(12) SOLICITUD INTERNACIONAL PUBLICADA EN VIRTUD DEL TRATADO DE COOPERACIÓN EN MATERIA DE PATENTES (PCT)

(19) Organización Mundial de la Propiedad Intelectual
Oficina internacional

(43) Fecha de publicación internacional
11 de Junio de 2009 (11.06.2009)

PCT

(10) Número de Publicación Internacional
WO 2009/071720 A1

(51) Clasificación Internacional de Patentes:
C12Q 1/68 (2006.01) *G01N 33/574* (2006.01)

(21) Número de la solicitud internacional:
PCT/ES2008/000756

(22) Fecha de presentación internacional:
4 de Diciembre de 2008 (04.12.2008)

(25) Idioma de presentación: español

(26) Idioma de publicación: español

(30) Datos relativos a la prioridad:
P200703229
4 de Diciembre de 2007 (04.12.2007) ES

(71) Solicitante *(para todos los Estados designados salvo US)*: **UNIVERSIDAD AUTÓNOMA DE MADRID** [ES/ES]; Einstein, 3, E-28049 Madrid (ES).

(72) Inventores; e

(75) Inventores/Solicitantes *(para US solamente)*: **CASADO SÁENZ, Enrique** [ES/ES]; Hospital Infanta Sofía, Paseo de Europa, 34, E-28702 San Sebastián De Los Reyes - Madrid (ES). **CEJAS GUERRERO, Paloma** [ES/ES]; Hospital Universitario La Paz, Paseo de la Castellana, 261, E-28046 Madrid (ES). **SÁNCHEZ HERNÁNDEZ, José Javier** [ES/ES]; Universidad Autónoma De Madrid, Ciudad Universitaria de Cantoblanco, E-28049 Madrid (ES). **GONZÁLEZ BARÓN, Manuel** [ES/ES]; Hospital Universitario La Paz, Paseo de la Castellana, 261, E-28046 Madrid (ES).

(74) Mandatario: **ARIAS SANZ, Juan**; ABG Patentes, S.L., Avenida de Burgos, 16D, Edificio Euromor, E-28036 MADRID Madrid (ES).

(81) Estados designados *(a menos que se indique otra cosa, para toda clase de protección nacional admisible)*: AE, AG, AL, AM, AO, AT, AU, AZ, BA, BB, BG, BH, BR, BW, BY, BZ, CA, CH, CN, CO, CR, CU, CZ, DE, DK, DM, DO, DZ, EC, EE, EG, ES, FI, GB, GD, GE, GH, GM, GT, HN, HR, HU, ID, IL, IN, IS, JP, KE, KG, KM, KN, KP, KR, KZ, LA, LC, LK, LR, LS, LT, LU, LY, MA, MD, ME, MG, MK, MN, MW, MX, MY, MZ, NA, NG, NI, NO, NZ, OM, PG, PH, PL, PT, RO, RS, RU, SC, SD, SE, SG, SK, SL, SM, ST, SV, SY, TJ, TM, TN, TR, TT, TZ, UA, UG, US, UZ, VC, VN, ZA, ZM, ZW.

(84) Estados designados *(a menos que se indique otra cosa, para toda clase de protección regional admisible)*: ARIPO (BW, GH, GM, KE, LS, MW, MZ, NA, SD, SL, SZ, TZ, UG, ZM, ZW), euroasiática (AM, AZ, BY, KG, KZ, MD, RU, TJ, TM), europea (AT, BE, BG, CH, CY, CZ, DE, DK, EE, ES, FI, FR, GB, GR, HR, HU, IE, IS, IT, LT, LU, LV, MC, MT, NL, NO, PL, PT, RO, SE, SI, SK, TR), OAPI (BF, BJ, CF, CG, CI, CM, GA, GN, GQ, GW, ML, MR, NE, SN, TD, TG).

Publicada:
— *con informe de búsqueda internacional*
— *antes de la expiración del plazo para modificar las reivindicaciones y para ser republicada si se reciben modificaciones*

(54) **Title:** GENOMIC IMPRINTING FOR THE PROGNOSIS OF THE COURSE OF COLORECTAL ADENOCARCINOMA

(54) **Título:** HUELLA GENÓMICA PARA EL PRONÓSTICO DE LA EVOLUCIÓN DE ADENOCARCINOMA COLORECTAL

(57) **Abstract:** The invention relates to in vitro methods for establishing a prognosis concerning the course of a patient diagnosed with colorectal cancer following the administration of a therapy, monitoring the effect of said therapy on the patient or predicting the clinical response of the patient to the therapy. Said methods are based on measuring the expression levels of pre-determined genes or the levels of the proteins encoded by said genes in relation to basal expression levels.

(57) **Resumen:** La presente invención se relaciona con métodos in vitro para pronosticar la evolución de un sujeto diagnosticado con cáncer colorectal tras la administración de una terapia, monitorizar el efecto de dicha terapia en el sujeto, o para predecir la respuesta clínica de dicho sujeto a la terapia. Los métodos se basan en la medida de los niveles de expresión de determinados genes o de los niveles de las proteínas codificadas por esos genes respecto a niveles de expresión basales.

WO 2009/071720 A1

HUELLA GENÓMICA PARA EL PRONÓSTICO DE LA EVOLUCIÓN DE ADENOCARCINOMA COLORECTAL

CAMPO DE LA INVENCIÓN

La presente invención se relaciona con métodos *in vitro* para predecir la respuesta clínica de un sujeto diagnosticado de adenocarcinoma colorectal a una terapia, para monitorizar el efecto la terapia administrada a dicho sujeto y para diseñar una terapia personalizada a un sujeto diagnosticado de adenocarcinoma colorectal.

ANTECEDENTES

El cáncer de intestino grueso es el tercer tumor maligno más frecuente en el mundo occidental, después del cáncer de pulmón y mama, representando el 10% de todos los cánceres y ocasionando el 10% de la mortalidad secundaria a cáncer. Aproximadamente un tercio de los cánceres de intestino grueso se forman en el recto, y la mayoría de estos se diagnostican como cánceres de recto localmente avanzados (CRLAs).

En el CRLA el desarrollo de la Excisión Total del Mesorrecto (ETM) y de estrategias preoperatorias con quimioterapia y radioterapia ha mejorado notablemente la supervivencia global, el control local y probablemente la tasa de procedimientos que preservan el esfínter anal. Además, de esta forma, se ha mitigado la toxicidad de la quimiorradioterapia (QRT).

De acuerdo a los datos de ensayos clínicos aleatorizados antiguos y recientes, el tratamiento combinado preoperatorio con QRT ha extendido la supervivencia global a los 5 años desde un 45%, con cirugía convencional (Douglass, H.O., *et al.* 1986, N.Engl.J Med., 315: 1294-1295; Tveit, K.M., *et al.* 1997 Norwegian Adjuvant Rectal Cancer Project Group, Br.J Surg., 84: 1130-1135), a un 66-76% con QRT preoperatoria, y las recidivas locales han disminuido desde un 30-50% a un 6-8%. Sin embargo, un tercio de los pacientes desarrollará metástasis a distancia, que son responsables de la elevada mortalidad (Sauer, R., *et al.* 2004 N.Engl.J.Med., 351: 1731-1740; Bosset, J.F., *et al.* 2006 N.Engl.J Med., 355: 1114-1123).

Además, un número importante de enfermos sufre considerables efectos adversos asociados a la QRT sin beneficio alguno. De forma opuesta, otros pacientes pueden ser infra-tratados. Así, resulta de enorme interés identificar las potenciales dianas involucradas en la resistencia a la QRT e identificar a los pacientes que recaerán y serían subsidiarios de tratamientos más intensivos.

La selección del tratamiento QRT para cada caso individual de adenocarcinoma de recto depende de variables clínicas y patológicas que resultan incapaces de predecir la eficacia terapéutica. Estrategias dirigidas, individuales, que correlacionan biomarcadores basales concretos con la respuesta al tratamiento QRT preoperatorio han mostrado marcadores de interés, incluyendo las mutaciones en p53 (Kandioler, D. *et al.*, 2002. Ann.Surg., 235:493-498; Rebischung, C., *et al.* 2002, Int. J Cancer, 100: 131-135), expresión de timidilato sintetasa (Johnston, P.G., *et al.* 1994, J Clin Oncol, 12: 2640-2647; Edler, D. *et al.*, 2000, Clin Cancer Res. 6:1378-1384), p21 (Reerink, O., *et al.* 2004, Anticancer Res., 24:1217-1221; Qiu, H., *et al.* 2000, Dis. Colon Rectum, 43: 451-459 ; Fu, C.G., *et al.* 1998, Dis. Colon Rectum, 41: 68-74; Rau, B., *et al.* 2003, J Clin Oncol, 21: 3391-3401), EGFR (Milas, L., *et al.* 2004, Int. J Radiat.Oncol Biol.Phys., 58: 966-971), COX 2 (Smith, F.M., et al. 2006 Int.J.Radiat.Oncol.Biol.Phys., 64: 466-472), índice de apoptosis espontánea (Rodel,C., *et al.* 2002, Int. J Radiat.Oncol Biol.Phys., 52: 294-303; Abe,T., *et al.* 2001, Anticancer Res., 21: 2115-2120) o el CEA (Park, Y.A., *et al.* 2006, J Surg.Oncol, 93: 145-150). Sin embargo, ninguna de ellas ha demostrado claramente su utilidad predicativa en clínica.

Puesto que la exposición a QRT induce la expansión clonal de células cancerosas resistentes, la evaluación dinámica de marcadores que responden a QRT ha despertado un gran interés en el cáncer de recto (Crane, C.H., *et al.* 2003, J Clin Oncol, 21: 3381-3382). El cribaje ciego de genes a través de esta estrategia puede identificar nuevas dianas pronósticas y potencialmente terapéuticas. Además, las comparaciones intra-paciente reducen las fuentes de variabilidad, ofreciendo un contexto atractivo para el cribaje de dianas.

Unos pocos estudios clínicos han abordado la evaluación dinámica de marcadores individuales antes y después del tratamiento. Rau *et al.* encontraron, en una serie de 66 pacientes, que la reducción en la expresión inmunohistoquímica de p21, y el aumento en la expresión de Ki-67, se asoció a un peor pronóstico (Rau, B., *et al.* 2003, J Clin Oncol, 21: 3391-3401). De forma análoga, en 40 pacientes incluidos en el mencionado ensayo alemán, la persistencia de enfermedad ganglionar tras el tratamiento y el aumento en la expresión de timidilato sintetasa en los mismos, tras microdisección tumoral con láser, se acompañó de una mayor tasa de recidivas (Liersch, T. *et al.* 2006, J Clin Oncol, 24: 4062-4068).

La solicitud de patente internacional WO2006/037993, a nombre de Auvation Limited, describe marcadores de cáncer, tal como el cáncer de ovario y colon, y el uso de éstos como marcadores de pronóstico y diagnóstico. Los marcadores descritos corresponden a enzimas del citocromo p450: CYP51, CYP52, CYP2U1, CYP3A43, CYP4F11, CYP4X1, CYP4Z1, CYP26A1, CYP3A7, CYP2F1, CYP4V2 y CYP39.

La solicitud de patente internacional WO2007/073220, a nombre de Pacific Edge Biotechnology Limited, describe composiciones y métodos para determinar el pronóstico de cáncer en un paciente, particularmente, cáncer de colon. En concreto, se relaciona con el uso de marcadores genéticos para la predicción del pronóstico del cáncer a partir de una firma característica (los marcadores genéticos se describen en la tablas 1 y 2). Las huellas génicas obtenidas se muestran en las tablas 8a, 8b y tabla 9 de dicho documento.

Barrier, A., *et al.*, 2006 (Journal of Clinical Oncology, Vol.24(29): 4685-4691) describe la capacidad de un microarray de expresión de genes para predecir el pronóstico de pacientes con cáncer de colon en estado II. Los microarray evaluados están compuestos por 30 y 23 genes.

Knoesel, T., *et al.*, 2005 (Neoplasia, Vol. 7(8): 741-747) describe los perfiles inmunogénicos de 11 biomarcadores para el cáncer de recto mediante microarrays de tejido. Los genes considerados son Adam 10, CyclinD1, AnnexinII, NFBK, casein-kinase-2-beta (CK2B), YB-1, P32, Rad51, c-fos, IGFBP4, y connexin 26 (Cx26).

Por último, Watanabe, T., *et al.,* 2006 (Cancer Res, Vol. 66(7): 3370-3374) describe un patrón de expresión genético útil para predecir la sensibilidad de células de cáncer de recto en respuesta a la radioterapia preoperativa.

Por tanto, existe en el estado de la técnica la necesidad de proporcionar un nuevo método que permita pronosticar la evolución de un sujeto diagnosticado de adenocarcinoma colorectal previo a la administración de una terapia una vez que dicho sujeto ha sido sometido a terapia, y así identificar qué sujetos recaerán tras la terapia y que podrían, por tanto, ser objeto de un tratamiento alternativo al originalmente administrado.

COMPENDIO DE LA INVENCIÓN

En un aspecto, la presente invención se relaciona con un método *in vitro* para predecir la respuesta clínica de un sujeto diagnosticado de adenocarcinoma colorectal a una terapia que comprende

(i) cuantificar los niveles de expresión de los genes mostrados en las Tablas 1A y 1B o

(ii) cuantificar los niveles de proteínas codificadas por los genes de las Tablas 1A y 1B, o cualquier variante funcionalmente equivalente de dichas proteínas,

en una muestra biológica procedente de dicho sujeto antes de la administración de la terapia, en donde una expresión elevada de los genes de la Tabla 1A o de la expresión de la proteína correspondiente a cada gen, o cualquier variante funcionalmente equivalente de dicha proteína, y una expresión disminuida de los genes de la Tabla 1B o de la expresión de la proteína correspondiente a cada gen, o cualquier variante funcionalmente equivalente de dicha proteína, con respecto a genes que se expresan de forma constitutiva, o sus correspondientes proteínas, es indicativa de una mejor respuesta del sujeto tras la administración de la terapia.

En otro aspecto, la invención se relaciona con un método *in vitro* para predecir la respuesta clínica de un sujeto diagnosticado de adenocarcinoma colorectal a la terapia que comprende

(i) cuantificar los niveles de expresión de los genes mostrados en las Tablas 2A y 2B o

(ii) cuantificar los niveles de proteínas codificadas por los genes de las Tablas 2A y 2B, o cualquier variante funcionalmente equivalente de dichas proteínas,

en una muestra biológica procedente de dicho sujeto antes de la administración de la terapia, en donde una expresión elevada de los genes de la Tabla 2A o de la expresión de la proteína correspondiente a cada gen, o cualquier variante funcionalmente equivalente de dicha proteína, y una expresión disminuida de los genes de la Tabla 2B, o de la expresión de la proteína correspondiente a cada gen, o cualquier variante funcionalmente equivalente de dicha proteína, con respecto a genes que se expresan de manera constitutiva, o sus correspondientes proteínas, es indicativa de peor respuesta del sujeto tras la administración de la terapia.

En otro aspecto, la invención se relaciona con un método *in vitro* para monitorizar el efecto de la terapia administrada a un sujeto diagnosticado de adenocarcinoma colorectal, que comprende

(i) cuantificar los niveles de expresión de los genes mostrados en las Tablas 1A y 1B o

(ii) cuantificar los niveles de proteínas codificadas por los genes de las Tablas 1A y 1B, o cualquier variante funcionalmente equivalente de dichas proteínas,

en una muestra biológica procedente de dicho sujeto tras la administración de la terapia, en donde una expresión elevada de los genes de la Tabla 1A o de la expresión de la proteína correspondiente a cada gen, o cualquier variante funcionalmente equivalente de dicha proteína, y una expresión disminuida de los genes de la Tabla 1B, o de la expresión de la proteína correspondiente a cada gen, o cualquier variante funcionalmente equivalente de dicha proteína, con respecto a genes que se expresan de forma constitutiva, o sus correspondientes proteínas, es indicativa de buena respuesta tumoral a la terapia.

En otro aspecto, la invención se relaciona con un método *in vitro* para monitorizar el efecto de la terapia administrada a un sujeto diagnosticado de adenocarcinoma colorectal, que comprende

(i) cuantificar los niveles de expresión de los genes mostrados en las Tablas 2A y 2B o

(ii) cuantificar los niveles de proteínas codificadas por los genes de las Tablas 2A y 2B, o cualquier variante funcionalmente equivalente de dichas proteínas,

en una muestra biológica procedente de dicho sujeto tras la administración de la terapia, en donde una expresión elevada de los genes de la Tabla 2A o de la expresión de la proteína correspondiente a cada gen, o cualquier variante funcionalmente equivalente de dicha proteína, y una expresión disminuida de los genes de la Tabla 2B o de la expresión de la proteína correspondiente a cada gen, o cualquier variante funcionalmente equivalente de dicha proteína, con respecto a genes que se expresan de forma constitutiva, o sus correspondientes proteínas, es indicativa de mala respuesta tumoral a la terapia.

En otro aspecto, la invención se relaciona con un método *in vitro* para diseñar una terapia personalizada a un sujeto diagnosticado de adenocarcinoma colorectal, que comprende

(i) cuantificar los niveles de expresión de los genes mostrados en las Tablas 2A y 2B o

(ii) cuantificar los niveles de proteínas codificadas por los genes de las Tablas 2A y 2B, o cualquier variante funcionalmente equivalente de dichas proteínas,

en una muestra biológica procedente de dicho sujeto, en donde una expresión elevada de los genes de la Tabla 2A o de la expresión de la proteína correspondiente a cada gen, o cualquier variante funcionalmente equivalente de dicha proteína, y una expresión disminuida de los genes de la Tabla 2B o de la expresión de la proteína correspondiente a cada gen, o cualquier variante funcionalmente equivalente de dicha proteína, con respecto a genes que se expresan de forma constitutiva, o sus correspondientes proteínas, es indicativa de que el sujeto necesita una terapia alternativa a la terapia estándar.

En otro aspecto, la invención se relaciona con un reactivo capaz de detectar los niveles de expresión de los genes de las Tablas 1 y 2 o las proteínas codificadas por dichos genes.

En otro aspecto, la invención se relaciona con un array de ADN o ARN que comprende un conjunto de ácidos nucleicos, en donde dicho conjunto de ácidos nucleicos consiste en las secuencias de ácido nucleico de los genes de las Tablas 1 y 2, o un fragmento de los mismos, o los productos de su transcripción.

Por último, en otro aspecto, la invención también se relaciona con un array que comprende un conjunto de anticuerpos, en donde dicho conjunto de anticuerpos consiste en anticuerpos, o fragmentos de los mismos, capaces de unirse específicamente con las proteínas codificadas por los genes de las Tablas 1 y 2 o cualquier variante funcionalmente equivalente de dichas proteínas.

BREVE DESCRIPCIÓN DE LAS FIGURAS

La Figura 1 son dos gráficas que muestran la relación entre la respuesta tumoral y la supervivencia libre de enfermedad. Comparando la no respuesta (NR) *versus* la respuesta patológica (TRG4), no se alcanza la mediana en el tiempo a la recaída, pero el valor de p=0,05 es significativo (A). Cuando se analiza por subgrupos (B), añadiendo el de buena respuesta (GR, GRT 2/3) se observa la misma tendencia sin alcanzarse significación estadística.

La Figura 2 es un esquema que muestra el análisis de la señalización establecida entre los miembros de la huella genómica generada de respuesta tumoral.

DESCRIPCIÓN DETALLADA DE LA INVENCIÓN

La selección del tratamiento quimioterapéutico para cada caso individual de adenocarcinoma colorectal depende de variables clínicas y patológicas que resultan incapaces de predecir la eficacia terapéutica de un tratamiento o de pronosticar la evolución de un paciente que sufre dicho tipo de cáncer. Los autores de la presente invención han identificado un conjunto que 13 genes cuya cuantificación de la

expresión respecto a genes constitutivos permite, sorprendentemente, (i) predecir la mejor o peor evolución de un sujeto diagnosticado de adenocarcinoma colorectal tras la administración de una terapia; (ii) monitorizar el efecto de la terapia administrada a un sujeto diagnosticado de adenocarcinoma colorectal y pronosticar si el individuo va a responder bien a ella; y (iii) diseñar una terapia personalizada a un sujeto diagnosticado de adenocarcinoma colorectal, decidiendo el tipo de terapia adecuada a cada sujeto.

Tabla 1 **Predicción de respuesta y/o buena evolución del paciente**	
A. Se expresan más	**B. Se expresan menos**
ALDH1A1	BAK1
MLH1	CDKN1
RELB	FOS
TYMS	STAT3
GPX2	CKB
TFF3	HIG2
	PH-4
Tabla 2 **Predicción de no respuesta y/o mala evolución del paciente**	
A. Se expresan más	**B. Se expresan menos**
BAK1	ALDH1A1
MLH1	CDKN1
RELB	FOS
TYMS	STAT3
CKB	GPX2
TFF3	HIG2
PH-4	

Por tanto, en un aspecto, la invención se relaciona con un método *in vitro* para predecir la respuesta clínica de un sujeto diagnosticado de adenocarcinoma colorectal a una terapia que comprende

(i) cuantificar los niveles de expresión de los genes mostrados en las Tablas 1A y 1B o

(ii) cuantificar los niveles de proteínas codificadas por los genes de las Tablas 1A y 1B, o cualquier variante funcionalmente equivalente de dichas proteínas,

en una muestra biológica procedente de dicho sujeto antes de la administración de la terapia, en donde una expresión elevada de los genes de la Tabla 1A o de la expresión de la proteína correspondiente a cada gen, o cualquier variante funcionalmente

equivalente de dicha proteína, y una expresión disminuida de los genes de la Tabla 1B o de la expresión de la proteína correspondiente a cada gen, o cualquier variante funcionalmente equivalente de dicha proteína, con respecto a genes que se expresan de forma constitutiva, o sus correspondientes proteínas, es indicativa de una mejor respuesta del sujeto tras la administración de la terapia.

En otro aspecto, la invención se relaciona con un método *in vitro* para predecir la respuesta clínica de un sujeto diagnosticado de adenocarcinoma colorectal a la terapia que comprende

(i) cuantificar los niveles de expresión de los genes mostrados en las Tablas 2A y 2B o

(ii) cuantificar los niveles de proteínas codificadas por los genes de las Tablas 2A y 2B, o cualquier variante funcionalmente equivalente de dichas proteínas,

en una muestra biológica procedente de dicho sujeto antes de la administración de la terapia, en donde una expresión elevada de los genes de la Tabla 2A o de la expresión de la proteína correspondiente a cada gen, o cualquier variante funcionalmente equivalente de dicha proteína, y una expresión disminuida de los genes de la Tabla 2B, o de la expresión de la proteína correspondiente a cada gen, o cualquier variante funcionalmente equivalente de dicha proteína, con respecto a genes que se expresan de manera constitutiva, o sus correspondientes proteínas, es indicativa de peor respuesta del sujeto tras la administración de la terapia.

En una realización particular, el parámetro que indica la evolución de un sujeto diagnosticado de adenocarcinoma colorectal antes de la administración de la terapia se selecciona del grupo de respuesta tumoral, riesgo de recaída, la supervivencia libre de enfermedad y/o la supervivencia global del sujeto.

En la presente invención se entiende por "riesgo de recaída", a la probabilidad de un sujeto de volver a desarrollar adenocarcinoma colorectal tras un periodo libre de enfermedad.

En la presente invención se entiende por "supervivencia libre de enfermedad", al periodo de tiempo posterior al tratamiento en el que no se encuentra el cáncer.

En la presente invención se entiende por "supervivencia global del sujeto", al porcentaje de sujetos que sobreviven, desde el momento del diagnóstico o tratamiento, al cabo de un periodo de tiempo definido.

En otro aspecto, la invención se relaciona con un método *in vitro* para monitorizar el efecto de la terapia administrada a un sujeto diagnosticado de adenocarcinoma colorectal, que comprende

(i) cuantificar los niveles de expresión de los genes mostrados en las Tablas 1A y 1B o

(ii) cuantificar los niveles de proteínas codificadas por los genes de las Tablas 1A y 1B, o cualquier variante funcionalmente equivalente de dichas proteínas,

en una muestra biológica procedente de dicho sujeto tras la administración de la terapia, en donde una expresión elevada de los genes de la Tabla 1A o de la expresión de la proteína correspondiente a cada gen, o cualquier variante funcionalmente equivalente de dicha proteína, y una expresión disminuida de los genes de la Tabla 1B, o de la expresión de la proteína correspondiente a cada gen, o cualquier variante funcionalmente equivalente de dicha proteína, con respecto a genes que se expresan de forma constitutiva, o sus correspondientes proteínas, es indicativa de buena respuesta tumoral a la terapia.

En otro aspecto, la invención se relaciona con un método *in vitro* para monitorizar el efecto de la terapia administrada a un sujeto diagnosticado de adenocarcinoma colorectal, que comprende

(i) cuantificar los niveles de expresión de los genes mostrados en las Tablas 2A y 2B o

(ii) cuantificar los niveles de proteínas codificadas por los genes de las Tablas 2A y 2B, o cualquier variante funcionalmente equivalente de dichas proteínas,

en una muestra biológica procedente de dicho sujeto tras la administración de la terapia, en donde una expresión elevada de los genes de la Tabla 2A o de la expresión de la proteína correspondiente a cada gen, o cualquier variante funcionalmente equivalente de dicha proteína, y una expresión disminuida de los genes de la Tabla 2B o de la expresión de la proteína correspondiente a cada gen, o cualquier variante funcionalmente equivalente de dicha proteína, con respecto a genes que se expresan de forma constitutiva, o sus correspondientes proteínas, es indicativa de mala respuesta tumoral a la terapia.

En otro aspecto, la invención se relaciona con un método *in vitro* para diseñar una terapia personalizada a un sujeto diagnosticado de adenocarcinoma colorectal, que comprende

(i) cuantificar los niveles de expresión de los genes mostrados en las Tablas 2A y 2B o

(ii) cuantificar los niveles de proteínas codificadas por los genes de las Tablas 2A y 2B, o cualquier variante funcionalmente equivalente de dichas proteínas,

en una muestra biológica procedente de dicho sujeto, en donde una expresión elevada de los genes de la Tabla 2A o de la expresión de la proteína correspondiente a cada gen, o cualquier variante funcionalmente equivalente de dicha proteína, y una expresión disminuida de los genes de la Tabla 2B o de la expresión de la proteína correspondiente a cada gen, o cualquier variante funcionalmente equivalente de dicha proteína, con respecto a genes que se expresan de forma constitutiva, o sus correspondientes proteínas, es indicativa de que el sujeto necesita una terapia alternativa a la terapia estándar.

En la presente invención se entiende por "terapia alternativa" a una terapia distinta de la terapia administrada originalmente, aquí denominada terapia estándar o terapia convencional, a un sujeto. Dicha "terapia alternativa" incluye variaciones significativas a la terapia estándar, como la sustitución de unos agentes por otros, la adición de agentes quimioterápicos alternativos, cambio de dosis o aumento de la intensidad de dosis de los fármacos, adición de otros agentes anticancerosos (aprobados o en fase de experimentación), alteración en la secuencia de administración de los agentes

anticancerosos o el tipo de tratamientos locales, como la cirugía o la radioterapia, etc. Las terapias alternativas aquí definidas probablemente se asocien con mayores efectos secundarios para el sujeto (aunque no necesariamente) y previsiblemente, mayor efectividad. Ejemplos concretos de agentes anticancerosos incluidos dentro de la terapia alternativa podrían ser irinotecán, bevacizumab y cetuximab, agentes que ataquen rutas de señalización, agentes antiangiogénicos, etc.

En la presente invención se entiende por "terapia estándar" ó "terapia convencional" a aquella terapia que emplea los fármacos que han demostrado eficacia clínica en estudios fase III aleatorizados, sólos o en combinaciones similares a las empleadas en la presente invención, por ejemplo, en el cáncer colorectal el empleo de oxaliplatino, 5-fluoruracilo o fluorpirimidinas orales, irinotecán, bevacizumab o cetuximab, en esquemas como FOLFOX, FOLFIRI, XELOX, o XELIRI, con o sin bevacizumab o cetuximab, etc.

El término "proteína", tal como aquí se utiliza, se refiere a una cadena molecular de aminoácidos, unidos por enlaces covalentes o no covalentes. El término incluye, además, todas las formas de modificaciones químicas post-traduccionales, relevantes fisiológicamente, por ejemplo, glicosilación, fosforilación o acetilación, etc siempre y cuando se mantenga la funcionalidad de la proteína.

En la presente invención se entiende por "variante funcionalmente equivalente", una proteína cuya secuencia de aminoácidos (i) es sustancialmente homóloga a la secuencia de aminoácidos de una proteína concreta y (ii) realiza las mismas funciones que dicha proteína concreta. La similitud funcional de una proteína con otra concreta puede determinarse mediante ensayos de interferencia con la expresión del gen que codifica a la proteína concreta, que, al reducir la expresión, reducirían la actividad de esa proteína, y la posterior recuperación de la actividad mediante expresión de la secuencia de la otra proteína. Estos experimentos se realizarán utilizando secuencias de ARNs de interferencia específicos y complementarios para la secuencia de la proteína concreta y vectores de expresión que incorporen la secuencia específica de la otra proteína regulada por un promotor inducible o no.

Una secuencia de aminoácidos es sustancialmente homóloga a una secuencia de aminoácidos determinada cuando presenta un grado de identidad de, al menos, un 70%, ventajosamente de, al menos, un 75%, típicamente de, al menos, un 80%, preferentemente de, al menos, un 85%, más preferentemente de, al menos, un 90%, aún más preferentemente de, al menos, un 95%, 97%, 98% ó 99%, respecto a dicha secuencia de aminoácidos determinada. El grado de identidad entre dos secuencias de aminoácidos puede determinarse por métodos convencionales, por ejemplo, mediante algoritmos estándar de alineamiento de secuencias conocidos en el estado de la técnica, tales como, por ejemplo BLAST [Altschul S.F. *et al.* Basic local alignment search tool. J Mol Biol. 1990 Oct 5; 215(3):403-10].

En la presente invención se entiende por "genes que se expresan de forma constitutiva" o "genes de expresión constitutiva", a aquellos genes que siempre están activos o que se transcriben de manera constante. Ejemplos de genes que se expresan de forma constitutiva son 2-mioglobulina, ubiquitina, proteína ribosomal 18S, ciclofilina A, receptor de transferían, actina, GAPDH, proteína de activación de la tirosina 3-monooxigenasa/triptófano 5-monooxigenasa (YWHAZ), ubiquitina, beta-actina y β-2-microglobulina.

El experto en la materia entiende que, las mutaciones en la secuencia de nucleótidos de los genes que dan lugar a sustituciones conservativas de aminoácidos en posiciones no críticas para la funcionalidad de la proteína, son mutaciones evolutivamente neutras que no afectan a su estructura global ni a su funcionalidad. Dichas variantes caen dentro del ámbito de la presente invención. Están incluidas también dentro del ámbito de la invención aquellas variantes funcionalmente equivalentes de las proteínas descrita en la presente invención que presenten inserciones, deleciones o modificaciones de uno o más aminoácidos respecto a las proteínas de partida, y conserven, además, las mismas funciones que dichas proteínas de partida.

Por tanto, tal como aquí se utiliza, el término "variante funcionalmente equivalente" también incluye cualquier fragmento funcionalmente equivalente de una de las proteínas descritas en la presente invención. El término "fragmento" se refiere a un péptido que comprende una porción de una proteína. En este caso, un fragmento

funcionalmente equivalente de las proteínas descritas en la presente invención es un péptido o proteína que comprende una porción de dichas proteínas y las mismas funciones que dichas proteínas.

La cuantificación de los niveles de expresión de los genes de las Tablas 1 y 2 puede realizarse a partir del ARN resultante de la transcripción de dichos genes (ARNm) o, alternativamente, a partir del ADN complementario (ADNc) de dichos genes. Por tanto, en una realización particular, la cuantificación de los niveles de expresión de los genes de las Tablas 1 y 2 comprende la cuantificación del ARN mensajero (ARNm) de los genes de las Tablas 1 y 2, o un fragmento de dicho ARNm, el ADN complementario (ADNc) de los genes de dichas Tablas 1 y 2, o un fragmento de dicho ADNc, o sus mezclas.

Adicionalmente, el método de la invención puede incluir la realización de una etapa de extracción con el fin de obtener el ARN total, lo que puede realizarse mediante técnicas convencionales (Chomczynski y cols., Anal. Biochem., 1987, 162:156; Chomczynski P., Biotechniques, 1993, 15:532).

Prácticamente cualquier método convencional puede ser utilizado dentro del marco de la invención para detectar y cuantificar los niveles de ARNm codificados por los genes de las Tablas 1 y 2 o de su ADNc correspondiente. A modo ilustrativo, no limitativo, los niveles de ARNm codificados por dichos genes pueden ser cuantificados mediante el empleo de métodos convencionales, por ejemplo, métodos que comprenden la amplificación del ARNm y la cuantificación del producto de la amplificación de dicho ARNm, tales como electroforesis y tinción, o alternativamente, mediante Southern blot y empleo de sondas apropiadas, northern blot y empleo de sondas específicas del ARNm de los genes de interés o de su ADNc correspondiente, mapeo con la nucleasa S1, RT-LCR, hibridación, microarrays, etc., preferentemente, mediante PCR cuantitativa a tiempo real usando juegos de sondas y cebadores apropiados. Análogamente, los niveles del ADNc correspondiente a dichos ARNm codificados por los genes de la Tablas 1 y 2 también puede ser cuantificado mediante el empleo de técnicas convencionales; en este caso, el método de la invención incluye una etapa de síntesis del correspondiente ADNc mediante transcripción inversa (RT) del ARNm

correspondiente seguida de amplificación y cuantificación del producto de la amplificación de dicho ADNc. Métodos convencionales de cuantificar los niveles de expresión pueden encontrarse, por ejemplo, en Sambrook y cols., 2001. "Molecular cloning: a Laboratory Manual", 3rd ed., Cold Spring Harbor Laboratory Press, N.Y., Vol. 1-3.

En una realización particular de la invención, la cuantificación de los niveles de expresión de los genes de las Tablas 1 y 2 se realiza mediante una reacción en cadena de la polimerasa (PCR) cuantitativa multiplex o un array de ADN o ARN.

Por otro lado, para la puesta en práctica de la invención, a parte de cuantificar los niveles de expresión de los genes de las Tablas 1 y 2, también se pueden cuantificar los niveles de expresión de la proteína codificada por dichos genes, es decir, las proteínas ALDH1A1, MLH1, RELB, TYMS, GPX2, TFF3, BAK1, CDKN1, FOS, STAT3, CKB, HIG2 y PH-4. Así, en una realización particular, la cuantificación de los niveles de la proteína codificada por los genes de las Tablas 1 y 2 comprende la cuantificación de las proteínas codificadas por los genes de dichas Tablas 1 y 2.

El nivel de expresión de las proteínas codificadas por los genes de las Tablas 1 y 2 puede ser cuantificado mediante cualquier método convencional que permita detectar y cuantificar dichas proteínas en una muestra de un sujeto. A modo ilustrativo, no limitativo, los niveles de dichas proteínas pueden cuantificarse, por ejemplo, mediante el empleo de anticuerpos con capacidad de unirse a dichas proteínas (o a fragmentos de las mismas que contenga un determinante antigénico) y la posterior cuantificación de los complejos formados. Los anticuerpos que se emplean en estos ensayos pueden estar marcados o no. Ejemplos ilustrativos de marcadores que se pueden utilizar incluyen isótopos radiactivos, enzimas, fluoróforos, reactivos quimioluminiscentes, sustratos enzimáticos o cofactores, inhibidores enzimáticos, partículas, colorantes, etc. Existe una amplia variedad de ensayos conocidos que se pueden utilizar en la presente invención, que utilizan anticuerpos no marcados (anticuerpo primario) y anticuerpos marcados (anticuerpo secundario); entre estas técnicas se incluyen el Western-blot o transferencia Western, ELISA (ensayo inmunoabsorbente ligado a enzima), RIA (radioinmunoensayo), EIA competitivo (inmunoensayo enzimático competitivo), DAS-ELISA (ELISA sandwich con doble anticuerpo), técnicas inmunocitoquímicas e

inmunohistoquímicas, técnicas basadas en el empleo de biochips o microarrays de proteínas que incluyan anticuerpos específicos o ensayos basados en precipitación coloidal en formatos tales como dipsticks. Otras maneras para detectar y cuantificar dicha proteína TFF3, incluyen técnicas de cromatografía de afinidad, ensayos de unión a ligando, etc. En el mercado, existen anticuerpos comerciales contra las proteínas codificadas por los genes mostrados en las Tablas 1 y 2.

En una realización particular, la cuantificación de los niveles de proteína codificada por los genes de las Tablas 1 y 2 se realiza mediante western blot, ELISA, inmunohistoquímica o un array de proteínas.

En la terapia del adenocarcinoma colorectal, se pueden utilizar una variedad de tratamientos para tratar de eliminar o contener el cáncer. Dependiendo de la salud del paciente, al igual que el tamaño, sitio y etapa del cáncer, se puede utilizar (i) cirugía, que consiste en eliminar la parte del colon o del recto que contiene cáncer al igual que un poco del tejido sano que está a su alrededor, (ii) tratamientos citotóxicos/citostáticos, tales como, quimioterpia, que utiliza medicamentos contra el cáncer para destruir las células cancerosas al hacer circular los medicamentos por el cuerpo a través de las vías sanguíneas; radioterapia, en donde se emplea radiaciones de alta energía para matar las células del cáncer, y agentes antitumorales; y/o (iii) inmunoterapia, en donde el compuesto administrado estimula, realza o repara la función natural del sistema inmunológico contra el cáncer para reconocer y eliminar las células cancerosas del cuerpo.

Por tanto, en una realización particular, la terapia administrada es un tratamiento citotóxico y/ o citostático que, en otra realización todavía más particular, dicho tratamiento es quimioterapia, radioterapia, agentes antitumorales o combinaciones de los mismos.

Los agentes quimioterápicos adecuados incluyen pero no se limitan a agentes alquilantes tales como, por ejemplo, ciclofosfamida, carmustina, daunorubicina, mecloretamina, clorambucilo, nimustina, melfalán y similares; antraciclinas, tales como, por ejemplo, daunorubicina, doxorubicina, epirubicina, idarubicina, mitoxantrona,

valrubicina y similares; compuestos de taxano, tales como, por ejemplo, paclitaxel, docetaxel y similares; inhibidores de la topoisomerasa tales como, por ejemplo, etopóxido, tenipóxido, irinotecán, tulipóxido y similares; análogos de nucleótidos tales como, por ejemplo, azacitidina, azatioprina, capecitabina, citarabina, doxifluridina, fluorouracilo, gemcitabina, mercaptopurina, metotrexato, tioguanina ftorafur y similares; agentes a base de platino tales como, por ejemplo, carboplatino, cisplatino, oxaliplatino y similares; agentes antineoplásicos tales como, por ejemplo, vincristina, leucovorina, lomustina, procarbazina y similares; moduladores hormonales tales como, por ejemplo, tamoxifeno, finasterida, inhibidores de la 5-α-reductasa y similares; alcaloides de la vinca tales como, por ejemplo, vinblastina, vincristina, vindesina, vinorelbina y similares. Los agentes quimioterápicos adecuados se describen con más detalle en la bibliografía, tal como en The Merck Index en CD-ROM, 13ª edición.

En una realización particular, la quimioterapia comprende un compuesto seleccionado de un agente alquilante que previene la replicación, una fluorpirimidina, un inhibidor de la timidilato sintetasa, un inhibidor de la topoisomerasa y combinaciones de los mismos. Preferentemente, el agente alquilante que previene la replicación es oxaliplatino, la fluorpirimidina es 5-fluoruracilo, UFT, Utefos o Capecitabina, el inhibidor de la timidilato sintetasa es raltitrexed, y el inhibidor de la topoisomerasa I es irinotecan.

En la presente invención se entiende por "agente antitumoral" aquel compuesto o agente químico, físico o biológico con propiedades antiproliferativas, antioncogénicas y/o carcinostáticas que puede emplearse para inhibir el crecimiento, la proliferación y/o el desarrollo de tumores. Ejemplos de agentes antitumorales que pueden emplearse en la presente invención son (i) antimetabolitos, tales como antifolatos y análogos de purina; (ii) productos naturales, tales como antibióticos antitumorales e inhibidores mitóticos; (iii) hormonas y antagonista de las mismas, tales como andrógenos y corticosteroides; y (iv) agentes biológicos, como vectores virales. Una relación de compuestos que pueden emplearse como agentes antitumorales se describe en la solicitud de patente WO2005/112973

En una realización particular de la invención, el agente antitumoral comprende agentes antiangiogénicos e inhibidores de rutas de señalización que, en otra realización más

particular, el agente antiangiogénico es Bevacizumab y el inhibidor de la ruta se señalización es, Cetuximab, Panitumumab o erlotinib.

La puesta en práctica del método de la invención comprende la obtención de una muestra biológica del sujeto a estudiar. Ejemplos ilustrativos, no limitativos, de dichas muestras incluyen distintos tipos de fluidos biológicos, tales como sangre, suero, plasma, líquido cefalorraquídeo, líquido peritoneal, heces, orina y saliva, así como muestras de tejidos. Las muestras de fluidos biológicos pueden ser obtenidas por cualquier método convencional al igual que las muestras de tejidos; a modo ilustrativo dichas muestras de tejidos pueden ser muestras de biopsias obtenidas por resección quirúrgica.

Por tanto, en una realización particular, la muestra biológica es una muestra de tejido o un fluido biológico que, en otra realización todavía más particular es una muestra de tejido tumoral.

El método de la invención puede aplicarse a cualquier estadio de adenocarcinoma colorectal, desde el estadío I al IV. No obstante, en una realización particular, el adenocarcinoma colorectal es adenocarcinoma de intestino grueso en estadío II ó III ó IV.

En otro aspecto, la invención se relaciona con un reactivo capaz de detectar los niveles de expresión de los genes de las Tablas 1 y 2 o las proteínas codificadas por dichos genes.

En una realización particular, el reactivo comprende

(i) un conjunto de ácidos nucleicos, consistente en que cada ácido nucleico es capaz de hibridar específicamente con uno de los genes de las Tablas 1 y 2 o con los productos de su transcripción o

(ii) un conjunto de anticuerpos, o un fragmento de los mismos capaz de detectar un antígeno, consistente en que cada anticuerpo o fragmento es capaz de unirse específicamente a una de las proteínas codificadas por los genes de las Tablas 1 y 2.

En otra realización más particular, los ácidos nucleicos son sondas y/o cebadores de ADN, ADNc o ARN.

En otro aspecto, la invención se relaciona con un array de ADN o ARN que comprende un conjunto de ácidos nucleicos, en donde dicho conjunto de ácidos nucleicos consiste en las secuencias de ácido nucleico de los genes de las Tablas 1 y 2, o un fragmento de los mismos, o los productos de su transcripción.

En una realización particular, el array de ADN o ARN de la invención comprende además, una molécula de ácido nucleico de uno o varios genes de expresión constitutiva.

Por último, la invención en otro aspecto también se relaciona con un array que comprende un conjunto de anticuerpos, en donde dicho conjunto de anticuerpos consiste en anticuerpos, o fragmentos de los mismos, capaces de unirse específicamente con las proteínas codificadas por los genes de las Tablas 1 y 2 o cualquier variante funcionalmente equivalente de dichas proteínas.

En una realización particular, el array que comprende un conjunto de anticuerpos comprende, además, anticuerpos, o fragmentos de los mismos, capaces de unirse específicamente con las proteínas codificadas por uno o varios genes de expresión constitutiva..

El siguiente Ejemplo ilustra la invención y no debe ser considerado como limitativo del alcance de la misma.

EJEMPLO 1

Análisis del cambio dinámico del transcriptoma después de la quimioradioterapia

I. MATERIAL Y MÉTODOS

Pacientes

El cribaje inicial de cambios en el transcriptoma después de la QRT se realizó sobre 25 pacientes que fueron sometidos a un ensayo con QRT preoperatorio, tras lo cual, se

recogieron muestras tumorales en fresco. La quimioterapia consistió en cuatro ciclos preoperatorios y post-operatorios de oxiplatino y raltitrexed. De los 25 pacientes, sólo 6 fueron seleccionados para el análisis dinámico mediante serie de expresión génica (SAGE), de los cuáles sólo se obtuvieron 3 librerías SAGE satisfactorias.

El paciente A presentó una evolución adversa, paradigmática de resistencia a la QRT. Los otros dos pacientes, B y C, presentaron tumores representativos de los grados de regresión tumoral (GRT) II-III, los más habituales. El paciente A debutó con un adenocarcinoma de recto en un favorable estadio clínico (uT2N0), adyacente al márgen anal, que requirió amputación abdóminoperineal. No se consiguió infraestadificación tumoral, el GRT fue 2, y la recidiva a distancia y local se registraron a los 16 y 48 meses respectivamente.

Los pacientes B y C presentaron enfermedad con un estadio clínico uT3N0 en el momento del diagnóstico, encontrándose el primero libre de enfermedad al cabo de cinco años, y el segundo con metástasis pulmonares 54 meses después de iniciar el tratamiento.

Para el estudio de PCR cuantitativa múltiple (qRT-PCR), 129 pacientes adicionales con estadios II III de adenocarcinoma de recto por debajo de 10 centímetros de márgen anal, que recibieron dos o más ciclos de quimioterapia y 50.4 Gy de radioterapia antes de la cirugía, fueron reclutados prospectivamente, y las variables clínico-patológicas registradas (Tabla 3).

Tabla 3: Pacientes y características tumorales

Tabla 1. Pacientes y características tumorales	**Total**		**GRT 0/1 NTR**		**GRT 2/3**		**GRT 4 TR**	
	n	**%**	**n**	**%**	**n**	**%**	**n**	**%**
Número total de pacientes	94	100	17	18.1	64	68.1	13	13.8
Edad media (rango)	63(23-84)		65(37-75)		64(23-84)		63(45-73)	
Sexo								
Varones	54	57.4	10	58.8	37	57.8	7	53.8
Mujeres	40	42.6	7	41.2	27	42.2	6	46.2
Distancia a anal								
<6 cms	57	60.6	12	70.6	41	64.1	4	30.8
>6 cms	37	39.4	5	29.4	23	35.9	9	69.2
Clasificación post-QRT patológica del tumor (yp T)								
ypT0	15	15.9	0	0	3	4.7	12	92.3
ypT1	4	4.2	1	5.9	3	4.7	-	-
ypT2	21	22.4	4	23.5	17	26.6	-	-
ypT3	52	55.4	11	64.7	40	62.5	1	7.7
ypT4	2	2.1	1	5.9	1	1.5	-	-
Clasificación post-QRT patológica nodal (yp N)								
ypN0	76	80.9	11	64,7	52	81.3	13	100
ypN1	12	12,9	3	17.6	9	14.2	0	0
ypN2	6	6.5	3	17.7	3	4.7	0	0
QRT preoperatoria								
Oxaliplatino-Raltitrexed	49	52.1	5	29.4	37	57.8	7	53.8
5-FU en infusión/UFT	45	47.9	12	70.6	27	42.2	6	46.2
Patrones de recurrencia								
Local	6	21.4	2	22.2	4	20	0	0
Distancia	20	71.4	6	66.6	15	75	1	100
Ambas	2	7.2	1	11.2	1	5	0	0
Muerte								
Sí	14	14.9	4	23.5	10	15.6	0	0
No	80	85.1	13	76.5	54	84.4	13	100

QRT: Quimioradioteapia; TR: Respuesta tumoral; NTR: No respuesta Tumoral; GRT: Grado de regresión tumoral

En el análisis estadístico se incluyeron 94 pacientes, 34 de los cuales fueron descartados como resultado de datos de expresión génica incompletos o muestras patológicas inapropiadas.

La evaluación dinámica de los cambios en la expresión génica se analizaron en tumores de 74 pacientes, 21 de los cuales fueron rechazados al tratarse de casos de respuesta completa patológica o carecer de material tumoral suficiente para el análisis.

En todos los casos, se obtuvieron consentimientos informados, y el estudio fue previamente aprobado por los correspondientes comités de ética del hospital.

Seguimiento

Los pacientes se siguieron a intervalos de tres meses durante dos años, después cada seis meses durante tres años y más tarde anualmente. Las evaluaciones consistieron en un examen físico, hemograma y bioquímica. La colonoscopia, la ecografía y la tomografía computerizada se realizaron según las guías estándar (http://www.asco.org/asco/downloads/Colon_Cancer_Tool_11-1-05.xls.).

Siempre que fue posible, se recomendó una confirmación histopatológica de recurrencia.

Respuesta y grado de regresión tumoral (GRT)

El GRT se determinó mediante el examen histopatológico de los especimenes quirúrgicos, según la cantidad de células tumorales viables y fibrosis, de acuerdo al sistema propuesto por Dworak (Dworak,O. *et al.*, 1997 Int. J Colorectal Dis., 12: 19-23). La respuesta a la QRT se clasificó en dos grupos basándose en el GRT, no respuesta tumoral (NTR) y respuesta tumoral (RT), dado que los pacientes con GRT 0/1 presentan claramente peor supervivencia que el resto de los GRTs (Rodel,C. 2005, *et al.* J Clin Oncol, 23:8688-8696). NTR incluyó GRT 0 y 1 (no regresión o menos del 25% de la masa tumoral); TR englobó GRT 2 y 3 (regresión mayor del 25% de la masa tumoral con al menos algunas células tumorales viables) y TRG 4 (respuesta completa patológica, no células tumorales viables).

Preparación de las muestras

Para el análisis SAGE, se recogieron muestras tumorales en fresco de las biopsias previas y posteriores a la QRT en los seis pacientes seleccionados. Las biopsias tumorales se congelaron durante 15 minutos con nitrógeno líquido a -70°C. Para el aislamiento del ARN, las muestras tumorales teñidas con hematolixina y eosina fueron examinadas por un patólogo; las muestras congeladas de las biopsias endoscópicas se sometieron a cortes seriados de cinco micras en su totalidad; 20 secciones del mismo grosor se practicaron en los especimenes quirúrgicos congelados. Se requirió que todas las muestras contuvieran al menos un 90% de muestras tumorales tras la microdisección.

De los 129 pacientes reclutados mencionados anteriormente, se seleccionaron 94 de ellos con información clínico-patológica completa y muestra tumoral suficiente para el análisis con arrays de baja densidad mediante PCR cuantitativa múltiple. Las muestras embebidas en parafina se tiñeron con hematoxilina-eosina y se analizaron por un patólogo. Se requirió un enriquecimiento en células tumorales superior al 75%, y cuando fue preciso, se realizó una posterior macrodisección con cuchilla de seguridad y nueva tinción de hematoxilina-eosina en las biopsias post-operatorias. El ARN se extrajo de 5-10 secciones de cinco micras a partir de las muestras parafinadas.

Librerías y análisis SAGE

Se generaron seis librerías SAGE con las muestras tumorales de las biopsias endoscópicas al diagnóstico y de las piezas quirúrgicas post-tratamiento procedentes de los tres pacientes seleccionados. Las secciones se homogeneizaron directamente y el lisado resultante se usó directamente para la metodología SAGE modificada (microSAGE), siguiendo el protocolo previamente descrito (Datson, 1300-7) con modificaciones menores. Se introdujo una etapa de calentamiento a 65°C durante 10 minutos seguido de dos minutos en hielo para permitir una mejor separación de los concatémeros. Los productos mayores de 400 pb y menores de 1.000 pb fueron escindidos, extraídos y clonados en el sitio SphI del vector pZerO-1 (Invitrogen). Los archivos de secuencias se analizaron usando el programa SAGE 2000 (amablemente facilitado por Kenneth W. Kinzler, John Hopkins University), y los recursos de la página web del National Center for Biotechnology SAGE

(http://www.ncbi.nlm.nih.gov/SAGE). Aproximadamente, se secuenciaron 60.000 tags para la totalidad del proyecto, alrededor de 10.000 tags por librería de SAGE. Para comparar estas librerías de SAGE, cada número de tag fue normalizado con el programa SAGE 2000. El análisis de significación estadística se realizó usando el análisis de Monte Carlo, que permite realizar una gran cantidad de comparaciones a partir de los resultados del SAGE. El mapeo entre tags y genes se realizó de acuerdo a la base de datos SAGE Genie, con referencia a SAGEmap.

Los genes que se regularon significativamente tras las QRT fueron seleccionados para la posterior fase exploratoria en una serie amplia de pacientes mediante PCR cuantitativa múltiple. Esta selección se llevó a cabo en base a los cambios estadísticamente significativos de la expresión según el análisis de Monte Carlo ($p<0,05$), la similar tendencia de la regulación antes y después del tratamiento (infra o sobre-regulación) en los tres pacientes, y finalmente la plausibilidad biológica según la literatura previa disponible.

PCR cuantitativa múltiple

La totalidad del contenido en ARN se midió y verificó espectrofotométricamente y electrofotométricamente. La transcripción inversa se realizó a partir de 200 ng de ARN total usando el High-Capacity cDNA Archive Kit (Applied Biosystems, Foster City, CA). Las reacciones de PCR cuantitativa múltiple se realizaron en placas de 384 pocillos mediante el sistema ABI PRISM 7900 HT Sequence Detection System (Applied Biosystems) en muestras de 100 µl con TaqMan Universal PCR Master Mix (Applied Biosystems) y ~~50~~ 100 µl of de ADNc correspondientes a 50 ng de ARN total por canal de tarjeta microfluidica. La expresión de cada gen se midió en triplicado, y normalizada en relación a tres genes de referencia (GAPDH, B2M, and PMSB4). Los genes explorados incluyeron 25 obtenidos del cribaje mediante SAGE (Tabla 4), y el resto a partir de la literatura (Tabla 5).

Tabla 4. Cribaje ciego de cambios en el transcriptoma tras la QRT mediante SAGE

Gene	Patient A Pre/post (p)	Patient B Pre/Post (p)	Patient C Pre/post (p)	Unigene ID	Descripción
MYO5B	57/23	54/43	92/23	550481	Miosina VB
	=0	0.11	=0		
XIST	4/11	3/12	4/11	529901	X (inactivo)-tránsito específico
	0,0665	0,02	0.056		
S100A10	8/13	13/4	2/8	143873	S100 proteína de unión a calcio A10
	0,21739	0,01944	P=0,0457		
K-ALPHA-1	4/9	3/10	3/11	524390	Tubulina, alfa, ubicua
	0,1323	0.0529	0.02292		
HLA-C	12/15	7/17	6/22	534125	Complejo mayor de histocompatibilidad, clase I, C
	0,4310	0,0397	0,00118		
COL1A1	5/37	10/34	18/39	172928	Colageno, tipo I, alfa
	=0	0,00030	0,00245		
TFF3	26/10	15/15	21/5	82961	Trefoil factor 3 (intestinal)
	0,00456	0,7	0,00173		
FXYD3	86/36	52/16	4/22	301350	FXYD dominio contiene regulador 3 transporte de hierro
	=0	=0	0,00012		
CKB	40/14	25/11	10/14	173724	Creatinin quinasa, cerebro
	0,00025	0,0101	0,23		
CCNB1IP1	123/99	104/79	81/100	107003	Cyclin B1 interacting protein 1
	0,04737	0,0266	0,05148		
HIG2	13/14	17/7	9/7	521171	Proteína inductora de hipoxia 2
	0,5348	0,02536	0,44		
PH-4	0/5	0/5	0/3	271224	Factor prolil-4-hidroxilasa Proteína inducible hipoxia 2
	0.032765	0.03384	0.1165		
CHC1	7/1	6/3	2/1	469723	Condensación cromosoma 1
	0.032457	0.22	0.5		
BAT1	7/1	4/1	3/2	254042	HLA-B tránscrito asociado 1
	0,032457	0,1675	0,5122		
SELENBP1	15/5	14/5	20/6	334841	Proteína 1de unión a selenio
	0,018875	0,0304	0,0068		
ANGPTL4	9/4	5/6	12/4	9613	Angiopoyetina-like 4
	0,11	0,5	0,052		
SMAD2	258/185	266/178	297/184	465061	SMAD, mothers against DPP homolog 2 (Drosophila)
	0,00013	=0	0,00001		
ZYX	8/23	9/13	6/16	490415	Zyxin
	0,006	0,3	0,022		
GPX2	71/23	46/17	13/16	2704	Glutation peroxidasa 2 (gastrointestinal)
	=0	=0	0.3381		
MMP14	4/10	2/12	3/15	2399	Metaloproteinasa de matriz 14 (insertada-membrana)
	0,0815	0,006	0,00311		
ITGB4	0/6	1/5	¾	370255	Integrina, beta 4
	0,017	0,1035	0,48		

WARS	9/2	9/1	5/3	497599	Triptofanil-tRNA sintetasa
	0,0354	0,0091	0,36992		
PCYT2	41/20	23/8	3/11	514635	Citidililtransferasa 2 fosfato, etanolamina
	0,0039	0,0045	0,02292		
GSTP1	13/10	16/7	8/12	523836	Glutatión S-transferasa pi
	0,324	0,0458	0,20702		
EEF2	52/34	45/32	40/37	515070	Factor de elongación Traducción eucariotas
	0,0257	0,0754	0,48		

Tabla 5: Genes incluidos en las tarjetas microfluidicas a partir del cribaje dirigido (literatura)

Simbolo gen	Unigene	Descripción
MKI67	Hs.80976	Antigeno identificado por el anticuerpo monoclonal Ki-67
ERCC2	Hs.487294	Excision repair cross-complementing complementation group 2 (xeroderma pigmentoso D)
ALDH1A1	Hs.76392	Familia de aldehido deshidrogenasa, miembro A1
SPARC	Hs.111779	Secreted protein, acidic, cysteine-rich (osteonectina)
BIRC5	Hs.514527	Baculoviral IAP repeat-containing 5 (survivin)
FRAP1	Hs.338207	FK506 binding protein 12-rapamycin associated protein 1
BAK1	Hs.485139	BCL2-antagonista/killer 1
TP53	Hs.654481	Proteina tumoral p53 (síndrome de Li-Fraumeni)
RELB	Hs.654402	Homologo B del oncogen de la reticuloendoteliosis viral, factor nuclear del enhancer del polipéptido de cadenas ligeras kappa en células B 3 (aviar)
ALDH3A1	Hs.531682	Familia de la Aldehidodeshidrogenasa 3, miembroA1
PIK3R1	Hs.132225	Phosphoinositide-3-kinase, subunidad reguladora 1 (p85 alpha)
CDKN1B	Hs.238990	Cyclin-dependent kinase inhibitor 1B (p27, Kip1)
AURKB	Hs.442658	Aurora kinasa B
FOS	Hs.25647	V-fos FBJ homólogo del oncogen viral del osteosarcoma murino
ECGF1	Hs.592212	Endothelial cell growth factor 1 (platelet-derived)
MLH1	Hs.195364	MutL homolog 1, cáncer de colon, tipo II no polipósico (E. coli)
CDKN1A	Hs.370771	Cyclin-dependent kinase inhibitor 1A (p21, Cip1)
MAPK9	Hs.654461	Mitogen-activated protein kinase 9
KDR	Hs.479756	Kinase insert domain receptor (a type III receptor tyrosine kinase)
TYMS	Hs.592338	Timidilato sintetasa
EGFR	Hs.488293	Epidermal growth factor receptor
STAT3	Hs.463059	Signal transducer and activator of transcription 3 (reactante de fase aguda)
AKT1	Hs.525622	V-akt murine thymoma viral oncogene homolog 1
ABCB4	Hs.654403	ATP-binding cassette, sub-family B (MDR/TAP), miembro 4
LGALS4	Hs.5302	Lectin, galactoside-binding, soluble, 4 (galectina 4)
CHKA	Hs.569019	Colinquinasa alfa
ERCC1	Hs.435981	Excision repair cross-complementing rodent repair deficiency, complementation group 1 (incluye secuencia antisentido solapante)
MAPK14	Hs.588289	Mitogen-activated protein kinase 14
BCL2	Hs.150749	B-cell CLL/lymphoma 2

Análisis estadístico

Estadística descriptiva. En el caso de variables cualitativas se calcularon las frecuencias absolutas de aparición de cada modalidad de la variable y las frecuencias relativas expresadas en porcentajes. Para las variables cuantitativas se calcularon las medidas de tendencia central media o mediana. Como medidas de dispersión se utilizó la desviación típica y el recorrido de la variable.

Estadística inferencial. Para variables cualitativas se aplicó el test de chi al cuadrado con la correción de Yate y en el caso de Tablas de 2x2 la prueba exacta de Fisher. Antes de proceder a la aplicación de test de hipótesis para variables cuantitativas se aplicó la prueba de Kolmogorov-Smirnov (KS) para estudiar el tipo de distribución que seguía la variable (normal, no normal). Para aquellas variables donde la prueba KS indicara que seguía una distribución normal se aplicaron pruebas paramétricas (t de Student) y en caso contrario test no paramétricos (Wilcoxon, U de Mann-Whitney). Como uno de los objetivos del estudio es la valoración del cambio en las expresiones de genes antes y después del tratamiento con quimioterapia, parte de las pruebas aplicadas se correspondieron con pruebas para muestras pareadas o dependientes. El método de Kaplan-Meier fue empleado para estimar la supervivencia global.

Normalización de C_t.

Como paso previo al análisis de los datos procedentes de la PCR-QT se procedió a la normalización de los mismos. Para ello se utilizaron dos modelos, que han sido evaluados posteriormente; a) normalizar con tres genes y b) normalizar con 12 genes. Debido a la variabilidad que obtenida con la normalización tipo b) se decidió aplicar el primer método. En todos los casos se normalizó por la media de cada gen calculada en toda la serie de pacientes.

Correlación de los cambios dinámicos en los datos de qRT-PCR con pronóstico.

Para estudiar los cambios de expresión de los genes analizados después de la quimioterapia, se utilizó el test de Wilcoxon. Valores empíricos de la p para cada gen se obtuvo a través de 5.000 tests de permutaciones. Los genes con diferencias estadísticamente significativas en la expresión ($p<0.01$) se seleccionaron para el análisis

discriminante y de regresión de riesgos proporcionales de Cox. El análisis multivariante de regresión de Cox de riesgos proporcionales (ajustado para el sexo, estadio y número de ganglios positivos) se realizó para cada gen en el set de entrenamiento (60% de la muestra, el 40% restante fue el testing set). La asumpción de riesgos proporcionales para las covariables se investigó examinando los residuos Schoenfeld.

II. RESULTADOS

Datos clínicos y patológicos

Los datos histopatológicos y de expresión génica se consiguieron en 94 pacientes para el análisis de PCR cuantitativa múltiple. Se ilustran en la Tabla 3.

GRT como factor pronóstico

Los GRT 0/1, 2/3, y 4 se encontraron en el 18,5%, 67,4%, y 14,1% de los tumores resecados, respectivamente. El GRT se relacionó con la supervivencia libre de enfermedad (SLE) de los pacientes, observándose una clara tendencia a la recidiva a menor GRT. El análisis de los grupos extremos (GRT 0/1 *versus* GRT 4 mostró diferencias estadísticamente significativas en la SLE (p=0,05, Figura 1).

Cribaje de cambios en el transcriptoma después de la QRT mediante SAGE

Se generaron seis librerías de genes en los pacientes A, B y C. La comparación de cambios evolutivos en el transcriptoma antes y después del tratamiento, a través del análisis de Montecarlo, mostró aquellos que se regulaban significativamente. De acuerdo a este análisis, se seleccionó una colección de genes con cambios en su expresión comunes en los tres pacientes, en el mismo sentido positivo o negativo de su regulación, considerándose además la plausibilidad biológica. 17 genes se regularon unidireccionalmente mostrando una $p < 0.05$ en, al menos, dos de los pacientes, y en siete genes la significación estadística se alcanzó en uno de los enfermos. Se seleccionaron así 25 genes para su posterior evaluación en una serie amplia de pacientes (Tabla 4).

PCR cuantitativa múltiple y respuesta tumoral

El análisis supervisado considerando la clase de miembro respuesta (TR) *versus* no respuesta (NTR) y los datos de expresión génica basal, en la muestra de 94 pacientes, determinó un perfil de 13 genes capaz de clasificar correctamente el 96.5% de los pacientes que experimentan una TR (sensibilidad), y un 80% de los casos con NTR; esta huella genómica ofrece una precisión del 93.1% de los pacientes (Tabla 6)

Símbolo del gen	Unigene
ALDH1A1	Hs.76392
BAK1	Hs.485139
CDKN1A	Hs.370771
FOS	Hs.25647
MLH1	Hs.195364
RELB	Hs.654402
STAT3	Hs.463059
TYMS	Hs.592338
CKB	Hs.173724
GPX2	Hs.2704
HIG2	Hs.433213
PH-4	Hs.654944
TFF3	Hs.82961

Tabla 6: Huella genómica de respuesta tumoral basada en la expresión basal de 13 genes

III. Discusión

Se ha identificado un perfil de 13 genes, que validado en una parte de la muestra, confirma que clasifica correctamente la respuesta del 93,1% de los pacientes. La sensibilidad para la respuesta es superior al 96%, indicando contundentemente qué pacientes van a responder a dicho tratamiento y por tanto, en los que es de gran interés aplicar este tratamiento. Los pacientes que más se pueden beneficiar de esta predicción son aquellos en los que no exista una indicación clara de neoadyuvancia, en virtud de las incertidumbres clínicas (pacientes de riesgo intermedio, como los casos de enfermedad T2N1, T3N0; aquellos con deficiente estadificación clínica, especialmente frecuente en relación a la estadificación nodal, pacientes ancianos con dudosa relación beneficio/riesgo, etc.). La no respuesta se predice con una elevada sensibilidad, del 80%. De nuevo esta predicción es de enorme interés, pues dada la muy escasa probabilidad de beneficio, estos enfermos deberían salir del protocolo habitual de tratamiento preoperatorio y ser intervenidos directamente, evitando demoras innecesarias en el tratamiento local, que dan oportunidad al mayor riesgo de estos enfermos del desarrollo

de metástasis a distancia. Adicionalmente se evitaría en estos enfermos la exposición a la considerable toxicidad de la quimiorradioterapia.

Los resultados sobre la clasificación de la respuesta tumoral no son directamente comparables con el estudio de Ghadimi, pues en nuestro estudio consideramos más sensible y objetivo medir el grado de respuesta tumoral exclusivamente a través del GRT, pues al considerar como marcador la infraestadificación, además de basarse en pruebas clínicas poco precisas, pasan desapercibidas las respuestas histológicas que no alteran de la estadificación y que parecen comportar un pronóstico igual de favorable a otras respuestas. A pesar de ello, la sensibilidad y precisión fueron superiores en la presente invención (96.5% *versus* 78% y 93.1 % *versus* 83%) con un número muy inferior de genes requeridos.

Por otra parte, en la presente invención es la primera vez que se demuestra que un perfil génico es capaz de predecir el grado de regresión tumoral en adenocarcinomas de recto a partir de muestras parafinadas. Este aspecto es de importancia de cara a la aplicación clínica, pues la colección de muestras congeladas no es tarea habitual en la rutina clínica.

Como se muestra en la Figura 2, las proteínas correspondientes a los genes que integran la huella genómica integran un entramado en el que la proteína p53 ocupa una posición central donde convergen distintas rutas. p53 desempeña una función pleiotrópica fundamental para mantener la integridad del ADN celular y para ello, actúa en distintos niveles. Cuando se produce daño en el ADN, p53 activa rutas de señalización que producen la parada del ciclo celular, activando la transcripción de genes inhibidores del ciclo celular como CDKN1A (Cdk inhibitor p21 protein) y también regulando negativamente rutas de proliferación celular. Una vez parado el ciclo, activa genes de reparación del ADN como ERCC1, ERCC2 y MLH1. Si el daño es severo y no puede ser reparado, p53 activa rutas de apoptosis, regulando negativamente genes antiapoptóticos como Bcl2 o BIRC5, y positivamente genes proapoptóticos como Bak1.

REIVINDICACIONES

1. Método *in vitro* para predecir la respuesta clínica de un sujeto diagnosticado de adenocarcinoma colorectal a una terapia que comprende

   (i) cuantificar los niveles de expresión de los genes mostrados en las Tablas 1A y 1B o

   (ii) cuantificar los niveles de proteínas codificadas por los genes de las Tablas 1A y 1B, o cualquier variante funcionalmente equivalente de dichas proteínas,

   en una muestra biológica procedente de dicho sujeto antes de la administración de la terapia, en donde una expresión elevada de los genes de la Tabla 1A o de la expresión de la proteína correspondiente a cada gen, o cualquier variante funcionalmente equivalente de dicha proteína, y una expresión disminuida de los genes de la Tabla 1B o de la expresión de la proteína correspondiente a cada gen, o cualquier variante funcionalmente equivalente de dicha proteína, con respecto a genes que se expresan de forma constitutiva, o sus correspondientes proteínas, es indicativa de una mejor respuesta del sujeto tras la administración de la terapia.

2. Método *in vitro* para predecir la respuesta clínica de un sujeto diagnosticado de adenocarcinoma colorectal a la terapia que comprende

   (i) cuantificar los niveles de expresión de los genes mostrados en las Tablas 2A y 2B o

   (ii) cuantificar los niveles de proteínas codificadas por los genes de las Tablas 2A y 2B, o cualquier variante funcionalmente equivalente de dichas proteínas,

   en una muestra biológica procedente de dicho sujeto antes de la administración de la terapia, en donde una expresión elevada de los genes de la Tabla 2A o de la expresión de la proteína correspondiente a cada gen, o cualquier variante funcionalmente equivalente de dicha proteína, y una expresión disminuida de los genes de la Tabla 2B, o de la expresión de la proteína correspondiente a cada gen, o cualquier variante funcionalmente equivalente de dicha proteína, con respecto a genes que se expresan de manera constitutiva, o sus correspondientes

proteínas, es indicativa de peor respuesta del sujeto tras la administración de la terapia.

3. Método según las reivindicaciones 1 y 2, en donde el parámetro que indica la evolución de un sujeto diagnosticado de adenocarcinoma colorectal antes de la administración de la terapia se selecciona del grupo de respuesta tumoral, riesgo de recaída, la supervivencia libre de enfermedad y/o la supervivencia global del sujeto.

4. Método *in vitro* para monitorizar el efecto de la terapia administrada a un sujeto diagnosticado de adenocarcinoma colorectal, que comprende

   (i) cuantificar los niveles de expresión de los genes mostrados en las Tablas 1A y 1B o

   (ii) cuantificar los niveles de proteínas codificadas por los genes de las Tablas 1A y 1B, o cualquier variante funcionalmente equivalente de dichas proteínas,

   en una muestra biológica procedente de dicho sujeto tras la administración de la terapia, en donde una expresión elevada de los genes de la Tabla 1A o de la expresión de la proteína correspondiente a cada gen, o cualquier variante funcionalmente equivalente de dicha proteína, y una expresión disminuida de los genes de la Tabla 1B, o de la expresión de la proteína correspondiente a cada gen, o cualquier variante funcionalmente equivalente de dicha proteína, con respecto a genes que se expresan de forma constitutiva, o sus correspondientes proteínas, es indicativa de buena respuesta tumoral a la terapia.

5. Método *in vitro* para monitorizar el efecto de la terapia administrada a un sujeto diagnosticado de adenocarcinoma colorectal, que comprende

   (i) cuantificar los niveles de expresión de los genes mostrados en las Tablas 2A y 2B o

   (ii) cuantificar los niveles de proteínas codificadas por los genes de las Tablas 2A y 2B, o cualquier variante funcionalmente equivalente de dichas proteínas,

en una muestra biológica procedente de dicho sujeto tras la administración de la terapia, en donde una expresión elevada de los genes de la Tabla 2A o de la expresión de la proteína correspondiente a cada gen, o cualquier variante funcionalmente equivalente de dicha proteína, y una expresión disminuida de los genes de la Tabla 2B o de la expresión de la proteína correspondiente a cada gen, o cualquier variante funcionalmente equivalente de dicha proteína, con respecto a genes que se expresan de forma constitutiva, o sus correspondientes proteínas, es indicativa de mala respuesta tumoral a la terapia.

6. Método *in vitro* para diseñar una terapia personalizada a un sujeto diagnosticado de adenocarcinoma colorectal, que comprende

(i) cuantificar los niveles de expresión de los genes mostrados en las Tablas 2A y 2B o

(ii) cuantificar los niveles de proteínas codificadas por los genes de las Tablas 2A y 2B, o cualquier variante funcionalmente equivalente de dichas proteínas,

en una muestra biológica procedente de dicho sujeto, en donde una expresión elevada de los genes de la Tabla 2A o de la expresión de la proteína correspondiente a cada gen, o cualquier variante funcionalmente equivalente de dicha proteína, y una expresión disminuida de los genes de la Tabla 2B o de la expresión de la proteína correspondiente a cada gen, o cualquier variante funcionalmente equivalente de dicha proteína, con respecto a genes que se expresan de forma constitutiva, o sus correspondientes proteínas, es indicativa de que el sujeto necesita una terapia alternativa a la terapia estándar.

7. Método según cualquiera de las reivindicaciones 1 a 6, en donde la cuantificación de los niveles de expresión de los genes de las Tablas 1 y 2 comprende la cuantificación del ARN mensajero (ARNm) de los genes de las Tablas 1 y 2, o un fragmento de dicho ARNm, el ADN complementario (ADNc) de los genes de dichas Tablas 1 y 2, o un fragmento de dicho ADNc, o sus mezclas.

8. Método según cualquiera de las reivindicaciones 1 a 7, en donde la cuantificación de los niveles de expresión de los genes de las Tablas 1 y 2 se realiza mediante una reacción en cadena de la polimerasa (PCR) cuantitativa multiplex o un array de ADN o ARN.

9. Método según cualquiera de las reivindicaciones 1 a 8, en donde la cuantificación de los niveles de la proteína codificada por los genes de las Tablas 1 y 2 comprende la cuantificación de las proteínas codificadas por los genes de dichas Tablas 1 y 2.

10. Método según cualquiera de las reivindicaciones 1 a 9, en donde la cuantificación de los niveles de proteína codificada por los genes de las Tablas 1 y 2 se realiza mediante western blot, ELISA o un array de proteínas.

11. Método según cualquiera de las reivindicaciones 1 a 10, en donde la terapia es un tratamiento citotóxico y/ o citostático .

12. Método según la reivindicación 11, en donde el tratamiento citotóxico y/o citostático es quimioterapia, radioterapia, agentes antitumorales o combinaciones de los mismos.

13. Método según la reivindicación 12, en donde la quimioterapia comprende un compuesto seleccionado de un agente alquilante que previene la replicación, una fluorpirimidina, un inhibidor de la timidilato sintetasa, un inhibidor de la topoisomerasa y combinaciones de los mismos.

14. Método según la reivindicación 12, en donde los agentes antitumorales comprenden agentes antiangiogénicos e inhibidores de rutas de señalización.

15. Método según la reivindicación 14, en donde el agente antiangiogénico es Bevacizumab y el agente inhibidote de la ruta de señalización es Cetuximab, , Panitumumab o ó erlotinib.

16. Método según la reivindicación 13, en donde el agente alquilante que previene la replicación es oxaliplatino, la fluorpirimidina es 5-fluoruracilo, UFT, Utefos o Capecitabina, el inhibidor de la timidilato sintetasa es raltitrexed y el inhibidor de la topoisomerasa I es irinotecan.

17. Método según cualquiera de las reivindicaciones 1 a 16, en donde la muestra biológica es una muestra de tejido o un fluido biológico.

18. Método según la reivindicación 17, en donde la muestra de tejido es tumoral.

19. Método según cualquiera de las reivindicaciones 1 a 18 en donde el cáncer de colorectal es adenocarcinoma colorectal en estadíos II ó III ó IV.

20. Un reactivo capaz de detectar los niveles de expresión de los genes de las Tablas 1 y 2 o las proteínas codificadas por dichos genes.

21. Reactivo según la reivindicación 23, en donde el reactivo comprende

(i) un conjunto de ácidos nucleicos, consistente en que cada ácido nucleico es capaz de hibridar específicamente con uno de los genes de las Tablas 1 y 2 o con los productos de su transcripción, o

(ii) un conjunto de anticuerpos, o un fragmento de los mismos capaz de detectar un antígeno, consistente en que cada anticuerpo o fragmento es capaz de unirse específicamente a una de las proteínas codificadas por los genes de las Tablas 1 y 2 o a cualquier variante funcionalmente equivalente de dicha proteína.

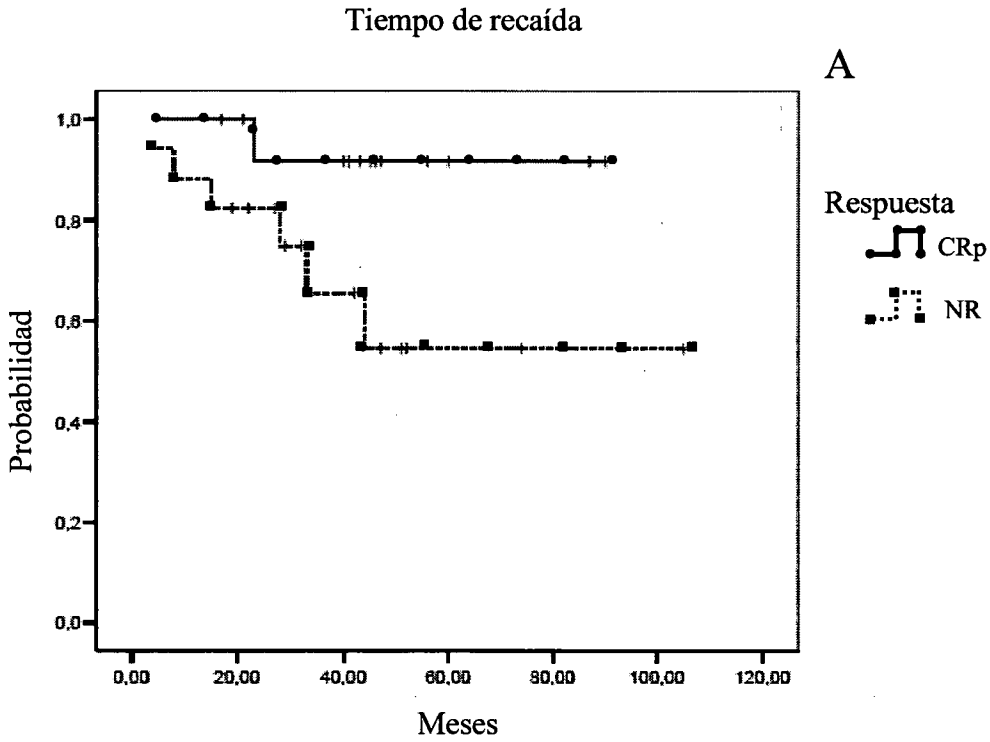
22. Reactivo según la reivindicación 24, en donde los ácidos nucleicos son sondas y/o cebadores de ADN, ADNc o ARN.

23. Un array de ADN o ARN que comprende un conjunto de ácidos nucleicos, en donde dicho conjunto de ácidos nucleicos consiste en las secuencias de ácido nucleico de los genes de las Tablas 1 y 2, o un fragmento de los mismos, o los productos de su transcripción.

24. Array según la reivindicación 23, que comprende además, una molécula de ácido nucleico de uno o varios genes de expresión constitutiva.

25. Un array que comprende un conjunto de anticuerpos, en donde dicho conjunto de anticuerpos consiste en anticuerpos, o fragmentos de los mismos, capaces de unirse específicamente con las proteínas codificadas por los genes de las Tablas 1 y 2 o cualquier variante funcionalmente equivalente de dichas proteínas.

26. Array según la reivindicación 25, que comprende además, anticuerpos, o fragmentos de los mismos, capaces de unirse específicamente con las proteínas codificadas por uno o varios genes de expresión constitutiva.


Tiempo de recaída
A
Probabilidad
1,0
0,8
0,6
0,4
0,2
0,0
0,00
20,00
40,00
60,00
80,00
100,00
120,00
Meses
Respuesta
CRp
NR

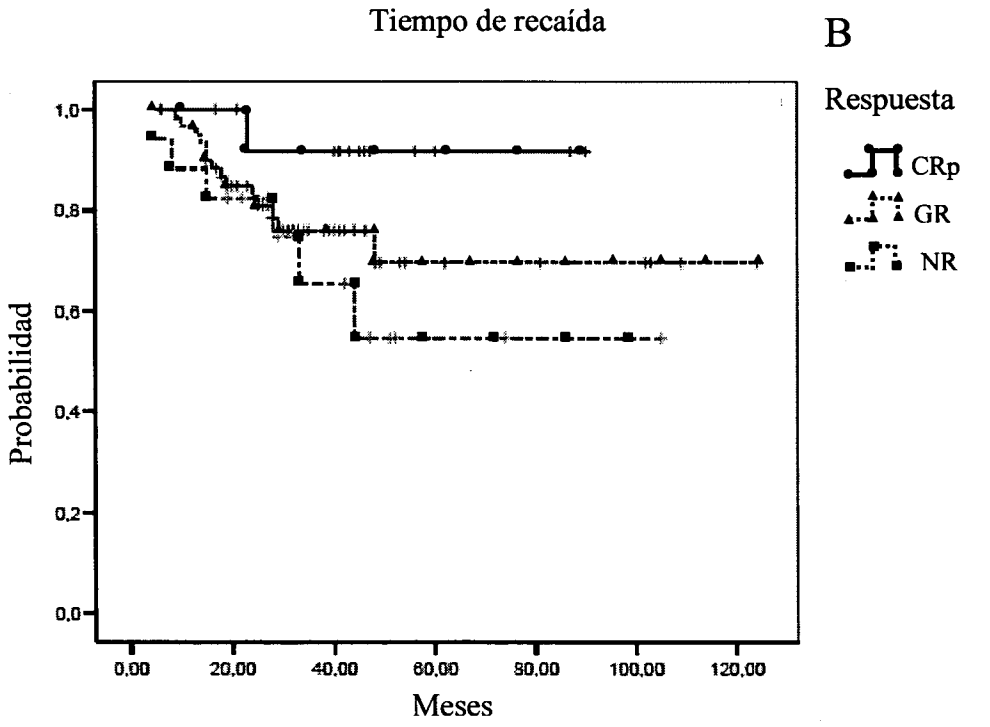

Tiempo de recaída
B
Probabilidad
1,0
0,8
0,6
0,4
0,2
0,0
0,00
20,00
40,00
60,00
80,00
100,00
120,00
Meses
Respuesta
CRp
GR
NR

Figura 1

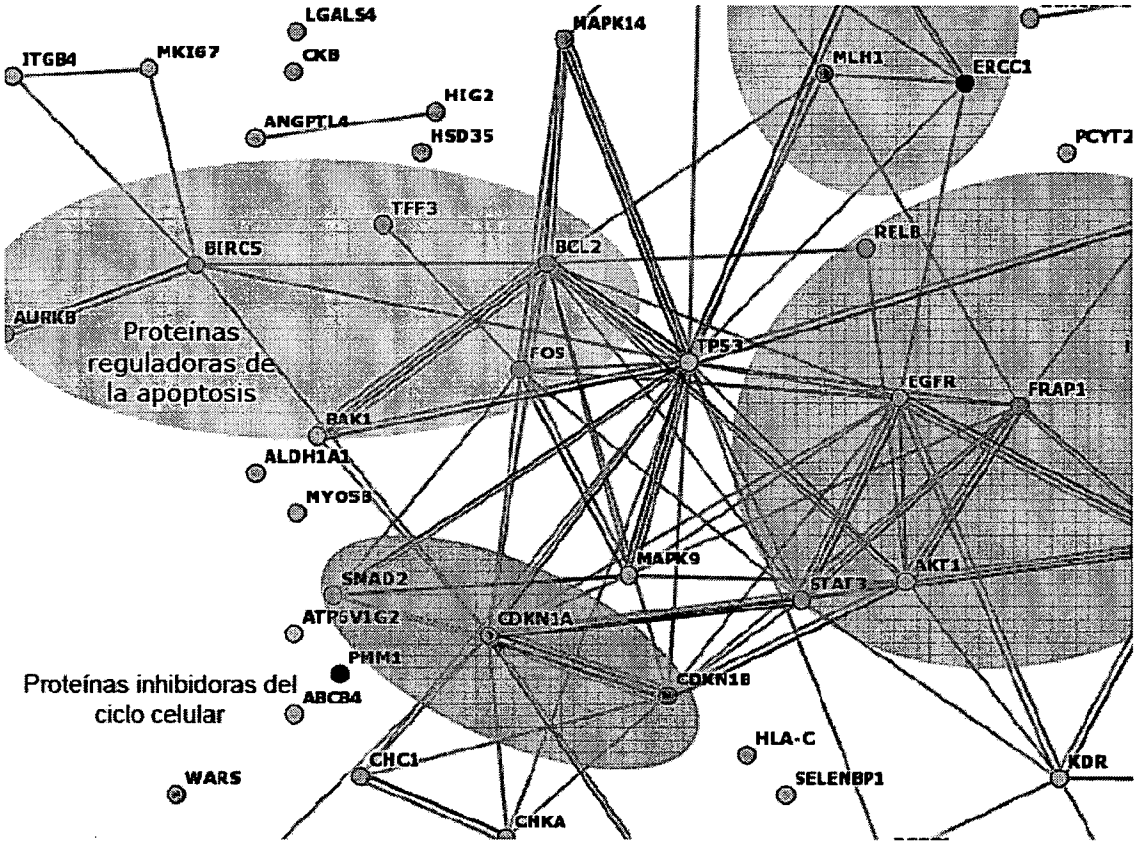

LGALS4
MAPK14
ITGB4
MKI67
CKB
MLH1
ERCC1
HIG2
ANGPTL4
HSD35
PCYT2
TFF3
RELB
BIRC5
BCL2
AURKB
Proteínas reguladoras de la apoptosis
FOS
TP53
EGFR
FRAP1
BAK1
ALDH1A1
MYO5B
MAPK9
AKT1
SMAD2
STAT3
ATP6V1G2
CDKN1A
PHM1
Proteínas inhibidoras del ciclo celular
CDKN1B
ABCB4
HLA-C
CHC1
KDR
WARS
SELENBP1
CHKA

FIGURA 2

INTERNATIONAL SEARCH REPORT

International application No.
PCT/ ES 2008/000756

A. CLASSIFICATION OF SUBJECT MATTER

see extra sheet
According to International Patent Classification (IPC) or to both national classification and IPC

B. FIELDS SEARCHED

Minimum documentation searched (classification system followed by classification symbols)
C12Q, G01N

Documentation searched other than minimum documentation to the extent that such documents are included in the fields searched

Electronic data base consulted during the international search (name of data base and, where practicable, search terms used)

INVENES, EPODOC, WPI, MEDLINE, BIOSIS, NPL, EMBASE, XPESP, GEO Profiles.

C. DOCUMENTS CONSIDERED TO BE RELEVANT

Category*	Citation of document, with indication, where appropriate, of the relevant passages	Relevant to claim No.
A	(del RÍO, M., *et al.*) Gene expression signature in advanced colorectal cancer patients select drugs and response for the use of leucovoril, fluorouracil and irinotecan. *J. Clin. Oncol.* 01-03-07. Vol. 25, n. 7, pages 773-780.	1-19
A	(MA, Y., *et al.*) Predicting cancer drug response by proteomic profiling. *Clin. Cancer Res.* 01-08-06. Vol. 12, n. 15, pages 4583-4589.	1-19
A	(OGAWA, K., *et al.*) Predicting the tumor response to radiotherapy using microarray analysis. *Oncology Reports.* Nov-2007. Vol. 18, n. 5, pages 1243-1248.	1-19

☐ Further documents are listed in the continuation of Box C. ☐ See patent family annex.

* Special categories of cited documents:
"A" document defining the general state of the art which is not considered to be of particular relevance.
"E" earlier document but published on or after the international filing date
"L" document which may throw doubts on priority claim(s) or which is cited to establish the publication date of another citation or other special reason (as specified)
"O" document referring to an oral disclosure use, exhibition, or other means
"P" document published prior to the international filing date but later than the priority date claimed
"T" later document published after the international filing date or priority date and not in conflict with the application but cited to understand the principle or theory underlying the invention
"X" document of particular relevance; the claimed invention cannot be considered novel or cannot be considered to involve an inventive step when the document is taken alone
"Y" document of particular relevance; the claimed invention cannot be considered to involve an inventive step when the document is combined with one or more other documents , such combination being obvious to a person skilled in the art
"&" document member of the same patent family

Date of the actual completion of the international search	Date of mailing of the international search report
27.March.2009 (27.03.2009)	**(01/04/2009)**
Name and mailing address of the ISA/ O.E.P.M. Paseo de la Castellana, 75 28071 Madrid, España. Facsimile No. 34 91 3495304	Authorized officer B. Pérez Esteban Telephone No. +34 91 349 8484

Form PCT/ISA/210 (second sheet) (July 2008)

INTERNATIONAL SEARCH REPORT

International application No.

PCT/ ES 2008/000756

CLASSIFICATION OF SUBJECT MATTER

C12Q 1/68 (2006.01)
G01N 33/574 (2006.01)

INFORME DE BÚSQUEDA INTERNACIONAL

Solicitud internacional Nº

PCT/ ES 2008/000756

A. CLASIFICACIÓN DEL OBJETO DE LA SOLICITUD

Ver hoja adicional

De acuerdo con la Clasificación Internacional de Patentes (CIP) o según la clasificación nacional y CIP.

B. SECTORES COMPRENDIDOS POR LA BÚSQUEDA

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

C12Q, G01N

Otra documentación consultada, además de la documentación mínima, en la medida en que tales documentos formen parte de los sectores comprendidos por la búsqueda

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

INVENES, EPODOC, WPI, MEDLINE, BIOSIS, NPL, EMBASE, XPESP, GEO Profiles.

C. DOCUMENTOS CONSIDERADOS RELEVANTES

Categoría*	Documentos citados, con indicación, si procede, de las partes relevantes	Relevante para las reivindicaciones Nº
A	(del RÍO, M., *et al.*) Gene expression signature in advanced colorectal cancer patients select drugs and response for the use of leucovoril, fluorouracil and irinotecan. *J. Clin. Oncol.* 01-03-07. Vol. 25, nº 7, páginas 773-780.	1-19
A	(MA, Y., *et al.*) Predicting cancer drug response by proteomic profiling. *Clin. Cancer Res.* 01-08-06. Vol. 12, nº 15, páginas 4583-4589.	1-19
A	(OGAWA, K., *et al.*) Predicting the tumor response to radiotherapy using microarray analysis. *Oncology Reports.* Nov-2007. Vol. 18, nº 5, páginas 1243-1248.	1-19

☐ En la continuación del Recuadro C se relacionan otros documentos ☐ Los documentos de familias de patentes se indican en el Anexo

* Categorías especiales de documentos citados:

"A" documento que define el estado general de la técnica no considerado como particularmente relevante.

"E" solicitud de patente o patente anterior pero publicada en la fecha de presentación internacional o en fecha posterior.

"L" documento que puede plantear dudas sobre una reivindicación de prioridad o que se cita para determinar la fecha de publicación de otra cita o por una razón especial (como la indicada).

"O" documento que se refiere a una divulgación oral, a una utilización, a una exposición o a cualquier otro medio.

"P" documento publicado antes de la fecha de presentación internacional pero con posterioridad a la fecha de prioridad reivindicada.

"T" documento ulterior publicado con posterioridad a la fecha de presentación internacional o de prioridad que no pertenece al estado de la técnica pertinente pero que se cita por permitir la comprensión del principio o teoría que constituye la base de la invención.

"X" documento particularmente relevante; la invención reivindicada no puede considerarse nueva o que implique una actividad inventiva por referencia al documento aisladamente considerado.

"Y" documento particularmente relevante; la invención reivindicada no puede considerarse que implique una actividad inventiva cuando el documento se asocia a otro u otros documentos de la misma naturaleza, cuya combinación resulta evidente para un experto en la materia.

"&" documento que forma parte de la misma familia de patentes.

Fecha en que se ha concluido efectivamente la búsqueda internacional.	Fecha de expedición del informe de búsqueda internacional
27.Marzo.2009 (27.03.2009)	**01 de Abril de 2009 (01/04/2009)**
Nombre y dirección postal de la Administración encargada de la búsqueda internacional O.E.P.M. Paseo de la Castellana, 75 28071 Madrid, España. Nº de fax 34 91 3495304	Funcionario autorizado B. Pérez Esteban Nº de teléfono +34 91 349 8484

INFORME DE BÚSQUEDA INTERNACIONAL

Solicitud internacional Nº

PCT/ ES 2008/000756

Recuadro II **Observaciones cuando se estime que algunas reivindicaciones no pueden ser objeto de búsqueda (continuación del punto 2 de la primera hoja)**

Este informe de búsqueda internacional no se ha realizado en relación a ciertas reivindicaciones según el Artículo 17.2.a) por los siguientes motivos:

1. ☐ Las reivindicaciones Nºs:
se refieren a un objeto con respecto al cual esta Administración no está obligada a proceder a la búsqueda, a saber:

2. ☒ Las reivindicaciones Nºs: 7 (parcialmente), 20 a 26 (total)
se refieren a elementos de la solicitud internacional que no cumplen con los requisitos establecidos, de tal modo que no pueda efectuarse una búsqueda provechosa, concretamente:

La reivindicación 7 no es clara, ya que define los fragmentos de los ARNm o ADNc de los genes reivindicados que pueden ser utilizados para medir los niveles de expresión de los genes, lo que no permite hacer una búsqueda provechosa.

(*ver hoja adicional*)

3. ☐ Las reivindicaciones Nºs:
son reivindicaciones dependientes y no están redactadas de conformidad con los párrafos segundo y tercero de la Regla 6.4.a).

Recuadro III **Observaciones cuando falta unidad de invención (continuación del punto 3 de la primera hoja)**

La Administración encargada de la búsqueda internacional ha detectado varias invenciones en la presente solicitud internacional, a saber:

1. ☐ Dado que todas las tasas adicionales requeridas han sido satisfechas por el solicitante dentro del plazo, el presente informe de búsqueda de tipo internacional comprende todas las reivindicaciones que pueden ser objeto de búsqueda.

2. ☐ Dado que todas las reivindicaciones que pueden ser objeto de búsqueda podrían serlo sin realizar un esfuerzo que justifique tasas adicionales, esta Administración no requirió el pago de tasas adicionales.

3. ☐ Dado que tan sólo una parte de las tasas adicionales requeridas ha sido satisfecha dentro del plazo por el solicitante, el presente informe de búsqueda de tipo internacional comprende solamente aquellas reivindicaciones respecto de las cuales han sido satisfechas las tasas, concretamente las reivindicaciones Nºs:

4. ☐ Ninguna de las tasas adicionales requeridas ha sido satisfecha por el solicitante dentro de plazo. En consecuencia, el presente informe de búsqueda de tipo internacional se limita a la invención mencionada en primer término en las reivindicaciones, cubierta por las reivindicaciones Nºs:

Indicación en cuanto a la protesta

☐ Se acompañó a las tasas adicionales la protesta del solicitante y, en su caso, el pago de una tasa de protesta.

☐ Se acompañó a las tasas adicionales la protesta del solicitante, pero la tasa de protesta aplicable no se pagó en el plazo establecidopara ello.

☐ El pago de las tasas adicionales no ha sido acompañado de ninguna protesta.

INFORME DE BÚSQUEDA INTERNACIONAL

Solicitud internacional Nº

PCT/ ES 2008/000756

CLASIFICACIÓN DEL OBJETO DE LA SOLICITUD

C12Q 1/68 (2006.01)
G01N 33/574 (2006.01)

(*Viene de recuadro II*)

Las reivindicaciones 20 a 26 se han excluido de la búsqueda por exceder del ámbito de la descripción, pues en ella no aparecen los reactivos utilizados para la detección de los genes o las proteínas del método, ni se especifican los ácidos nucleicos y las proteínas que constituirían el microarray.