Los valores son medias $\pm$ SEM (Error estándar de la media) de la intensidad de señal de la tinción por área. La calibración y cuantificación de las imágenes se realizaron con el software ImageJ. Los análisis de prueba de corrección de Kruskal-Wallis con Tukey muestran diferencias estadísticamente significativas en cáncer colorrectal (TNM, SI-IV) con respecto a las muestras sanas de tejido adyacente (*p < 0,05; **p < 0,01; ***p < 0,001). Barra de escala 125 μ m.

Figura 2: Hakai induce la formación de tumores *in vivo*. (A) Fotografías representativas después de 38 días de inyección subcutánea de 5×10^6 células de MDCK o células MDCK que sobreexpresan Hakai (Hakai-MDCK) en ratones desnudos. (B) Crecimiento tumoral en ratones atímicos inyectados con células MDCK o Hakai-MDCK. Los tumores se midieron dos veces por semana, como se describe en Materiales y Métodos y los resultados se representan como media $\pm$ SEM (*p < 0,05). (C) Tinción representativa H&E (Hematoxilina&Eosina) de teratoma y tumores originados por células MDCK o Hakai-MDCK, respectivamente. Las fotos fueron tomadas con un objetivo 10x.

Figura 3: Acción de Hakai sobre la proliferación e invasión tumoral en un modelo de xenoimplantes de tumores en ratón. (A) Inmunohistoquímica para la expresión de ki67 en teratoma originados por células MDCK y tumores originados por células Hakai-MDCK. Se tomaron imágenes representativas con el objetivo 40x (panel izquierdo) y se realizó la cuantificación del porcentaje de células positivas (panel derecho). Barra de escala, 500 μ m. (B) Células mitóticas en xenoinjertos de células MDCK y de Hakai-MDCK. Células mitóticas en imágenes representativas con tinción H&E tomadas con un objetivo 40x (panel izquierdo, flechas) y la cuantificación de las mitosis correspondientes a los xenoinjertos (panel derecho). Barra de escala, 500 μ m. (C) Tinción de H&E que muestra un vaso sanguíneo infiltrado con células tumorales originado por la inyección de Hakai-MDCK en ratones. Fotografía tomada con un objetivo 20x. (D) Tinción H&E que muestra infiltración muscular por células Hakai-MDCK. Foto tomada con un objetivo de 10x. (E) La tinción H&E que muestra un tumor primario (flechas) y una metástasis local (puntas de flecha) originadas por las células Hakai-MDCK; se indican las áreas con línea discontinua. Foto tomada con un objetivo de 10x. Barras de escala, 500 μ m. Las cuantificaciones se muestran como media $\pm$ SEM (**p < 0,01; *** p < 0,001).

DESCRIPCIÓN DETALLADA DE LA INVENCION**EJEMPLOS****5 MATERIALES AND MÉTODOS****Muestras de tejidos humanos**

Las biopsias de cáncer de colon se obtuvieron del departamento de Anatomía Patológica del Complejo Hospitalario Universitario A Coruña (CHUAC), con el consentimiento informado firmados por todos los pacientes y el proyecto de investigación fue aprobado por el Comité de Ética de Investigación institucional siguiendo los procedimientos éticos estándares del reglamento español (Ley Orgánica de Investigación Biomédica, 14 de julio de 2007). Las muestras de parafina fueron provistas por el biobanco del CHUAC, integrado en la Red Española de Biobancos de Hospitales. Se emplearon veinte tejidos de cáncer de colon fijados en formalina y embebidos en parafina (FFPE, 4µm) de los estadios I-IV de TNM de progresión del cáncer de colon, diez de adenomas y los tejidos sanos de colon adyacentes de los mismos pacientes para realizar la inmunohistoquímica con el anticuerpo anti-Hakai.

Anticuerpos y materiales

El anticuerpo policlonal anti-Hakai de conejo (Hakai-2498) se generó utilizando los péptidos (GPHHPDQTRYRPYYQ y DHTDNELQGTNSSG) como antígenos (Eurogentec, Seraing, Bélgica), y fue proporcionado por el Dr. Fujita. Para la inmunohistoquímica de biopsias humanas se empleó una dilución del anticuerpo de Hakai de 1/700.

Histología e Inmunohistoquímica

Secciones de 4 µm de muestras de adenocarcinoma de colon se desparafinaron, rehidrataron y tiñeron con hematoxilina y eosina (H&E) utilizando procedimientos estándar. También se emplearon secciones desparafinizadas e hidratadas (4 µm) de tumores para inmunohistoquímica. La exposición antigénica se llevó a cabo con tampón citrato o EDTA siguiendo las instrucciones y se inhibió la actividad de peroxidasa endógena con inhibidor de peroxidasa (DakoCytomation). Las muestras se bloquearon durante 1 hora a temperatura ambiente con 0,2% de BSA y 0,1% de TX-100 y se incubaron durante la noche a 4°C en una cámara húmeda con el anticuerpo primario de Hakai. A continuación, los portas se incubaron durante toda la noche a temperatura ambiente con el anticuerpo secundario y se revelaron con DAB (kit DakoReal Envision). Los portas se contra-tiñeron con Hematoxilina de Gill y se montaron con DePeX (Serva). Las imágenes se tomaron con un microscopio Olympus en los objetivos indicados en las leyendas de las figuras.

Se tomaron cinco imágenes de cada sección con un microscopio Olympus y la tinción positiva se cuantificó con el programa Image J. Los resultados se expresan como media $\pm$ SEM de cada estadio TNM de la enfermedad y se representan en un gráfico de diagrama de dispersión.

5

Análisis estadístico

La cuantificación de las inmunohistoquímicas humanas no siguió una distribución normal, por lo tanto, empleamos la prueba Kruskal-Wallis con corrección de Tukey. La significación de la prueba t-Student y Kruskal-Wallis con la corrección de Tukey entre los grupos experimentales indicados en las figuras se muestra empleando * $p < 0.05$, ** $p < 0.01$ y *** $p < 0.001$.

10

RESULTADOS.

1. Niveles de expresión de Hakai en diferentes estadios TNM de cáncer de colon.

Mediante el uso de muestras de carcinoma humano de colon, mostramos el análisis que compara pares de tejidos sanos de colon humano con adenoma y con diferentes estadios TNM (I-IV) de adenocarcinomas de colon, como se muestra en una imagen representativa (Figura 1A). La cuantificación de la intensidad de señal de la tinción de inmunohistoquímica de Hakai se muestra en la Figura 1B. Las intensidades de tinción de Hakai en las células cancerosas se incrementaron gradualmente en todas las etapas I-IV en comparación con el epitelio normal sano. Curiosamente, en muestras de adenoma de colon benigno, la expresión de Hakai está estadísticamente incrementada en comparación con los tejidos normales. Estos datos sugieren que Hakai no sólo se puede usar como un biomarcador para la progresión maligna del cáncer de colon humano, sino que también puede detectar la tumorogénesis en etapas tempranas

20

25

2. Hakai promueve la formación de tumores, la proliferación y la invasión *in vivo*

Para obtener más información sobre el posible papel de Hakai durante la progresión tumoral *in vivo*, se inyectaron células MDCK y Hakai-MDCK por vía subcutánea en el flanco de ratones desnudos. Las células Hakai-MDCK formaron tumores primarios en todos los sitios de inyección mientras que las células parentales MDCK no pudieron hacerlo, como se muestra en la Figura 2A. Se midió el crecimiento tumoral inducido por células Hakai-MDCK, que muestra un aumento en el volumen tumoral a los 38 días después de la inyección. Se detectaron tumores medibles en los ratones inyectados con 5×10^6 células de Hakai-MDCK tras 18 días de la inyección (Figura 2B). Todos los ratones inyectados con células MDCK estaban libres de tumor, por el contrario, todos los ratones inoculados con Hakai-MDCK

30

35

mostraron una formación de tumor local, y después de este tiempo todos los ratones fueron sacrificados. El análisis histológico de los xenoinjertos tumorales confirmó aún más el efecto biológico de la sobreexpresión de Hakai. Curiosamente, al inyectar 5×10^6 células MDCK, observamos una formación de teratoma (Figura 2C), sin embargo, estos hallazgos no se observaron inyectando 1×10^6 células (resultados no mostrados). Nuestros resultados están en concordancia con los resultados publicados previamente sobre cómo las células MDCK mantienen la capacidad de regenerar estructuras similares a túbulo renales *in vivo* al inyectarse en ratones desnudos atímicos, manteniendo las adhesiones celulares y la diferenciación. Por el contrario, los tumores inducidos por las células Hakai-MDCK mostraron un cambio significativo en el fenotipo, observándose células de carcinoma indiferenciadas y en forma de huso. Además, la morfología de los xenoinjertos de Hakai-MDCK se modificó drásticamente observándose un aumento en el tamaño del núcleo, presentado tamaño y forma irregular y nucléolos prominentes. Por el contrario, se ve una reducción del tamaño del citoplasma. Todos estos cambios morfológicos son característicos de las células cancerosas (Figura 2C).

La cuantificación del potencial de crecimiento de estos tumores se caracterizó mediante el estudio de la inmunohistoquímica empleando el marcador de proliferación Ki67 y el índice mitótico. Los tumores originados por las células Hakai-MDCK fueron enormemente proliferativos, observándose más del 80% de células positivas para el marcado Ki67 (Figura 3A). Estos resultados se confirmaron con la cuantificación del índice mitótico, un parámetro comúnmente utilizado en el diagnóstico clínico, que muestra un alto número de mitosis en células, detectadas en secciones de tumor originados por Hakai-MDCK, teñidas con H&E (Figura 3B, flechas). En conclusión, se observó un marcado aumento de ambos marcadores de proliferación en los tumores Hakai-MDCK, lo que confirma que las células Hakai-MDCK inducen tumores con una tasa proliferativa extremadamente alta.

Por otro lado, se encontraron células Hakai-MDCK infiltrantes en los vasos sanguíneos (Figura 3C) así como invasión en músculos adyacentes (Figura 3D) apoyando aún más la implicación de Hakai en el proceso de invasión *in vivo*. Además, se encontró invasión localizada del tumor primario en los ratones tumorales (Figura 3E), un hecho de especial relevancia que sugiere un comportamiento extremadamente agresivo de las células Hakai-MDCK, ya que los ratones con tumores localmente invasivos son más propensos a desarrollar metástasis y también tienden a tener un peor pronóstico.

Conclusión

Estos análisis evidencian la capacidad de diagnóstico de la cuantificación de Hakai en muestras biológicas (sólo o en combinación con otros marcadores moleculares y características epidemiológicas y clínicas) para discriminar qué nódulos cancerosos son malignos y determinar la etapa de malignidad de esos nódulos cancerosos. La aplicación de este enfoque multimodal predice el cáncer de colon de forma más precisa y puede utilizarse para la identificación de los sujetos que necesitan un seguimiento más activo, lo que mejoraría el tratamiento clínico de los nódulos cancerígenos al reducir el número de procedimientos innecesarios.

REIVINDICACIONES

1. El uso de, al menos, Hakai en el diagnóstico *in vitro* de la progresión del cáncer de colon o para la determinación *in vitro* de los estadios TNM (I-IV) de un nódulo de adenocarcinoma de colon o de adenoma.
2. Método *in vitro* para el diagnóstico de cáncer de colon en un sujeto *que comprende*:
 - a) determinar el nivel de al menos Hakai en una muestra obtenida del sujeto poniendo en contacto la muestra de prueba con un reactivo que detecta al menos el nivel de la proteína Hakai; comparar el nivel de Hakai determinado en el paso (a) con un nivel de control de referencia de ese biomarcador, donde si el nivel de Hakai determinado en el paso (a) es mayor que el nivel de control de referencia, es indicativo que el sujeto padece cáncer de colon y/o que los nódulos de colon o el adenocarcinoma presente en el sujeto se consideran malignos.
3. Método *in vitro* para el diagnóstico de la progresión del cáncer de colon en un sujeto *que comprende*:
 - a) determinar los niveles de expresión de Hakai en una muestra obtenida del sujeto poniendo en contacto la muestra de prueba con un reactivo que detecta al menos el nivel del Hakai proteína; y opcionalmente comparar los niveles determinados en el paso (a) con niveles de control de referencia de ese biomarcador, donde la cuantificación de la intensidad o nivel de señal de Hakai, opcionalmente en comparación con los niveles de control de referencia, se usa como biomarcador para estimar los diferentes estadios de TNM (I-IV) de los adenocarcinomas de colon.
4. Método *in vitro* para el diagnóstico de la progresión tumoral del cáncer de colon en un sujeto *que comprende*:
 - a) determinar los niveles de expresión de Hakai en una muestra obtenida del sujeto poniendo en contacto la muestra de prueba con un reactivo que detecta al menos el nivel de proteína de Hakai; y opcionalmente comparar los niveles determinados en el paso (a) con los niveles de control de referencia de ese biomarcador, donde la cuantificación de la intensidad o nivel de señal de Hakai, opcionalmente en comparación con los niveles de control de referencia, se usa para detectar la tumorogénesis en etapas tempranas, como estadio I de TNM.
5. Método *in vitro* para decidir o recomendar un tratamiento médico a un sujeto que padece cáncer de colon *que comprende*: determinar el nivel de al menos Hakai en

una muestra obtenida del sujeto poniendo en contacto la muestra de prueba con un reactivo que detecta al menos el nivel de la proteína Hakai; y comparar el nivel de Hakai determinado en el paso (a) con un nivel de control de referencia de ese Hakai, y en el que si el nivel Hakai determinado en el paso (a) es superior al nivel de control de referencia, se recomienda un tratamiento médico o si el nivel de Hakai determinado en el paso (a) no es más alto que el nivel de control de referencia, entonces se recomienda un seguimiento.

6. Método *in vitro* para decidir o recomendar un tratamiento médico a un sujeto que padece cáncer de colon *que comprende*: a) determinar los niveles de expresión de Hakai en una muestra obtenida del sujeto poniendo en contacto la muestra de prueba con un reactivo que detecta al menos el nivel de la proteína Hakai; y opcionalmente comparar los niveles determinados en el paso (a) con los niveles de control de referencia de ese biomarcador, donde la cuantificación de la intensidad o nivel de Hakai, en comparación con los niveles de control de referencia, se usa como un biomarcador para identificar los diferentes estadios TNM (I-IV) de los adenocarcinomas de colon y, por lo tanto, para clasificar la muestra como perteneciente a una de dichos estadios, siendo empleada la clasificación mencionada para recomendar el tratamiento médico.

7. Método *in vitro* para determinar la eficacia de un régimen médico en un paciente ya diagnosticado con cáncer de colon *que comprende*: a) medir el nivel de al menos Hakai en una muestra obtenida del paciente antes de la administración del régimen médico poniendo en contacto la muestra prueba con un reactivo que detecta al menos el nivel de la proteína Hakai; y b) medir el nivel de dicho Hakai en una muestra del paciente una vez comenzada la administración del régimen médico; y c) comparar los niveles de Hakai medidos en los pasos (a) y (b), de tal forma que si el nivel de Hakai medido en el paso (b) es inferior al nivel de Hakai medido en el paso (a), es indicativo de que el régimen médico es efectivo en el tratamiento del cáncer de colon.

8. Método *in vitro* para determinar la eficacia de un régimen médico en un paciente ya diagnosticado con cáncer de colon *que comprende*: a) medir el nivel de Hakai en una muestra del paciente una vez que comenzó la administración del régimen médico poniendo en contacto la muestra de prueba con un reactivo que detecta al menos el nivel de la proteína Hakai; y b) comparar el nivel de Hakai medido en el paso (a) con

un nivel de control de referencia del Hakai o con el nivel del Hakai en una muestra del mismo paciente, bajo el mismo régimen médico, tomada en un momento posterior a la muestra tomada en el paso (a) y c) en donde, si el nivel de Hakai medido en el paso a) es más alto que el nivel medido en el paso (b), es indicativo de que el régimen médico es efectivo en el tratamiento del colon cáncer.

9. Método *in vitro* para el diagnóstico de cáncer de colon en un sujeto *que comprende*:

a) practicar una colonoscopia en el sujeto para cáncer de colon; y determinar el nivel de al menos Hakai en una muestra apropiada (biopsia o muestra quirúrgica) del sujeto poniendo en contacto la muestra de prueba con un reactivo que detecta al menos el nivel de la proteína Hakai; y b) comparar el nivel de Hakai determinado en la etapa a) con un nivel de control de referencia de ese biomarcador, y c) la toma de imágenes y la etapa de determinación (a) pueden tomarse en cualquier orden y si el nivel de Hakai determinado en el paso (a) es mayor que el nivel de control de referencia, es indicativo de que el sujeto padece cáncer de colon y/o que los nódulos de colon presentes en el sujeto se consideran malignos.

10. Método *in vitro* para el diagnóstico de cáncer de colon en un sujeto *que comprende*:

a) determinar el nivel de al menos Hakai en una muestra apropiada (biopsia o muestra quirúrgica) del sujeto poniendo en contacto la muestra de prueba con un reactivo que detecta al menos el nivel de la proteína Hakai; y b) comparar el nivel de Hakai determinado en el paso a) con un nivel de control de referencia de ese biomarcador, y c) donde sólo si el nivel de Hakai determinado en el paso (a) es mayor que el nivel de control de referencia, es indicativo de que el sujeto padece cáncer de colon y/o que los nódulos de colon presentes en el sujeto se consideran malignos y, por lo tanto, sólo en ese caso, se practicaría una colonoscopia para tratar el cáncer de colon en el sujeto.

11. En el método para cualquiera de las reivindicaciones 2 a 10, la muestra seleccionada es de: sangre, plasma, suero, biopsia y muestras quirúrgicas, preferiblemente muestras de biopsia y quirúrgicas.

12. En el método para cualquiera de las reivindicaciones 2 a 10, la muestra seleccionada es de biopsia y muestras quirúrgicas.

13. En el método para cualquiera de las reivindicaciones 2 a 10, el reactivo que detecta al menos el nivel de la proteína Hakai es un anticuerpo o un fragmento del mismo o un aptámero.
- 5 14. En el método de la reivindicación 13, el reactivo indicado se une a cualquiera de los péptidos GPHPDQTRYRPYYQ ó DHTDNELQGTNSSG.

Fig. 1

A

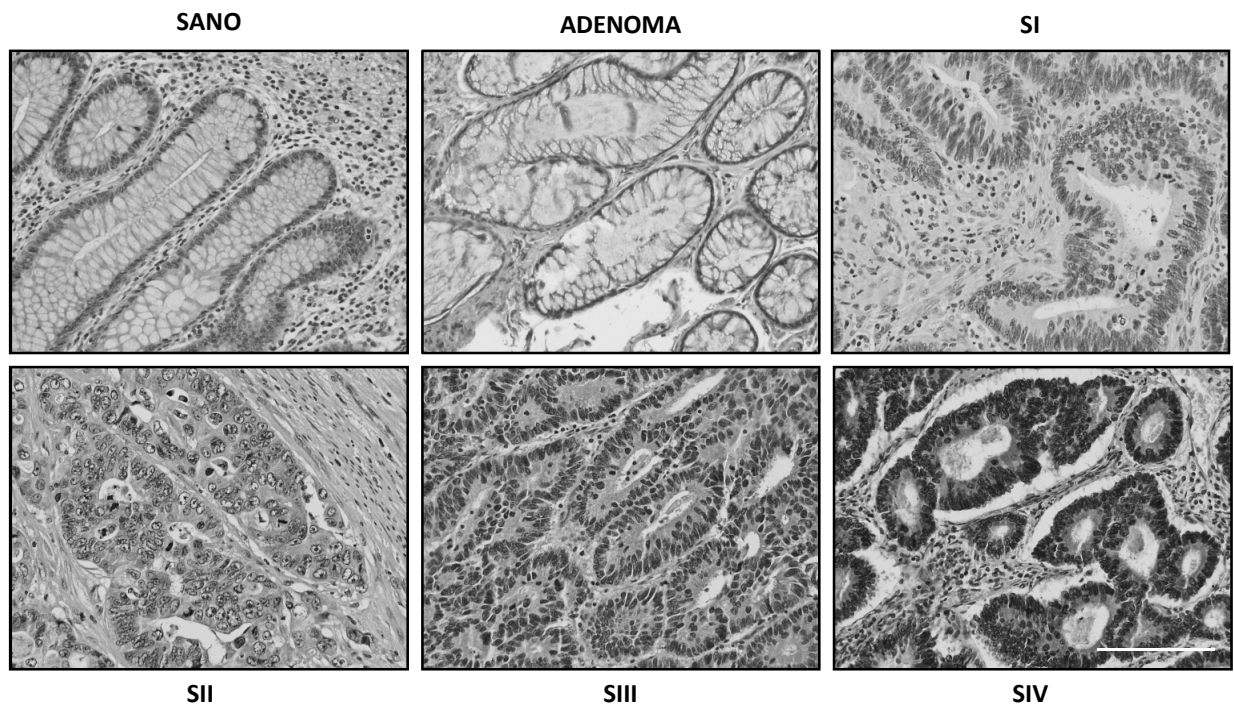


Fig. 1 (Cont.)

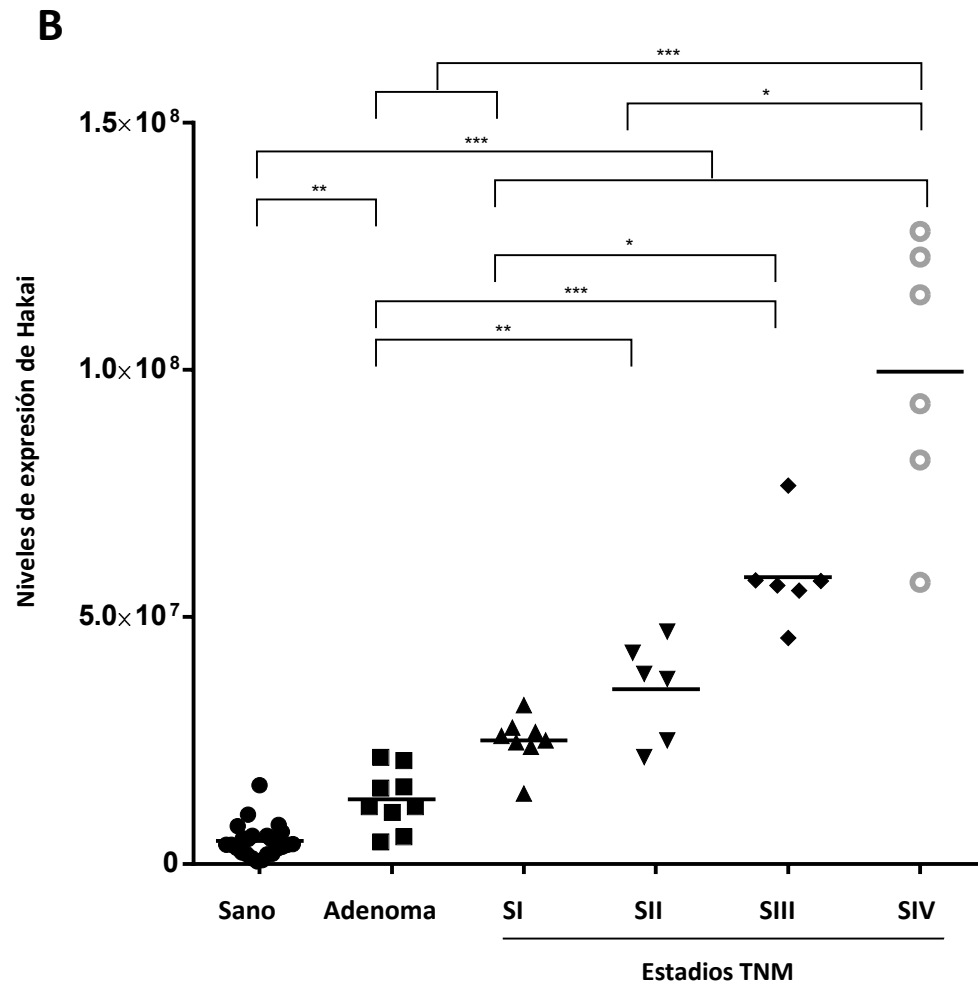


Fig. 2

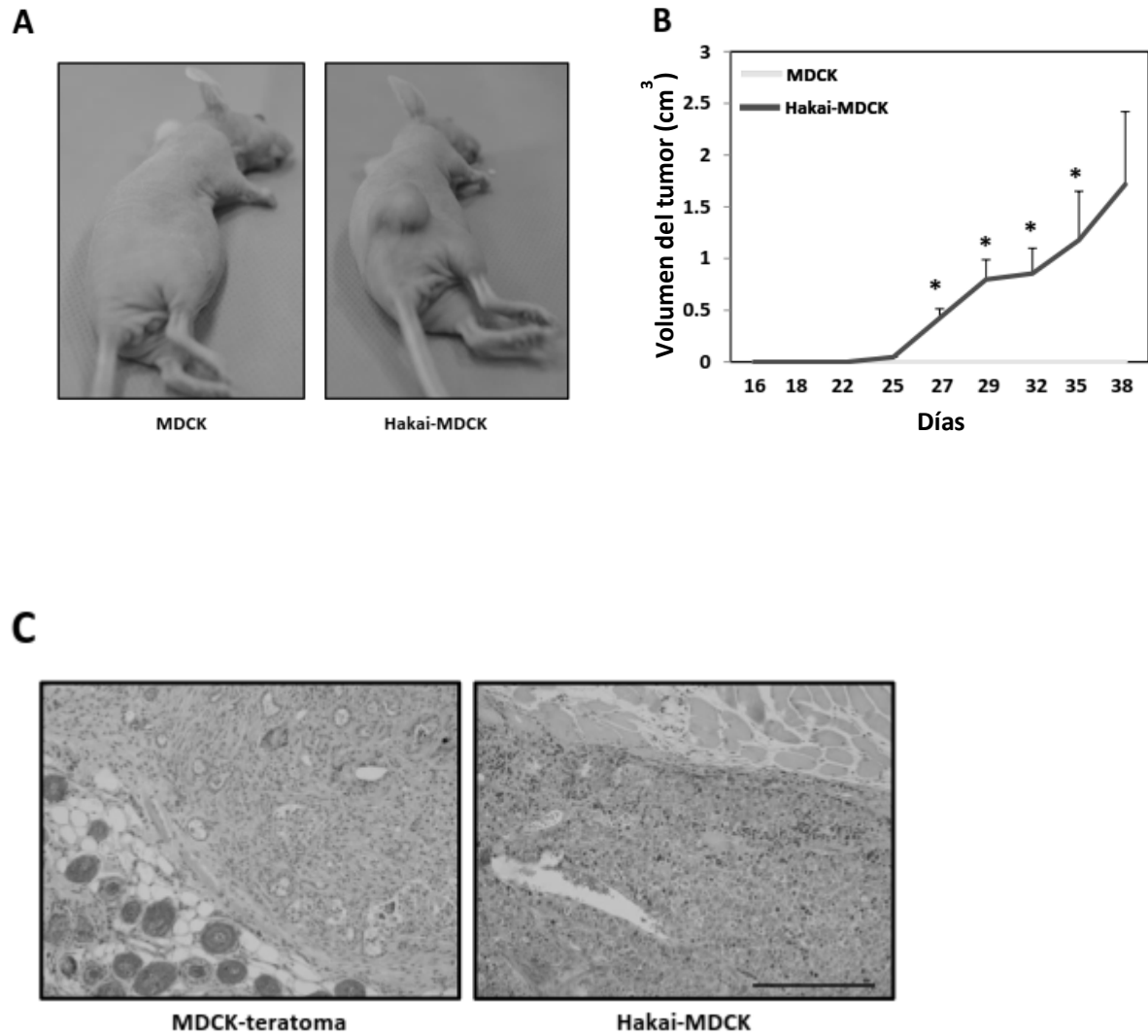


Fig. 3

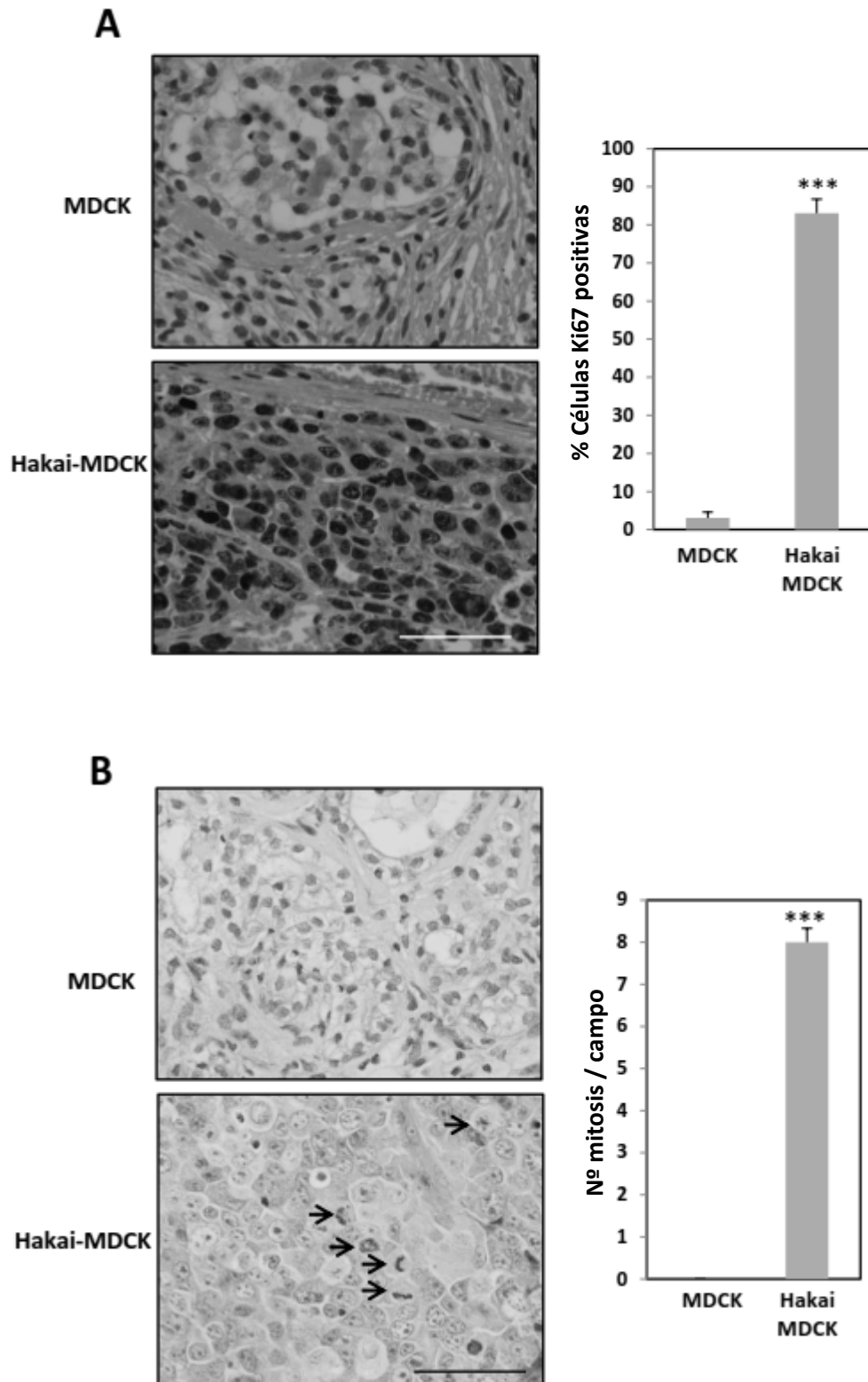
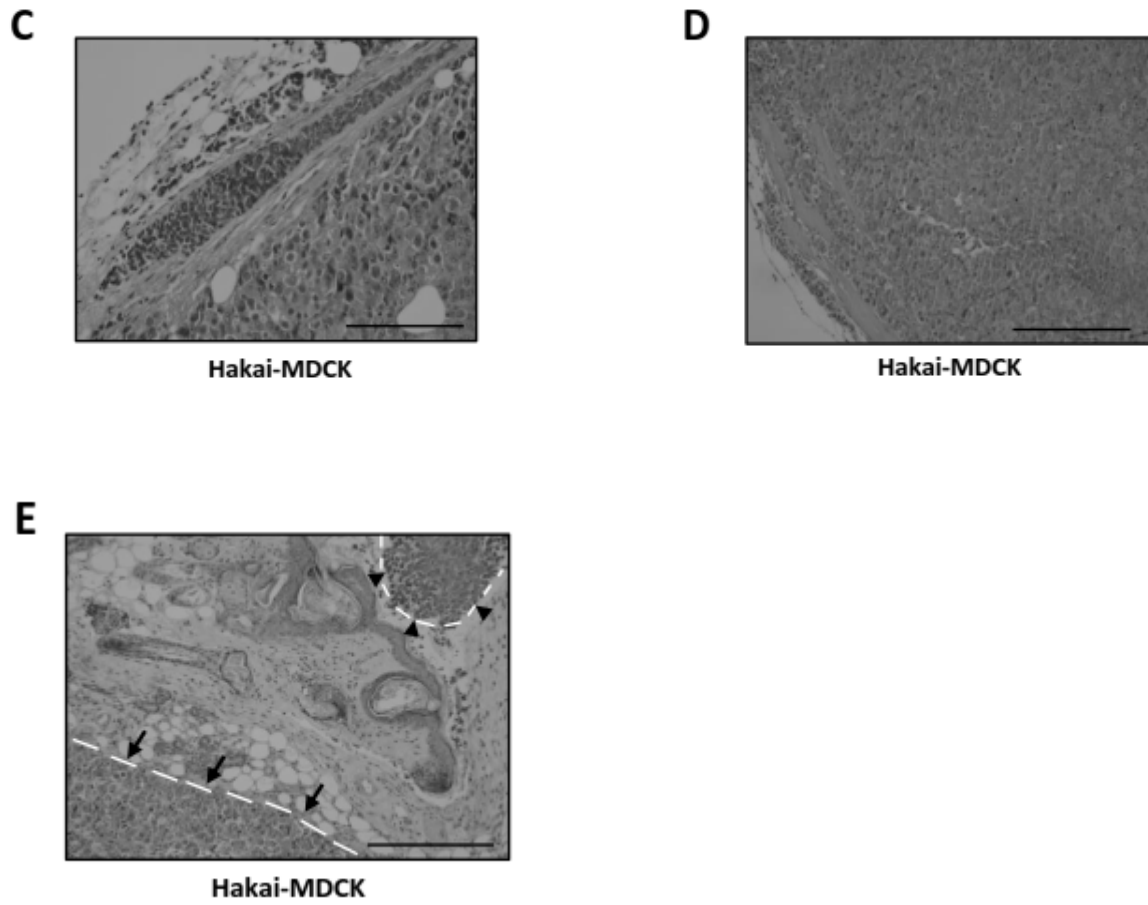


Fig. 3 (Cont.)





- ②① N.º solicitud: 201731420
②② Fecha de presentación de la solicitud: 18.12.2017
③② Fecha de prioridad:

INFORME SOBRE EL ESTADO DE LA TECNICA

⑤① Int. Cl.: **C12N9/00** (2006.01)
G01N33/574 (2006.01)

DOCUMENTOS RELEVANTES

Categoría	⑤⑥ Documentos citados	Reivindicaciones afectadas
X	FIGUEROA, A. et al. PP53 Hakai - a novel tissue based tumour progression marker. European Journal of Cancer. Octubre 2009, Vol. 7, Nº 4, página 17. ISSN 1359-6349, <DOI: 10.1016/S1359-6349(09)72162-7>, todo el documento.	1-14
X	FIGUEROA, A. et al. Novel roles of Hakai in cell proliferation and oncogenesis. Molecular Biology of the Cell. Agosto 2009, Vol. 20, Nº 15, páginas 3533 – 3542. ISSN 1059-1524 (impreso) ISSN 1939-4586 (electrónico), <DOI:10.1091/mbc.E08-08-0845>, especialmente página 3534, apartado "Antibodies and materials"; página 3538, apartado "Involvement of Hakai in oncogenesis"; página 3541, último párrafo.	1-14
X	ABELLA, V. et al. miR-203 regulates cell proliferation through its influence on Hakai expression. PLoS One. Diciembre 2012, Vol. 7, Nº 12, Nº artículo e52568. ISSN 1932-6203 (impreso) ISSN 1932-6203 (electrónico), <DOI:10.1371/journal.pone.0052568>, especialmente páginas 6 - 8, apartado "miR-203 and Hakai expression in tumour and the adjacent healthy colon tissues".	1-14

Categoría de los documentos citados

X: de particular relevancia

Y: de particular relevancia combinado con otro/s de la misma categoría

A: refleja el estado de la técnica

O: referido a divulgación no escrita

P: publicado entre la fecha de prioridad y la de presentación de la solicitud

E: documento anterior, pero publicado después de la fecha de presentación de la solicitud

El presente informe ha sido realizado

☒ para todas las reivindicaciones

☐ para las reivindicaciones nº:

Fecha de realización del informe
20.09.2018

Examinador
E. Relaño Reyes

Página
1/2

Documentación mínima buscada (sistema de clasificación seguido de los símbolos de clasificación)

C12N, G01N

Bases de datos electrónicas consultadas durante la búsqueda (nombre de la base de datos y, si es posible, términos de búsqueda utilizados)

INVENES, EPODOC, PATENW, BIOSIS, EMBASE, MEDLINE, XPESP, INSPEC, COMPDX, NPL, XPOAC, NRPL1, UNIPARC