

19



OFICINA ESPAÑOLA DE
PATENTES Y MARCAS

ESPAÑA



11 Número de publicación: **2 976 963**

51 Int. Cl.:

G01N 33/574 (2006.01)

12

TRADUCCIÓN DE PATENTE EUROPEA

T3

86 Fecha de presentación y número de la solicitud internacional: **25.01.2019** **PCT/EP2019/051868**

87 Fecha y número de publicación internacional: **08.08.2019** **WO19149633**

96 Fecha de presentación y número de la solicitud europea: **25.01.2019** **E 19705289 (7)**

97 Fecha y número de publicación de la concesión europea: **06.03.2024** **EP 3746791**

54 Título: **Uso de la proteína Rep de BMMF1 como biomarcador de cáncer colorrectal**

30 Prioridad:

30.01.2018 EP 18154190

45 Fecha de publicación y mención en BOPI de la traducción de la patente:
13.08.2024

73 Titular/es:

**DEUTSCHES KREBSFORSCHUNGSZENTRUM
STIFTUNG DES ÖFFENTLICHEN RECHTS
(100.0%)
Im Neuenheimer Feld 280
69120 Heidelberg, DE**

72 Inventor/es:

**BUND, TIMO;
ZUR HAUSEN, HARALD;
DE VILLIERS, ETHEL-MICHELE;
TESSMER, CLAUDIA;
HEIKENWÄLDER, MATHIAS;
WEBER, ACHIM y
BURK-KÖRNER, AMELIE**

74 Agente/Representante:

SÁNCHEZ SILVA, Jesús Eladio

Observaciones:

Véase nota informativa (Remarks, Remarques o Bemerkungen) en el folleto original publicado por la Oficina Europea de Patentes

ES 2 976 963 T3

Aviso: En el plazo de nueve meses a contar desde la fecha de publicación en el Boletín Europeo de Patentes, de la mención de concesión de la patente europea, cualquier persona podrá oponerse ante la Oficina Europea de Patentes a la patente concedida. La oposición deberá formularse por escrito y estar motivada; sólo se considerará como formulada una vez que se haya realizado el pago de la tasa de oposición (art. 99.1 del Convenio sobre Concesión de Patentes Europeas).

DESCRIPCIÓN

Uso de la proteína Rep de BMMF1 como biomarcador de cáncer colorrectal

- 5 La invención se refiere al uso de una proteína asociada a la replicación del ADN (Rep) como biomarcador del cáncer colorrectal (CRC).

Antecedentes de la invención

- 10 A miles de personas en todo el mundo se les ha diagnosticado cáncer de colon y muchas de ellas finalmente han muerto a causa de la enfermedad. Los pacientes suelen ser tratados típicamente con cirugía de resección del colon, seguida de radioterapia o quimioterapia sistémica, la terapia se basa en las características macroscópicas del tumor y la etapa del tumor. La tasa de supervivencia libre de recaída a 5 años mejora en algunos pacientes que reciben quimioterapia después de una cirugía de resección quirúrgica del colon, mientras que esta estadística no mejora en otros.

- 15 El cáncer colorrectal (CRC) es la segunda causa principal de muerte por cáncer en los EE.UU. La mayoría de los pacientes con CRC son diagnosticados tarde debido a la falta de biomarcadores predictivos y a una baja tasa de detección atribuible a las molestias de los métodos de detección actuales. Para mejorar la detección más temprana, se necesitan biomarcadores que faciliten la detección temprana y obtengan más información sobre la patogénesis del CRC.

- 20 El CRC es un cáncer que evolucionó como consecuencia del crecimiento celular descontrolado en el colon o el recto. Estas neoplasias malignas pueden desarrollarse como consecuencia de adenomas benignos preexistentes donde las alteraciones genéticas promueven la transición del crecimiento normal al canceroso. Los eventos epigenéticos han sido reconocidos como un mecanismo importante para esta transición.

- 25 Un panel de biomarcadores de proteínas en sangre para la detección del cáncer colorrectal como se describió por Fung y otros en 2015 aún no ha arrojado los resultados deseados en cuanto a previsibilidad. Por lo tanto, desafortunadamente, no existe un biomarcador para el CRC que puede usarse tanto con fines de pronóstico como de diagnóstico.

Descripción de la presente invención

- 30 En la presente solicitud los inventores han creado un modelo para el desarrollo del cáncer de colon que se muestra en la Figura 1.

- 35 Los inventores han descubierto que la absorción de agentes BMMF (factor de carne y leche bovina) dentro de los primeros meses de vida, ya sea mediante la sustitución de la lactancia materna durante el destete por productos de leche de vaca o mediante la absorción de productos lácteos o de carne de vacuno en general, conduce a la infección temprana de recién nacidos con antígenos BMMF en el colon. Debido a la disminución de los anticuerpos maternos y a la debilidad frecuentemente observada del sistema inmunológico, a menudo junto con la inducción de inmunotolerancias del recién nacido durante este período tan temprano de la vida, estos agentes podrían escapar directamente a la respuesta inmunológica del colon o a una situación de inmunotolerancia contra estos agentes podrían ser inducidos. Dentro de los próximos años o décadas, en dependencia de del sistema inmunológico del huésped, se acumularán cada vez más antígenos BMMF dentro de la *lámina propia* del colon. Esta acumulación también puede desencadenarse por la absorción de moléculas específicas que pueden representar receptores de BMMF. Estas moléculas también se absorben mediante el consumo de productos bovinos y se metabolizan en receptores en la superficie de las células huésped. Cuando se alcanza un cierto nivel de antígeno mediante la absorción continua de BMMF en combinación con la propagación focal de la infección, la respuesta inmunológica del huésped induce un estado de inflamación crónica y local que produce un aumento estable de especies reactivas del oxígeno (ROS) y ciclooxygenasa-2 (Cox-2) que aumenta drásticamente la probabilidad de proliferación celular desregulada con la fijación concomitante de mutaciones aleatorias en las células circundantes inducidas por ROS.

- 40 Los resultados disponibles basados en la tinción IHC con Ki67 (Ki67 = marcador de proliferación) muestran que especialmente las células epiteliales basales derivadas de células madre epiteliales ubicadas cerca del punto final de las criptas y que migran hacia la parte luminal distal de las criptas presentan una proliferación intrínsecamente alta que permite una manifestación estocástica de mutaciones como requisito básico para la tumorigénesis y el desarrollo del cáncer de colon (Figura 2). Por lo tanto, los BMMF representan un desencadenante específico y local para la inducción de inflamación crónica dentro de la lámina propia, lo que conduce a un aumento de ROS que induce la proliferación y mutación en las células epiteliales circundantes, lo que eventualmente conduce a la formación de pólipos como precursores del cáncer de colon.

- 45 En detalle, una selección de 11 pares de muestras de tejido de donantes (cada tejido tumoral y tejido periférico) y 4 muestras de diferentes donantes de tejido de pólipos de colon se sometieron a tinción IHC con anticuerpos monoclonales de ratón anti-Rep. Con respecto a las 11 muestras tumorales y periféricas, 9 de 11 tejidos mostraron

una fuerte tinción de anticuerpos específicos con al menos dos anticuerpos anti-Rep. A modo de ejemplo, la tinción con un anticuerpo anti-Rep (por ejemplo, anticuerpo 10-3) muestra la detección específica de dianas proteicas en las muestras de tejido 4798, 4799, 4802, 4806, 4809 y 4813 en el tumor, así como también en el tejido periférico. En general, la intensidad de la tinción es mayor para el tejido periférico, donde los agregados citoplasmáticos intensamente teñidos de menor tamaño se concentran dentro de distintas islas de células dentro de la *lámina propia* entre las Criptas de Lieberkuhn características del tejido del colon (todas las imágenes muestran cortes transversales a lo largo de las Criptas de Lieberkuhn con el lumen (interior) de las criptas en contacto con los fluidos del colon en el centro del arreglo en forma de anillo de las células epiteliales de las criptas; Figura 2). La tinción de tejidos tumorales también muestra una tinción intensa de agregados de menor tamaño principalmente dentro de las regiones citoplasmáticas de las células del estroma dentro del tejido tumoral. Las mismas estructuras similares a agregados también son visibles en la *lámina propia* de pólipos del colon mediante el uso de cuatro anticuerpos anti-Rep diferentes para la tinción de cortes secuenciales. Tanto para el tejido periférico del colon como para los pólipos del colon, las regiones con mayor detección de anticuerpos específicos de Rep se correlacionan con regiones con niveles de detección más altos para células CD68 positivas, lo que apunta hacia una localización de los antígenos específicos de Rep en las islas inflamatorias, es decir, regiones con niveles especialmente altos de monocitos inflamatorios, macrófagos circulantes o macrófagos tisulares.

Como se muestra adicionalmente en la presente solicitud, la comparación de las puntuaciones IRS de Rep (IRS, puntuación inmunorreactiva) de tejidos peritumorales y tumorales confirma una detección de Rep significativamente mayor en el tejido peritumoral de los pacientes con CRC analizados.

Los inventores concluyeron que para la inducción del cáncer la cantidad de antígeno BMMF dentro de la *lámina propia* entre las criptas del colon es importante para la inducción de inflamación local crónica, la inducción de ROS/NOS en difusión que finalmente induce mutaciones aleatorias en las células madre e hijas en división de las criptas vecinas que podrían convertirse en pólipos tempranos/células precursoras de tumores mediante la manifestación de mutaciones clave. Por lo tanto, debería observarse una correlación entre los niveles peritumorales de BMMF y la intensidad de los macrófagos positivos para CD68. De hecho, al probar los valores del IRS para la detección de Rep frente a los valores del IRS para la detección de CD68 dentro de los pacientes con CRC correspondientes, se observa una correlación significativa entre la detección de Rep y CD68, lo que muestra que niveles de detección más altos de Rep se correlacionan con niveles más altos de detección de CD68.

Para probar una puntuación de pronóstico de la detección de Rep en las regiones peritumorales de pacientes con CRC en función del tiempo de supervivencia del paciente, se calcularon curvas de Kaplan Meier basadas en los datos de los pacientes que se agruparon en "Rep baja" y "Rep alta". Los niveles altos de Rep en pacientes con CRC se correlacionan con una reducción significativa del tiempo de supervivencia general del paciente, c.f. Figura 13 y Figura 14. Los experimentos muestran que los niveles elevados de Rep se correlacionan con una relación de riesgos instantáneos de 4,7, lo que indica una correlación negativa entre la detección de Rep y la supervivencia del paciente y subraya la puntuación pronóstica de la detección de Rep en el tejido del CRC. Los pacientes con una puntuación "Rep baja" muestran una probabilidad de supervivencia a 5 y 10 años del 92 %, mientras que los pacientes con "Rep alta" muestran una probabilidad de supervivencia significativamente menor del 74 % después de 5 años y del 65 % después de 10 años, lo que representa una disminución del 20 % al 30 %.

Los inventores también probaron el nivel de anticuerpos de pacientes con cáncer de colon al poner en contacto la proteína Rep con una muestra sérica que se sospecha que contiene anticuerpos anti-proteína Rep en condiciones que permiten que la proteína Rep se una a cualquier anticuerpo presente en la muestra. Los inventores reconocieron que la reactividad del suero está reducida en pacientes con cáncer de colon en comparación con controles sanos.

Hasta ahora se ha aislado un espectro de 18 moléculas de ADN diferentes, pero parcialmente relacionadas, de diferentes materiales de prueba (sueros bovinos, leche, tejido cerebral de las autopsias de un paciente con esclerosis múltiple) (Funk, Gunst y otros 2014, Gunst, zur Hausen y otros 2014, Lamberto, Gunst y otros 2014, Whitley, Gunst y otros 2014; el documento WO 2015/062726 A2; el documento WO 2016/005054 A2). Los 18 aislados se dividieron en cuatro grupos diferentes, BMMF1 a BMMF4, de acuerdo con sus características moleculares (zur Hausen y otros, 2017). Tres de estos grupos revelaron un grado notable de similitud con *Acinetobacter baumannii* y plásmidos de *Psychrobacter*. El cuarto grupo comprende 3 aislados que eran representantes de *Gemycircularviridae*. Los supuestos genes Rep fueron identificados como parte de las secuencias de ADN del BMMF obtenidas mediante las comparaciones *en sílice* con secuencias disponibles. La amplificación mediante el uso de cebadores contiguos en el gen rep condujo al aislamiento de genomas de ADN circulares completos y parciales de sueros bovinos (Funk y otros, 2014). Esto se extendió a muestras de productos lácteos disponibles comercialmente para detectar la presencia de genomas de ADN monocatenario circulares específicos. Se clonaron y secuenciaron moléculas de ADN monocatenario circulares de longitud completa de 14 aislados diferentes (-1100 a 3000 nucleótidos) (Whitley y otros, 2014; Gunst y otros, 2014; Funk y otros, 2014; Lamberto y otros, 2014). Se obtuvieron cuatro aislamientos adicionales de cerebro y suero humanos (todos de pacientes con esclerosis múltiple) (Whitley y otros, 2014; Gunst y otros, 2014; Lamberto y otros, 2014).

Entre estos aislados, dos moléculas de ADN estrechamente relacionadas con el aislado Sphinx 1.76 asociado a la encefalopatía espongiforme transmisible (TSE) (1758 pb; número de acceso HQ444404, (Manuelidis L. 2011)) se

aislaron del tejido cerebral de un paciente con MS. Estos aislados fueron MSBI1.176 (MSBI, aislado cerebral de esclerosis múltiple) (1766 pb) y MSBI2.176 (1766 pb) que se denominan "genoma MSBI1" y "genoma MSBI2", respectivamente. El MSBI1.176 comparte un 98 % de similitud de nucleótidos con la secuencia de Sphinx 1.76. Los grandes marcos de lectura abiertos (ORF) de los aislados codifican una supuesta proteína de replicación del ADN que comparte una gran similitud entre ellos. Otra característica común es la presencia de repeticiones en tándem similares a iterones. La alineación de esta región repetida indica una variación en el núcleo de los nucleótidos individuales. Estas repeticiones similares a iterones pueden constituir los sitios de unión para las proteínas Rep. Las secuencias de los aislados se han depositado en el banco de datos EMBL con los números de acceso LK931491 (MSBI1.176) y LK931492 (MSBI2.176) (Whitley C. y otros 2014) y se han alineado y descrito en el documento WO 2016/005054 A2.

Se obtuvieron otros aislados de leche de vaca. Estos aislados de leche de vaca (CMI) fueron CMI1.252, CMI2.214 y CMI3.168, que se denominan "genoma CMI1", "genoma CMI2" y "genoma CMI3", respectivamente. Las secuencias de los aislados se han depositado en el banco de datos EMBL con los números de acceso LK931487 (CMI1.252), LK931488 (CMI2.214) y LK931489 (CMI3.168) y se han alineado y descrito en el documento WO 2016/005054 A2.

Los presentes inventores han descubierto que tanto los genomas CMI como los genomas MSBI muestran una producción significativa de ARN transcrito y la proteína Rep codificada se expresa en tejido periférico alrededor de las islas y pólipos de cáncer de colon. Los presentes inventores han descubierto que las proteínas Rep codificadas (Rep de MSBI1, Rep de MSBI2, Rep de CMI1, Rep de CMI2, Rep de CMI3) representan un biomarcador para el cáncer de colon. Como proteína asociada a la replicación del ADN (RepB), la proteína Rep tiene actividad de unión al ADN y puede ser esencial para el inicio de la replicación de moléculas de ADN episomales o virales. Las proteínas Rep muestran un marcado potencial de auto-oligomerización y agregación, que fue descrito dentro de los sistemas procarióticos *in vivo* e *in vitro* (Giraldo, Moreno-Díaz de la Espina y otros 2011, Torreira, Moreno-Del Alamo y otros 2015).

Los inventores han generado anticuerpos monoclonales contra la proteína Rep. En las modalidades particulares, los anticuerpos anti-Rep se unen a los epítomos de la proteína Rep que se ejemplifican en la Figura 3. Los anticuerpos particularmente preferidos se unen a los epítomos dentro de una secuencia de aminoácidos seleccionada del grupo que consiste en los aminoácidos del 1 al 136, del 137 al 229 y del 230 al 324 de la SEQ ID NO:1. Por ejemplo, el anticuerpo se une a un epítopo comprendido en la SEQ ID NO:2 o SEQ ID NO:3.

Breve descripción de las figuras:

Figura 1 muestra el modelo propuesto para el desarrollo del cáncer de colon

Figura 2 muestra los resultados basados en la tinción IHC con Ki67 (datos disponibles en línea). Puede verse que, especialmente las células epiteliales basales derivadas de células madre epiteliales ubicadas cerca del punto final de las criptas y que migran hacia la parte luminal distal de las criptas, presentan una proliferación intrínsecamente alta que permite la manifestación estocástica de mutaciones como requisito básico para la tumorigénesis y el desarrollo del cáncer de colon

Figura 3 muestra las características de los anticuerpos generados y la localización de epítomos dentro de Rep

Figura 4 muestra datos de IHC obtenidos mediante el empleo del anticuerpo 10-3 (anticuerpo anti-Rep del grupo C) en tejido de cáncer de colon y tejido periférico no canceroso circundante; designaciones de pacientes: #4799, #4809, #4798, #4802, #4813 y #4806

Figura 5 muestra datos de IHC obtenidos mediante el empleo de anticuerpos anti-Rep 3-6 y 10-3 (anticuerpos anti-Rep del grupo C) y anticuerpos anti-CD68 disponibles comercialmente para el tejido periférico que rodea el tumor de colon del paciente #4809.

Figura 6 muestra datos de IHC obtenidos mediante el empleo de anticuerpos anti-Rep, anticuerpos de los grupos A y C (anticuerpos 1-5, 3-6, 10-3 y 11-5) y anticuerpos anti-CD68 disponibles comercialmente para el tejido periférico que rodea los pólipos benignos del colon.

Figura 7 Distribución de los valores del IRS para la tinción inmunohistoquímica de la región del tejido tumoral de pacientes con CRC con un anticuerpo anti-Rep

Figura 8 Distribución de los valores del IRS para la tinción inmunohistoquímica de la región del tejido peritumoral de pacientes con CRC con un anticuerpo anti-Rep

Figura 9 Distribución de los valores del IRS para la tinción inmunohistoquímica de la región del tejido tumoral de pacientes con CRC con un anticuerpo anti-CD68

Figura 10 Distribución de los valores del IRS para la tinción inmunohistoquímica de la región del tejido

peritumoral de pacientes con CRC con un anticuerpo anti-CD68

Figura 11 Representación de los valores del IRS para tejidos peritumorales y tumorales de pacientes con CRC.

5 Figura 12 Los valores de detección de Rep del IRS se trazan frente a la positividad de CD68, que se agrupa en 7 niveles (0-6)

Figura 13 Representación de Kaplan-Meier de la supervivencia de pacientes con CRC agrupados en "Rep baja" (valores IRS 0-1,9) y "Rep alta" (valores IRS 2-6)

10 Figura 14 Representación de la relación de riesgos instantáneos pronóstico de la detección de Rep en tejidos peritumorales de pacientes con CRC basado en la correlación de Cox de las curvas de supervivencia de Kaplan-Meier de pacientes con CRC agrupados en "Rep baja" (valores IRS 0-1,9) y "Rep alta" (valores IRS 2-6)

15 Figura 15 Representación de Kaplan-Meier de la supervivencia de pacientes con CRC agrupados en "CD68 bajo" (valores de IRS 0-2,9) y "CD68 alto" (valores de IRS 3-6)

20 Figura 16 Inmunodetección de antígenos BMMF-Rep en lisado de tejido de un paciente ilustrativo con CRC (peritumoral y tumoral), así como también de cuatro pólipos de donantes individuales después de la inmunotinción con el anticuerpo anti-BMMF-Rep 5-2. Se cargaron 100 ng de proteína MSB1.176 Rep purificada por afinidad como control positivo

25 La presente invención se define en las reivindicaciones anexas. La invención proporciona la enseñanza de que las proteínas Rep pueden representar biomarcadores de un mayor riesgo de desarrollar de cáncer de colon y son útiles como marcador para determinar el pronóstico de supervivencia global de los pacientes con CRC.

30 Los términos "cáncer de colon" y "cáncer colorrectal" (CRC) se usan indistintamente. El CRC es un cáncer que evolucionó como consecuencia del crecimiento celular descontrolado en el colon o el recto. Estas neoplasias malignas pueden desarrollarse como consecuencia de adenomas benignos preexistentes donde las alteraciones genéticas promueven la transición del crecimiento normal al canceroso. Los términos "cáncer de colon" o CRC significan etapas previas, tempranas o tardías de la enfermedad y metástasis derivadas de la misma.

35 En una modalidad alternativa, la presente invención también puede abarcar la prueba sistemática de tejido del colon sano (tejido de individuos sin diagnóstico de cáncer o un indicio específico de la enfermedad) para evaluar el riesgo de enfermedad en el futuro. Esto significa que la presente invención también es adecuada para determinar la predisposición a desarrollar CRC.

40 La "Proteína rep", como se usa en la presente, se refiere a una proteína asociada a la replicación del ADN (RepB). La proteína Rep comprende actividad de unión al ADN y podría ser esencial para el inicio de la replicación de moléculas de ADN episomal/viral. En general, la proteína Rep se refiere a una proteína Rep del grupo del Genoma de Esfinge Pequeña (Whitley y otros, 2014). En particular, la proteína Rep es una proteína Rep codificada por el genoma MSB1 (Rep de MSB1), una proteína Rep codificada por el genoma MSB2 (Rep de MSB2), una proteína Rep codificada por el genoma CMI1 (Rep de CMI1), una proteína Rep codificada por el genoma CMI2 (Rep de CMI2) o una proteína Rep codificada por el genoma CMI3 (Rep de CMI3). Preferentemente, la proteína Rep de MSB1 está codificada por MSB1.176 depositada en el banco de datos EMBL con el número de acceso LK931491 y tiene la secuencia de aminoácidos como se representa en la SEQ ID NO:1 o la proteína Rep es MSB2 codificada por MSB2.176 depositada en el banco de datos EMBL con el número de acceso LK931492 y tiene la secuencia de aminoácidos como se representa en la SEQ ID NO:8 (Whitley, Gunst y otros 2014). En otra modalidad preferida, la proteína Rep de CMI1 está codificada por CMI1.252 depositada en el banco de datos EMBL con el número de acceso LK931487 y tiene la secuencia de aminoácidos como se representa en la SEQ ID NO:10. En otra modalidad preferida, la proteína Rep de CMI2 está codificada por CMI2.214 depositada en el banco de datos EMBL con el número de acceso LK931488 y tiene la secuencia de aminoácidos como se representa en la SEQ ID NO:11. En otra modalidad preferida, la proteína Rep de CMI3 está codificada por CMI3.168 depositada en el banco de datos EMBL con el número de acceso LK931489 y tiene la secuencia de aminoácidos como se representa en la SEQ ID NO:12. En una modalidad preferida particular, la proteína Rep comprende una región N-terminal conservada entre los genomas de BMMF1 que consiste esencialmente en aminoácidos del 1 al 229 de la SEQ ID NO:1 y una región variable C-terminal específica para MSB1.176 que consiste esencialmente en aminoácidos del 230 a 324 de la SEQ ID NO:1. La región conservada N-terminal comprende un supuesto primer dominio de unión al ADN que consiste esencialmente en los aminoácidos del 1 al 136 de la SEQ ID NO: 1 y un supuesto segundo dominio de unión a ADN que consiste esencialmente en los aminoácidos del 137 a 229 de la SEQ ID NO:1. El dominio C-terminal muestra poca homología de secuencia con cualquier proteína conocida y consta de los aminoácidos 230 a 324.

65 La "Proteína Rep" también abarca los fragmentos y variantes de la proteína con la SEQ ID NO:1 o la SEQ ID NO:8 que son capaces de unirse a un anticuerpo anti-Rep específico para la proteína Rep que tiene la secuencia de aminoácidos de la SEQ ID NO:1 o la SEQ ID NO:8. Preferentemente, dicho fragmento es un fragmento

inmunogénico de la proteína que tiene la secuencia de aminoácidos de la SEQ ID NO:1 o la SEQ ID NO:8 que abarca al menos un epítipo para un anticuerpo anti-proteína Rep contra la proteína Rep de la SEQ ID NO:1 o la SEQ ID NO:8 y, preferentemente, comprende al menos 7, 8, 9, 10, 15, 20, 25 o 50 aminoácidos contiguos. En las modalidades particulares, el fragmento comprende o consiste esencialmente en un dominio de la proteína Rep, por ejemplo, la región conservada N-terminal, la región variable C-terminal, el primer o segundo dominio de unión a ADN. Una variante de la proteína con la SEQ ID NO:1 o la SEQ ID NO:8 comprende una o más deleciones, sustituciones o adiciones de aminoácidos en comparación con las SEQ ID NO:1 y tiene una homología de al menos 90 %, 91 %, 92 %, 93 %, 94 %, 95 %, 96 %, 97 %, 98 % o 99 % de la secuencia de aminoácidos de la SEQ ID NO:1 o la SEQ ID NO:8, en donde la variante es capaz de unirse a un anticuerpo anti-Rep específico para una proteína Rep que tiene la secuencia de aminoácidos de la SEQ ID NO:1 o la SEQ ID NO:8. Dentro de la definición de variante se incluyen, por ejemplo, polipéptidos que contienen uno o más análogos de un aminoácido (que incluye, por ejemplo, aminoácidos no naturales, ácido peptídico nucleico (PNA), etc.), polipéptidos con enlaces sustituidos, así como también otras modificaciones conocidas en la técnica, tanto de origen natural como de origen no natural. El término proteína Rep incluye proteínas de fusión con una secuencia de aminoácidos heteróloga, con una secuencia líder o con una secuencia etiqueta y similares. En determinadas modalidades, las etiquetas proteicas se injertan genéticamente en la proteína Rep descrita anteriormente, por ejemplo, la proteína Rep seleccionada del grupo que consiste en MSBI1, MSBI2, CMI1, CMI2 o CMI3. En particular, al menos una etiqueta proteica está unida a un polipéptido que consiste de una secuencia de aminoácidos como se representa en cualquiera de las SEQ ID NO:1-3, 8-12, 14. Tales etiquetas proteicas pueden eliminarse mediante agentes químicos o mediante medios enzimáticos. Ejemplos de etiquetas de proteínas son etiquetas de afinidad o cromatográficas para purificación. Por ejemplo, la proteína Rep puede fusionarse con una secuencia etiqueta, por ejemplo, seleccionada del grupo que consiste en etiqueta His₆ (SEQ ID NO:4), Etiqueta T7 (SEQ ID NO:5), Etiqueta-FLAG (SEQ ID NO:6) y Etiqueta Strep-II (SEQ ID NO:7), una etiqueta His (SEQ ID NO:4), una etiqueta T7 (SEQ ID NO:5), una etiqueta FLAG (SEQ ID NO:6) o una etiqueta StrepII (SEQ ID NO:7). Además, pueden unirse etiquetas de fluorescencia tales como la proteína verde de fluorescencia (GFP) o sus variantes a una proteína Rep usada en la invención de la presente invención.

En una modalidad preferida particular, la proteína Rep codificada por el genoma MSBI1 (Rep de MSBI1) tiene codones optimizados para la producción en líneas celulares humanas (por ejemplo, HEK-293, HEK293TT, HEK293T, HEK293FT, HaCaT, HeLa, SiHa, CaSki, HDMEC, L1236, L428, BJAB, MCF7, Colo678, cualquier línea celular primaria), así como también líneas celulares bovinas (por ejemplo, MAC-T) o murinas (por ejemplo, GT1-7). Esto se describe en detalle en el documento PCT/EP2017/075774.

La proteína Rep usada en la invención, que incluye los fragmentos de Rep y las variantes de Rep tal como se definen anteriormente, puede prepararse mediante síntesis química clásica. La síntesis puede realizarse en solución homogénea o en fase sólida. Los polipéptidos usados en esta invención también pueden prepararse por medio de técnicas de ADN recombinante.

El "Sujeto", como se usa en la presente, se refiere a un individuo o paciente mamífero, que incluye murinos, ganado, por ejemplo, bovinos, simios y humanos. Preferentemente, el sujeto es un paciente humano.

El "Anticuerpo anti-Rep", como se usa en la presente, se refiere a un anticuerpo que se une a un nivel detectable a la proteína Rep cuya afinidad es más fuerte por la proteína Rep de la invención que por una proteína que no es Rep. Preferentemente, la afinidad del antígeno por la proteína Rep es al menos 2 veces mayor que la unión de fondo. En particular, el anticuerpo anti-Rep es específico para Rep de MSBI1 que tiene la secuencia de aminoácidos de SEQ ID NO:1 o Rep de MSBI2. En las modalidades particulares, el anticuerpo es específico de forma cruzada para Rep de MSBI1, Rep de MSBI2, Rep de CMI1, Rep de CMI2 y/o Rep de CMI3. En ciertas modalidades, el anticuerpo anti-Rep es específico de forma cruzada para al menos dos, preferentemente todas, de Rep de MSBI1, Rep de MSBI2, Rep de CMI1, Rep de CMI2 y/o Rep de CMI3.

Los inventores también probaron el nivel de anticuerpos de pacientes con cáncer de colon al poner en contacto la proteína Rep con una muestra sospechosa que contiene anticuerpos anti-proteína Rep en condiciones que permitan que la proteína Rep se una a cualquier anticuerpo presente en la muestra. Tales condiciones típicamente serán temperatura fisiológica, pH y fuerza iónica mediante el uso de un exceso de proteína Rep. A la incubación de la proteína Rep con la muestra le sigue la detección de complejos inmunes compuestos por el antígeno. En determinadas modalidades, la proteína Rep está acoplada a un compuesto generador de señales, por ejemplo, un marcador detectable, o se usa un agente aglutinante adicional, por ejemplo, un anticuerpo antihumano secundario, acoplado a un compuesto generador de señales, para detectar el complejo inmune.

Los anticuerpos anti-Rep pueden detectarse y cuantificarse en ensayos basados en la proteína Rep como antígeno proteico, que sirve como diana para los anticuerpos de mamífero, por ejemplo, humanos, sospechosos en la muestra. Preferentemente, la proteína Rep se purifica y la muestra puede ser, por ejemplo, suero o plasma. Los métodos incluyen la inmovilización de la proteína Rep en una matriz seguida de la incubación de la proteína Rep inmovilizada con la muestra. Finalmente, los anticuerpos unidos a Rep del complejo inmunológico formado entre la proteína Rep y los anticuerpos de la muestra se cuantifican mediante un agente aglutinante de detección acoplado a un compuesto generador de señales, por ejemplo, un anticuerpo de detección secundario acoplado a HRP (peroxidasa de rábano picante) que permite cuantificación basada en el sustrato HRP. Este compuesto o marcador

generador de señal es en sí mismo detectable o puede hacerse reaccionar con un compuesto adicional para generar un producto detectable.

El diseño del inmunoensayo está sujeto a una gran variación y se conocen muchos formatos en la técnica. Los protocolos pueden, por ejemplo, usar soportes sólidos o inmunoprecipitación. La mayoría de los ensayos implican el uso de agentes de unión acoplados a compuestos generadores de señales, por ejemplo, anticuerpos marcados o proteínas Rep marcadas; los marcadores pueden ser, por ejemplo, moléculas enzimáticas, fluorescentes, quimioluminiscentes, radiactivas o colorantes. También se conocen ensayos que amplifican las señales del complejo inmunológico; ejemplos de los cuales son ensayos que utilizan biotina y avidina o estreptavidina, e inmunoensayos mediados y marcados con enzimas, tales como ensayos ELISA.

El inmunoensayo puede ser en formato heterogéneo u homogéneo, y de tipo estándar o competitivo. En la técnica se conocen formatos tanto estándar como competitivos.

En un formato de ensayo de inmunoprecipitación o aglutinación, la reacción entre la proteína Rep y el anticuerpo anti-Rep forma una red que precipita de la solución o suspensión y forma una capa o película visible de precipitado. Si no hay anticuerpos anti-Rep en la muestra, no se forma ningún precipitado visible.

En modalidades adicionales, los inventores usaron métodos en donde una cantidad aumentada de proteína Rep en una muestra se correlaciona con un diagnóstico o predisposición al cáncer de colon. En tales modalidades, la proteína Rep en la muestra se detecta mediante anticuerpos anti-Rep.

La "Muestra", como se usa en la presente, se refiere a una muestra biológica que abarca tejido de colon canceroso, tejido periférico que rodea el tejido de colon canceroso y pólipos de colon (benignos). Las muestras abarcan muestras de tejido, como cultivos de tejido o muestras de biopsia.

Dichos métodos comprenden las etapas de detectar la proteína Rep en una muestra de un sujeto mediante anticuerpos anti-Rep. En tales métodos, la proteína Rep se detecta en muestras de tejido mediante métodos inmunohistoquímicos o microscopía de inmunofluorescencia.

En determinadas modalidades, se usan anticuerpos anti-Rep para la detección o captura de la proteína Rep en la muestra.

El término "anticuerpo", preferentemente, se refiere a anticuerpos que consisten esencialmente en anticuerpos policlonales combinados con diferentes especificidades epitópicas, así como también distintas preparaciones de anticuerpos monoclonales. Como se usa en la presente, el término "anticuerpo" (Ab) o "anticuerpo monoclonal" (Mab) pretende incluir moléculas de inmunoglobulina intactas, así como también fragmentos de anticuerpos (tales como, por ejemplo, fragmentos Fab y F(ab')₂) que son capaces de unirse específicamente a la proteína Rep. Los fragmentos Fab y F(ab')₂ carecen del fragmento Fc del anticuerpo intacto, se eliminan más rápidamente de la circulación y pueden tener menos unión a tejidos no específicos que un anticuerpo intacto. Por tanto, se prefieren estos fragmentos, así como también los productos de un FAB u otra biblioteca de expresión de inmunoglobulinas. Además, los anticuerpos útiles para los fines de la presente invención incluyen anticuerpos o anticuerpos humanos quiméricos, monocatenarios, multifuncionales (por ejemplo, biespecíficos) y humanizados.

En determinadas modalidades, el anticuerpo o fragmento de unión a antígeno del mismo se acopla a un compuesto generador de señales, por ejemplo, porta un marcador detectable. El anticuerpo o fragmento de unión a antígeno del mismo puede marcarse directa o indirectamente de forma detectable, por ejemplo, con un radioisótopo, un compuesto fluorescente, un compuesto bioluminiscente, un compuesto quimioluminiscente, un metal quelante o una enzima. Los expertos en la técnica conocerán otros marcadores adecuados para unir al anticuerpo, o podrán determinarlos mediante el uso de experimentación habitual.

Los anticuerpos anti-Rep, preferentemente, se crean (generan) contra una proteína Rep que tiene la secuencia de aminoácidos de SEQ ID NO:1 o SEQ ID NO:8 o un fragmento de la misma mediante métodos bien conocidos para los expertos en la técnica.

En determinadas modalidades, en los métodos de la invención se usan anticuerpos anti-Rep que son capaces de unirse a varios o todos los tipos de proteínas Rep del grupo del Genoma de la Esfinge Pequeña (anticuerpo Rep anti-tipo Esfinge Pequeña o anticuerpo anti-SSLRep). Dicho anticuerpo anti-SSLRep se une a un epítipo dentro de la región N-terminal conservada de la proteína Rep de los aminoácidos 1 al 229 de SEQ ID NO:1. En modalidades particulares, se usan anticuerpos anti-Rep del tipo anti-SSLRep que se unen a un epítipo dentro de la SEQ ID NO:2 (aminoácidos 32-49 de la SEQ ID NO:1) o SEQ ID NO:3 (aminoácidos 197-216 de la SEQ ID NO:1). Los fragmentos peptídicos de SEQ ID NO:2 y SEQ ID NO:3 están altamente conservados entre las proteínas Rep del grupo del Genoma de la Esfinge Pequeña y parecen estar expuestos debido a su carácter hidrófilo. Los anticuerpos anti-Rep del tipo anti-SSLRep pueden producirse mediante inmunización, por ejemplo, de ratones o cobayas, mediante péptidos que consisten esencialmente en las secuencias de aminoácidos representadas en las SEQ ID NO:2 o 3; o por otros fragmentos inmunogénicos, que comprenden preferentemente al menos 8-15 aminoácidos, derivados de la

región N-terminal conservada de la proteína Rep de los aminoácidos 1 a 229 de SEQ ID NO:1.

En modalidades adicionales se usan anticuerpos anti-Rep específicos para la proteína Rep de MSBI1. Dichos anticuerpos pueden producirse, por ejemplo, mediante inmunización de un mamífero tal como ratones o cobayas con una proteína Rep de longitud completa que tiene la secuencia de aminoácidos de SEQ ID NO:1.

Preferentemente, los métodos de la invención usan anticuerpos anti-Rep que son capaces de detectar la proteína Rep en intervalos de picogramos a femtogramos.

Los ejemplos de dichos grupos de anticuerpos anti-Rep se muestran en la Tabla 1:

Grupo de anticuerpos	Localización de proteína Rep	Especificidad	Anticuerpo	Depósito de DSMZ
Grupo A	citoplasma + membrana nuclear (+núcleo)	MSBI1 + tipo Esfinge Pequeña Todas las Rep de BMMF1	AB01 523-1-1 (Ab 1-5)	DSM ACC3327
Grupo B	motas en el citoplasma	MSBI1 + tipo Esfinge Pequeña	AB02 304-4-1 (Ab 5-2)	DSM ACC3328
Grupo C	citoplasma + membrana nuclear (+ núcleo)	Específico de MSBI1	MSBI1 381-6-2 (Ab 3-6) MSBI1 572-13-19 (Ab 10-3) MSBI1 617-1-3 (Ab 11-5)	DSM ACC3329
Grupo D	motas en el citoplasma	Específico de MSBI1	D1: MSBI1 961-2-2 D2: MSBI1 761-5-1 (Ab 13)	DSM ACC3331 DSM ACC3330

Los anticuerpos anti-Rep del grupo A tienen un epítipo dentro de la secuencia de aminoácidos representada en la SEQ ID NO:3 (aa 198-217 de SEQ ID NO:1) y son capaces de detectar las proteínas Rep y Rep de MSBI1 que comprenden este epítipo conservado del Grupo del Genoma de la Esfinge Pequeña (por ejemplo, MSBI2, CMI1, CMI4). En ensayos de inmunofluorescencia, tales anticuerpos anti-Rep detectan un patrón de localización de Rep específico, en donde la localización principal está distribuida homogéneamente sobre el citoplasma y la membrana nuclear; y en el núcleo se observa una localización adicional débil y distribuida homogéneamente. Un ejemplo de tal anticuerpo del grupo A es el anticuerpo AB01 523-1-1 (también llamado anticuerpo 1-5; DSM ACC3327) que se empleó en los ejemplos como anticuerpo del grupo A.

Los anticuerpos anti-Rep del grupo B tienen un epítipo dentro de la secuencia de aminoácidos representada en la SEQ ID NO:2 (aa 33-50 de SEQ ID NO:1) y son capaces de detectar las proteínas Rep y Rep de MSBI1 que comprenden este epítipo conservado del Grupo del Genoma de la Esfinge Pequeña (por ejemplo, MSBI2, CMI1, CMI4). En los ensayos de inmunofluorescencia, estos anticuerpos anti-Rep detectan específicamente motas (agregaciones citoplasmáticas) de la proteína Rep (a menudo en la periferia de la membrana nuclear). Un ejemplo de tal anticuerpo del grupo B es el anticuerpo designado AB02 304-4-1 (también llamado anticuerpo 5-2; DSM ACC3328) que se empleó en los ejemplos como anticuerpo del grupo B.

Los anticuerpos anti-Rep del grupo C detectan específicamente un epítipo estructural de MSBI1 (SEQ ID NO:1). En ensayos de inmunofluorescencia, tales anticuerpos anti-Rep detectan un patrón de localización de Rep específico, en donde la localización principal está distribuida homogéneamente sobre el citoplasma y la membrana nuclear; y en el núcleo se observa una localización adicional débil y distribuida homogéneamente. Un ejemplo de tal anticuerpo del grupo C es el anticuerpo MSBI1 381-6-2 (también llamado anticuerpo 3-6; DSM ACC3329) que se empleó en el ejemplo como anticuerpo del grupo C con un epítipo en la secuencia de aa 137-324. Otro ejemplo de un anticuerpo de un anticuerpo del grupo C es el anticuerpo MSBI1 572-13-19 (también llamado anticuerpo 10-3) que detecta un epítipo en el dominio C-terminal de MSBI 1 Rep (aa 230-324). Otro ejemplo de un anticuerpo de un anticuerpo del grupo C es el anticuerpo MSBI1 617-1-3 (también llamado anticuerpo 11-5) que detecta un epítipo en el dominio N-terminal de MSBI 1 Rep (aa 1-136).

Los anticuerpos anti-Rep del grupo D detectan específicamente un epítipo estructural de MSBI1 (SEQ ID NO:1), donde el anticuerpo MSBI1 961-2-2 designado como "D1" (DSM ACC3331) detecta un epítipo representado en SEQ ID NO:9 (aa 281-287) en el dominio C-terminal de MSBI1. El anticuerpo MSBI1 761-5-1 (también llamado anticuerpo 13; DSM ACC3328) designado como "D2" detecta un epítipo estructural 3D de MSBI1 que es accesible exclusivamente en condiciones in vivo y no es accesible en Transferencias Western. En los ensayos de inmunofluorescencia, estos anticuerpos anti-Rep detectan específicamente motas (agregaciones citoplasmáticas) de la proteína Rep (a menudo en la periferia de la membrana nuclear).

La invención se ilustra además por los siguientes ejemplos:

Ejemplo 1: Detección de dianas proteicas de BMMF en tejido del colon

Se usaron anticuerpos anti-Rep 10-3 (dilución 1:500), 3-6 (1:500), 11-5 (1:100) y 1-5 (1:100) para la detección de dianas proteicas relacionadas con Rep de BMMF en tejido de colon basada en inmunohistoquímica (IHC). La tinción específica de CD68 de monocitos, macrófagos circulantes y macrófagos tisulares se realizó en base a un anticuerpo anti-CD68 de conejo (Cell Signaling Technology Europe BV, catálogo #76437, 1:800). Por lo tanto, se incubaron secciones de tejido embebidas en parafina de muestras de tejido de colon con el anticuerpo respectivo en un sistema de tinción IHC automatizado Leica BOND (tampón de recuperación de epítomos EDTA). La tinción colorimétrica se realizó con el kit de tinción Leica DAB (Leica biosystems, anticuerpo secundario anti-ratón de conejo ab125904 (1:500) de Abcam). Las secciones de tejido teñidas se digitalizaron en un microscopio óptico de luz Zeiss.

Resultados

Una selección de 11 pares de muestras de tejido de donantes (cada tejido tumoral y tejido periférico) y 4 muestras de diferentes donantes de tejido de pólipos de colon se sometieron a tinción IHC con anticuerpos monoclonales de ratón anti-Rep. Con respecto a las 11 muestras tumorales y periféricas, 9 de 11 tejidos mostraron una fuerte tinción de anticuerpos específicos con al menos dos anticuerpos anti-Rep. A modo de ejemplo, la tinción con el anticuerpo 10-3 muestra la detección específica de dianas proteicas en las muestras de tejido 4798, 4799, 4802, 4806, 4809 y 4813 en el tumor, así como también en el tejido periférico. En general, la intensidad de la tinción es mayor para el tejido periférico, donde los agregados citoplasmáticos intensamente teñidos de menor tamaño se concentran dentro de distintas islas de células dentro de la *lámina propia* entre las Criptas de Lieberkuhn características del tejido del colon (todas las imágenes muestran cortes transversales a lo largo de las Criptas de Lieberkuhn con el lumen (interior) de las criptas en contacto con los fluidos del colon en el centro del arreglo en forma de anillo de las células epiteliales de las criptas). La tinción de tejidos tumorales también muestra una tinción intensa de agregados de menor tamaño principalmente dentro de las regiones citoplasmáticas de las células del estroma dentro del tejido tumoral. Las mismas estructuras similares a agregados también son visibles en la *lámina propia* de pólipos del colon mediante el uso de cuatro anticuerpos anti-Rep diferentes para la tinción de cortes secuenciales. Tanto para el tejido periférico del colon como para los pólipos del colon, las regiones con mayor detección de anticuerpos específicos de Rep se correlacionan con regiones con niveles de detección más altos para células CD68 positivas, lo que apunta hacia una localización de los antígenos específicos de Rep en regiones con niveles especialmente altos de monocitos inflamatorios, macrófagos circulantes o macrófagos tisulares.

Para verificar los resultados de IHC, parte del material tisular del paciente se lisó en tampón de lisis desnaturizante de urea 8 M con un homogeneizador de tejido y se sometió a electroforesis SDS-PAGE. Las áreas de interés se cortaron, se digirieron trópicamente y se analizaron mediante espectroscopia de masas para detectar la presencia de dianas peptídicas específicas de BMMF1. Se eligió un conjunto de 4 pares (tumor y tejido periférico) con fuertes niveles de señal IHC junto con un par sin señal IHC. De acuerdo con los resultados de IHC, solo los 4 tejidos periféricos fuertemente positivos para IHC permitieron la detección por espectrometría de masas de una secuencia peptídica específica del grupo BMMF1.

Para confirmar la especificidad de la detección de anticuerpos en IHC, los aislamientos de ADN de las cinco muestras con detección de señal IHC más intensa se sometieron a amplificación en círculo rodante y PCR con cebadores específicos del grupo 1 de BMMF y secuenciación de ADN para analizar la presencia de ADN de BMMF en el mismo material tisular. De hecho, en base a un conjunto de los 5 pares de muestras de IHC más fuertes (tumor y tejido periférico), dentro de cada donante se aisló ADN específico de MSB11 de al menos un tipo de tejido (tumor o tejido periférico).

Ejemplo 2: Tinción inmunohistoquímica de múltiples matrices de tejido CRC (TMA)

La detección de antígenos de la proteína Rep de BMMF1 en material tisular de pacientes con cáncer colorrectal (CRC) se probó en base a la tinción inmunohistoquímica de múltiples matrices (TMA) de tejido de CRC con un anticuerpo monoclonal de ratón anti-Rep de BMMF1 específico. Por lo tanto, se usaron TMA que representaban un total de 259 pacientes con CRC, que ofrecían un total de dos puntos de tejido de cada región tumoral, así como también dos puntos de tejido peritumoral por paciente. Todos los pacientes fueron tratados en el Hospital Universitario de Heidelberg en 2003 y 2004. Las muestras de TMA fueron proporcionadas por el banco de tejidos del Centro Nacional de Enfermedades Tumorales (NCT, Heidelberg, Alemania) de acuerdo con las regulaciones del banco de tejidos y la aprobación del comité de ética de la Universidad de Heidelberg con permiso de Hermann Brenner, Michael Hoffmeister y Jenny Chang-Claude (Banco de Tejidos del Centro Nacional de Enfermedades Tumorales (NCT) de Heidelberg, Alemania, e Instituto de Patología, Hospital Universitario de Heidelberg, Alemania).

Tinción de tejidos

Los TMA se tiñeron de forma totalmente automática en una máquina BOND MAX (Leica Biosystems) con recuperación de epítomos con EDTA y las incubaciones de anticuerpos proporcionadas (Tabla 2). La detección se

realizó mediante el uso del kit de detección Bond Polymer Refine (kit DS9800 Leica DAB) que incluye cromógeno DAB y contratinción con hematoxilina. Las diapositivas se escanearon con un escáner de diapositivas digital (Hamamatsu) y se analizaron con el programa de visualización Hamamatsu NDP.

Tabla 2: Parámetros experimentales usados para la tinción IHC

Anticuerpo	Fuente	Huésped	Dilución	Concentración final en µg/ml	Tiempo de incubación
Primaria					
Rep mAb #3-6	T. Bund, DKFZ	ratón	1:500	3,9	30 min a temperatura ambiente
CD68	Señalización celular núm. 76437	conejo	1:1000		
Secundario					
conejo anti-ratón	Abcam #125904	conejo	1:500		20 min a temperatura ambiente

Cuantificación de señal BMMF

Dos investigadores calificaron independientemente las manchas de los tejidos de acuerdo con los siguientes criterios de puntuación. Para cada anticuerpo, se determinó el porcentaje de células teñidas (positividad) y la intensidad (I). Para la tinción con Rep, solo se evaluó la tinción estromal que representa la localización dominante del antígeno BMMF detectado con tinciones insignificantes en la región tumoral en manchas de tejidos tumorales o criptas en manchas peritumorales. La positividad (POS) de la tinción con Rep se evaluó mediante el uso de una escala de tres niveles en la que 0 indicaba que no había ninguna parte del tejido positiva, 1 indicaba entre 1-10 % de positividad, 2 indicaba entre 11-30 %, 3 indicaba más del 30 % de las manchas de tejido individuales que muestran agregados teñidos. Para la tinción con CD68/macrófagos, la puntuación de positividad se estableció en 0 para manchas de tejido negativas, 1 indicó <20 % de células positivas, 2 indicó 20-60 %, 3 indicó más del 60 % de células positivas. La intensidad (I) generalmente se calificó de la siguiente manera: 0 = sin reacción, 1 = leve, 2 = tinción intensa. Para el análisis estadístico, la puntuación inmunorreactiva IRS se calculó de la siguiente manera:

$IRS = [(I(Investigador_1) + I(Investigador_2))/2] * [(POS(Investigador_1) + POS(Investigador_2))/2]$; valor mínimo = 0, valor máximo = 6.

En la Tabla 3 se muestra una descripción general. De 259 pacientes, 12 pacientes fueron excluidos debido a la mala calidad del tejido y uno debido a la falta de datos clínicos. En total, se procesaron datos de 246 pacientes para su posterior análisis.

Tabla 3: Parámetros usados para la cuantificación de la tinción de TMA (IRS: Puntuación Inmunorreactiva).

	Intensidad (I)	I	Positividad (proporción de células positivas, POS)	POS
Tinción de Rep	0	sin reacción	0	0
	1	leve	1	1-10 %
	2	fuerte	2	11-30 %
			3	>31 %
Tinción de CD68	0	sin reacción	0	0
	1	leve	1	<20 %
	2	fuerte	2	20-60 %
			3	>60 %
$IRS = [(I(Investigador_1) + I(Investigador_2))/2] * [(POS(Investigador_1) + POS(Investigador_2))/2]$				

Análisis estadístico

El análisis estadístico se realizó mediante el uso de R-3.5.2 (<http://www.r-project.org>) y R-studio 2016. Para comparar el tejido tumoral y peritumoral se realizó una prueba del orden con signo de Wilcoxon bilateral. La interdependencia entre la inmunotinción y los datos clínicos se calculó mediante el uso de la prueba de Kruskal-Wallis. Las curvas de supervivencia se trazaron mediante el uso del método de Kaplan-Meier y se analizaron mediante el uso de la prueba del orden logarítmico. La relación de riesgos instantáneos se determinó mediante el análisis de regresión de Cox. Los valores de P menores de 0,05 se consideraron estadísticamente significativos.

Resultados

En total, se recopiló información de puntuación para n=246 pacientes con CRC. En las puntuaciones de Rep para las regiones de tejido tumoral, el 49,3 % de los tejidos del paciente mostraron positividad, mientras que las puntuaciones para los tejidos peritumorales mostraron que el 99,1 % de los tejidos del paciente fueron positivos. Las distribuciones correspondientes de los valores del IRS muestran una distribución asimétrica para el tejido tumoral con un

enriquecimiento de casos con valores del IRS de 0 y 1 (Figura 7). Esta tendencia se invierte para la distribución de los valores del IRS para la puntuación peritumoral con un enriquecimiento de los valores del IRS >3 (Figura 8).

Con respecto a la cuantificación de la señal obtenida mediante la tinción de regiones de tejido tumoral (Figura 9) y peritumoral (Figura 10) con anticuerpos CD68 >99 % de los pacientes mostraron positividad con una distribución equilibrada de los valores del IRS en ambos casos.

La comparación de las puntuaciones IRS de Rep de los tejidos peritumorales y tumorales sugirió una detección de Rep significativamente mayor ($p = > 2,2e-16$) en el tejido peritumoral de los pacientes con CRC analizados (Figura 11).

Los inventores concluyeron que para la inducción del cáncer la cantidad de antígeno BMMF dentro de la *lámina propia* entre las criptas del colon es importante para la inducción de inflamación local crónica, la inducción de ROS/NOS en difusión que finalmente induce mutaciones aleatorias en las células madre e hijas en división de las criptas vecinas que podrían convertirse en pólipos tempranos/células precursoras de tumores mediante la manifestación de mutaciones clave. Por lo tanto, debería observarse una correlación entre los niveles peritumorales de BMMF y la intensidad de los macrófagos positivos para CD68. De hecho, al comparar los valores del IRS para la detección de Rep con los valores del IRS para la detección de CD68 dentro de los pacientes con CRC correspondientes, se observa una correlación significativa entre la detección de Rep y CD68 ($p=0,00045$ mediante la prueba de Kruskal Wallis), lo que muestra que los niveles de detección más altos de Rep se correlacionan con niveles más altos de detección de CD68 (Figura 12).

Para probar una puntuación pronóstica de la detección de Rep en regiones peritumorales de pacientes con CRC en función del tiempo de supervivencia del paciente, se calcularon las curvas de Kaplan Meier con base en un conjunto de $n = 243$ pacientes (77 eventos basados en muerte específica por CRC, 166 censurados), que se agruparon en "Rep baja" para valores IRS de 0-1,9 y "Rep alta" para valores IRS de 2-6 (Figura 13). Los niveles altos de Rep en pacientes con CRC se correlacionan con una reducción significativa del tiempo de supervivencia general del paciente ($p=0,0017$).

Los niveles aumentados de Rep se correlacionan con una relación de riesgos instantáneos de 4,7 (CI del 95 %: 1-19), lo que indica una correlación negativa entre la detección de Rep y la supervivencia del paciente ($p=0,00475$) y subraya la puntuación pronóstica de la detección de Rep en el tejido de CRC (Figura 14).

Los pacientes con una puntuación "Rep baja" muestran una probabilidad de supervivencia a 5 y 10 años del 92 %, mientras que los pacientes con "Rep alta" muestran posibilidades del 74 % después de 5 años y del 65 % después de 10 años, lo que representa una disminución del 20 al 30 %. El efecto pronóstico de la detección de Rep no se explica por la detección de CD68, ya que el análisis de supervivencia basado en el análisis de Kaplan Meier "CD68 alto" y "CD68 bajo" no muestra diferencias significativas entre las dos curvas de supervivencia ($p=0,271$, n.s.) (Figura 15).

Ejemplo 3: Detección de antígenos BMMF Rep mediante inmunotransferencia de lisados de tejido de pacientes con CRC

Se lisó material de tejido peritumoral o tumoral del mismo paciente (por ejemplo, paciente 4800 P (peritumoral) o 4800 T (tumoral)) o material de tejido de pólipos tempranos de cuatro donantes individuales en urea 8 M, NaH_2PO_4 100 mM, Tris 10 mM, 5 DTT mM, pH 8,0 con el uso de inhibidores de proteasa (P8340 Sigma-Aldrich) en un homogeneizador de tejidos a 4 °C con perlas de sílice antes de electroforesis SDS-PAGE e inmunodetección con anticuerpos anti-BMMF Rep, en particular anti-Rep Ab 5-2 (dilución 1:250). Las bandas diana de alrededor de 42 kDa fueron claramente visibles con intensidades más fuertes para la muestra de pacientes con CRC peritumoral 4800 y bandas aún más fuertes para lisados de tejido de pólipos tempranos de los cuatro pacientes individuales (Figura 16).

Ejemplo 4: Amplificación por PCR del ADN BMMF Rep

Además, la microdissección con láser de regiones de tejido peritumoral teñidas inmunohistoquímicamente de pacientes con CRC (anti-Rep Ab 3-6) y la posterior preparación del ADN condujeron a la identificación del ADN de MSBI1.176 BMMF de longitud completa en los tres pacientes analizados (4799, 4808 y 4809). Por lo tanto, se preparó ADN total a partir de las regiones de tejido disecado mediante incubación durante la noche del tejido disecado con 25 μl de una suspensión al 5 % de perlas Chelex (Bio-Rad Cat #142-1253), 5 μg de proteasa a 750 rpm en un termomezclador. La suspensión se agitó durante 10 s a máxima velocidad y luego se colocó en un termomezclador a 99 °C durante 8 min. Luego se centrifugó la suspensión durante 5 minutos a 12 000 g a temperatura ambiente para sedimentar la resina Chelex. Se usó 1 μl del sobrenadante para la amplificación del círculo rodante (RCA) con ADN polimerasa phi29 (New England Biolabs M0269S, 10 U) y el uso de cebadores aleatorios exo-resistentes (Thermo Fisher Scientific SO181, 25 μM), dNTP (0,75 mM cada uno), Tris-HCl 50 mM, MgCl_2 10 mM, $(\text{NH}_4)_2\text{SO}_4$ 10 mM, DTT 4 mM, BSA 0,4 mg/ml, pH 7,5.

Configuración de RCA	
1 µl de ADN (50 ng)	3 min a 95 °C luego enfriar en hielo
1 µl de cebador 1,1 µg	
1 µl de tampón 10x	
7 µl de H ₂ O	
1 µl de tampón 10x	preparar esta solución (10 µl) y añadir a la muestra enfriada en hielo luego, 18 h a 30 °C 10 min a 65 °C
0,4 µl de BSA 8 µg	
1,6 µl de H ₂ O	
6 µl de d-NTP	
1 µl de phi29 10U	volumen total de reacción 20 µl

Después de RCA, se usaron 3 µl de la reacción de RCA para la PCR con cebadores consecutivos específicos de BMMF No (gag gac gaa tta ata tta caa gtc) y Xo (gtt etc gct ttt ctt ggt aa) o Nn (gga tta atg cca atg atc c) y Xn (ctt tgc ctg ttt etc tcg) con cada 10 pmol por 50 µl de reacción junto con 8 µl de dNTP, 25 µl de tampón GC I, 0,5 µl de TAKARA Taq polimerasa (Takara RR02AG) con la siguiente configuración de PCR.

NoXo/NnXn							
94 °C	1 min					72 °C	10 min
94 °C	30 s	94 °C	30 s	94 °C	30 s		
64 °C	1 min	62 °C	1 min	62 °C	1 min		
72 °C	2 min	72 °C	2 min	72 °C	2 min		
5 ciclos		5 ciclos		30 ciclos			

Si era necesario, las dianas de la PCR se sometieron a un ciclo adicional de amplificación por PCR después de la extracción en gel de las dianas de la PCR, siempre que las bandas diana mostraran una intensidad de banda inadecuada. Después de la PCR, se usaron alrededor de 5 ng de ADN para la clonación en un vector de clonación pCR2.1 TA (kit de clonación TA, Invitrogen K203040) de acuerdo con el protocolo del fabricante, seguido de la secuenciación del inserto de PCR.

Resumen de secuencias

SEQ ID NO	SECUENCIA
	Secuencia de aminoácidos de la proteína Rep codificada por MSB1.176
1	MSDLIVKDNALMNASYNLALVEQRLILLALIEARETGKGINANDELTVHASSYINQFN VERHTAYQALKDACKDLFARQFSYQEKRRGRINITSRWVSQIGYMDDTATVEIIFAP AVVPLITRLEEQFTQYDIEQISGLSSAYAVRMYELLICWRSTGKTPIIELDEFRRRIG VLDTEYTRDNLKMRVIELALKQINEHTDITASYEQHKKGRTVTCFSFKHKKQNSD KTPKNSDSSPRIVKHSQIPTNIVKQPENAKMSDLEHRASRVTEIMRNRLSDREFKQGD ESAIDMMKRIQSEIITDAIADQWESKLEEFQVVF
2	Secuencia de aminoácidos del fragmento peptídico Rep EARETGKGINANDPLTVH
3	Secuencia de aminoácidos del fragmento peptídico Rep KQINEHTDITASYEQHKKGRT
4	Etiqueta His (con dos aminoácidos de relleno neutros) GAHHHHHH
5	Etiqueta T7 MASMTGGQQMG
6	Etiqueta FLAG DYKDDDDK
7	Etiqueta Strep-II WSHPQFEK
8	Secuencia de aminoácidos de la proteína Rep codificada por MSB2.176 MSKLVVKDNALMNASYNLDELVEQRLILLALIEARESGKGINANDPLTVHA ESYINQFGVHRVTAYQALKDACDNLFARQFSYQSKSEKGNIQNHRSRWVS EIIYIDTEATVKIIFAPAIVPLITRLEEQFTKYDIEQISDLSSAYAIRLY ELLICWRSTGKTPIIIGLGEFRNRVGVLDSEYHRIAHLKERVIEHSIKQIN EHTDITATYEQHKKGRTITGFSFKFKQKKPKQAEIATETPKTATNDPDTT KPLTEPQIAKYSMILCKLGSISDLSNFPDYPAFANWIGNILRNPEKADEQ IAKRIFTALKTETDYSKKN

(continuación)	
SEQ ID NO	SECUENCIA
9	Epitopo específico de MSBI.1 NRLSDRF
10	Secuencia de aminoácidos de la proteína Rep codificada por CMI1.252 MSDLIVKDNALMNASYNLALVEQRLLLAILEARETGKGINANDPLTVHASSYINQFN VERHTAYQALKDACKDLFARQFSYOEKRRGRINITSRWVWSQIGYMDDTATVEIFAP AVVPLITRLEEQFTQYDIEQISGLSSAYAVRLYELLICWRSTGKTPIIDLTEFRKRLG VLDTEYTRTDNLKMRVIELGLKQINEHTDITASYEQHKKGRTITGFSFKFKQKKKTGA EMPKNSDSSPHIEKPSQIPANIAKQPENAKKDDLGHRAKITGLIMNSNGLADREFKRGD ESVIDMMKRIKEEITTDPTADQWENKLEEFQVIFQS
11	Secuencia de aminoácidos de la proteína Rep codificada por CMI2.214 MSDLIVKDNALMNASYNLALVEQRLLLAILEARETGKGINANDPLTVHASSYINQFN VARQTAYQALKDACKDLFARQFSYOEKRRGRANITSRWVWSQIAYIDETATVEIFAP AVVPLITRLEEQFTQYDIEQISGLSSAYAVRLYELLICWRSTGKTPVIELAEFRKRLG VLNDEYTRSDNFKKWIENPIKQINEHTDITASYEQHKKGRTITGFSFKFKQKKKTEP ETPKNSDSSQRIEKPSQIPANIVKQPENANLSDLOHRASKITGLIMSNRLSDREFKQGD ESIMQMARIQSEITDTSIADQWQSKLEEFQVVE
12	Secuencia de aminoácidos de la proteína Rep codificada por CMI3.168 MSDLIVKDNALMNASYNLALVEQRLLLAILEARETGKGINANDPLTVHASSYINQFN VERHTAYQALKDACKDLFARQFSYOEKRRGRANITSRWVWSQIAYIDETATVEIFAP AVVPLITRLEEQFTQYDIEQISGLSSAYAVRLYELLICWRSTGKTPVLDLTFEKKRLG VLDTEYTRTDNLKMRVIELGLKQINKHTDITASYEQHKKGRTITGFSFKFKQKKKTEP ETPKNNDSGVSKPKTVEIPAEVVVKQPKNTNLSDEKRVRMITGAIANNLNASRFOHGN ESPLDMMKRIQSEITSDETADLWQNKLESNGVVE
13	Secuencia de ADN Rep MSBI1 optimizada con codones

SEQ ID NO	(continuación) SECUENCIA
14	ATGAGCGACCTGATCGTGAAGACAAATGCCCTGATGAACGCCCTCCTACAAACCTGGCAC TGGTCGAACAGAGACTGATCTCTGCTGCTATCATCGAGGCAAGGAGACCGGCAAGGG CATCAACGCCAATGACCCCTGACAGTGCAGCGCAGCTCCTACATCAACCAAGTTTAAT GTGGAGCGCCACACCCCTATCAGGCCCCTGAGGACCCCTGCAAGGATCTGTTTGGCCC CGCAGTTTCAGCTACCAGGAGAAAGCGGGAGAGAGCGCAGGATCAACATCAACAGCAGATG CGTGTCCAGATCCGGCTATATGGACGATACCGGCCACAGTGGAGATCATCTTTGCCACCA GCAGTGGTGGCTCTGATCACCAGGCTGGAGGAGCAGTTCCACACAGTACGACATCGGAGC AGATCTCCGGACTGCTAGCGCTACCGGCTGCGGCTGATGATGAGCTGCTGATCTGTG CGGGTCTACCGGCAAGACACCTATCATCGAGCTGGATGAGTTCGGCAAGCGGATCGGGC GTGCTGGACACCGAGTACACCCAGACAGATAACCTGAAGATGAGAGTGCAGCTGG CCCTGAAGCAGATCAATGAGCACACCCATATCACAGCCTCTTATGAGCAGCACAGAA CGGCCCGGTGATCACCGGCTTCAGCTTTAAGTTCAAGCACAAAGACAGAACTCTGAC AAGACACCAAGAAATAGCGATTCTCTCTCCCGGATCGGTGAAGCACAGCCAGATCCCTA CCAACATCGTCAACCCAGACAGAAATGCCAAGATGTCCGACCTGGAGCACAGGGCATC TAGGGTGACAGCGGAGATCATGAGAAATAGGCTGAGCGATCGGTTCAAGCAGGGGAC GAGTCCGCCATCGATATGATGAAGAGAAATCCAGTCCGAGATCATCACCAGCGCCATCG CCGATCAGTGGCAATCTAAACTCGAAGAGCTTTGGAGTCTGTTTGGACCAATCACCA TCATCATCACTGA
14	Secuencia de proteína Rep MSB1 optimizada con codones MSDLIVKDNALMNASYNLALVEQRLILLAIIEARETKGINANDPLTVHASSYINQFN VERHTAYQALKDACKOLFARQFSYQEKRRGRINITSRWVSQIGYMDDTATVEIIFAP AVVELITRLEEQFTQYDIEQISGLSSAYAVRMYELLICWRSTGKTPIIELDEFNRKRG VLDTETRTDNLKMRVIELALKQINEHTDITASYEQHKKGNVITGFSFKFNHKKQNSD KTFKNSDSSPRIVKHSQIPTNIVKQPENAKMSDLEHRASRVTEIMRNLSDRFKQGD ESAIIDMKRIQSEIITDAIADQWESKLEEFQVVEGA
15	Secuencia de ADN Rep MSB1 de tipo salvaje

SEQ ID NO	(continuación) SECUENCIA
	ATGAGCGATTTAATAGTAAAGATAACGCCCTAATGAATGCTAGTTATAACTTAGCTT TGGTTGAACAGAGGTTAATTCTATTAGCAATCATAGAACCGAGAGAAACAGGCAAGG GATTAAATGCCCAATCATCCTTTAACAGTTTCATGCAAGTAGCTATATCAATCAATTTAAC GTACAAAGGCATACGGCCATATCAAGCCCTCAAGATGCTTGTAAAGACTTGTGTTGCCCC GTCAATTCAAGTTACCAAGAAAGCGAGAACCGAGGACCAATTAAATTATTAACAAGTCCATG GGTTCGCAAAATTCGCTATATGGACGATACAGCAACCGTTGAGATTATTTTGGCCCT GCGGTTGTCTCTGATTACACGGCTAGAGGAACAGTTCACCCAGTACGATATTGAGC AAATTAGCGGTTATCGAGTGCAATATGCTGTTCTGTAATGACGAACTGCTGATTGTTG GCGTAGCACAGGCCAAACACCAATTATTGAGCTAGACGAGTTTAGAAAGCGGAATAGGT GTTTTAGATACTGAATACACTAGAACAGATAATTTAAACATGCCGAGTTATTCAATTAG CCTTAAACAAATCAACGAACATACAGACATCACAGCAAGCTATGAACAAACACAAAAA AGCCGAGTCATTACAGGATTCTCATTTCAAGTTTAAGCACAAAGAAACAAACAGCCAT AAAACGCCAAATAATAGCGATTCTAGCCCAAGTATCGTAAACATAGTCAAAATCCCTC CAACATTGTAAACACAGCCCTGAAAACGCCCAAAATGAGCGATTTAGAACATAGAGCGAGC CGTGTACAGGGGAAATAATGCGAAATCGTCTGTCAGATCGGTTTAAACAAAGCGGATG AATCAGCAATCGACATGATCAAAACGTTATTCAAAGTGAAATAATAACCCATGCCAATAGC AGACCAGTGGGAAAGCAAACTGGAGGAGTTTGGCGTGGTTTTTAG
16	Cebador gag gac gaa tta ata tta caa gtc
17	Cebador gtt etc get ttt ett ggt aa
18	Cebador gga tta atg cca atg atc c
19	Cebador ett tgc ctg ttt etc tgc

Referencias:

- 5 Fung, KYC y otros (2015). "Blood-based protein biomarker panel for the detection of colorectal cancer"., PLOS ONE, Vol. 10, Núm. 3, p. e0120425
- 10 Funk, M., y otros (2014). "Isolation of protein-associated circular DNA from healthy cattle serum". Genome Announc 2(4)
- 15 Giraldo, R., y otros (2011). "RepA-WH1 prionoid: a synthetic amyloid proteinopathy in a minimalist host." Prion 5(2):60-64
- 20 Gunst, K., y otros (2014). "Isolation of bacterial plasmid-related replication-associated circular DNA from a serum sample of a multiple sclerosis patient." Genome Announc 2(4).
- 25 Lamberto, I., y otros (2014). "Mycovirus-like DNA virus sequences from cattle serum and human brain and serum samples from multiple sclerosis patients." Genome Announc 2(4).
- Manuelidis L., 2011. "Nuclease resistant circular DNAs co-purify with infectivity in scrapie and CJD". J.Neurovirol. 17:131-145.
- Torreira, E., y otros (2015). "Amyloidogenesis of bacterial prionoid RepA-WH1 recapitulates dimer to monomer transitions of RepA in DNA replication initiation." Structure 23(1):183-189
- Whitley, C., y otros (2014). "Novel replication-competent circular DNA molecules from healthy cattle serum and milk and multiple sclerosis-affected human brain tissue." Genome Announc 2(4).
- zur Hausen, H., Bund, T., de Villiers, E.-M. (2017). "Infectious agents in bovine red meat and milk and their potential role in cancer and other chronic diseases." Curr. Top.Microbiol. Immunol., Volumen 407, 83-116.

REIVINDICACIONES

1. El uso in vitro de la proteína Rep del grupo 1 del factor de carne y leche bovina (BMMF1) como biomarcador del cáncer colorrectal.
2. El uso de acuerdo con la reivindicación 1, en donde la proteína Rep es una proteína Rep codificada por el genoma MSBI1 (Rep de MSBI1), una proteína Rep codificada por el genoma MSBI2 (Rep de MSBI2), una proteína Rep codificada por el genoma CMI1 (Rep de CMI1), una proteína Rep codificada por el genoma CMI2 (Rep de CMI2) o una proteína Rep codificada por el genoma CMI3 (Rep de CMI3).
3. Un método in vitro para proporcionar un diagnóstico o predisposición al cáncer colorrectal (CRC) en un sujeto, que comprende la etapa de detectar la proteína Rep en una muestra de un sujeto mediante anticuerpos anti-Rep que se unen a un epítipo comprendido en la SEQ ID NO:2 o SEQ ID NO:3.
4. El método de la reivindicación 3, en donde el anticuerpo específico para la proteína Rep se une a un epítipo que está dentro de una secuencia de aminoácidos seleccionada del grupo que consiste en los aminoácidos del 1 al 136, del 137 al 229 y del 230 al 324 de la SEQ ID NO:1.
5. El método de la reivindicación 3 o 4, en donde la muestra de un sujeto se selecciona del grupo que consiste en tejido de colon canceroso, tejido periférico que rodea el tejido de colon canceroso, pólipos de colon (benignos).
6. El método de cualquiera de las reivindicaciones 3 a 5, en donde adicionalmente se detectan células CD68 positivas en la muestra mediante un anticuerpo anti-CD68.
7. Un método in vitro para proporcionar una puntuación de pronóstico sobre el tiempo de supervivencia de un paciente con CRC, que comprende las etapas de
detectar la proteína Rep en una muestra de regiones peritumorales de pacientes con CRC mediante anticuerpos anti-Rep que se unen a un epítipo comprendido en la SEQ ID NO:2 o SEQ ID NO:3,
determinar para cada anticuerpo el porcentaje de células teñidas y la intensidad para proponer una puntuación inmunohistológica que sirve como indicador general del tiempo de supervivencia del paciente específico del CRC.

Figura 1

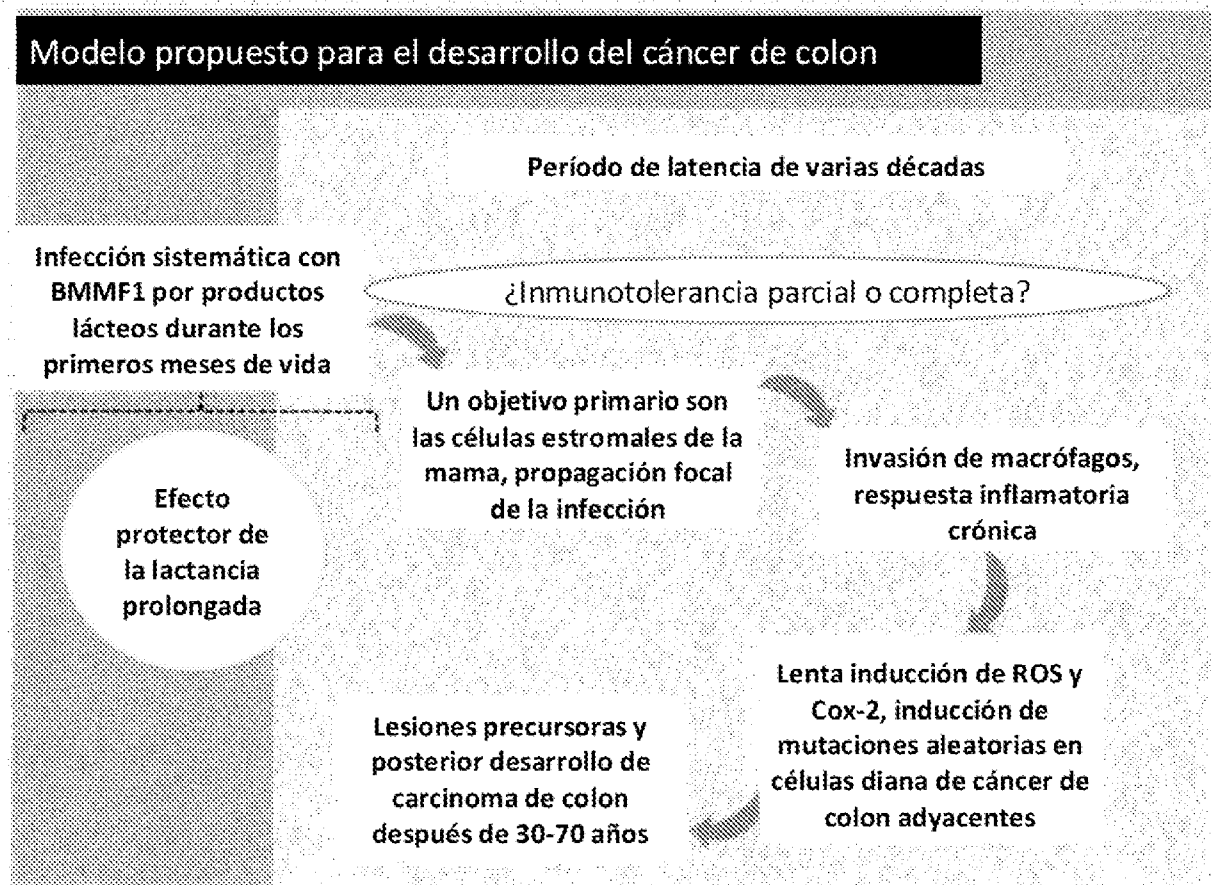


Figura 2

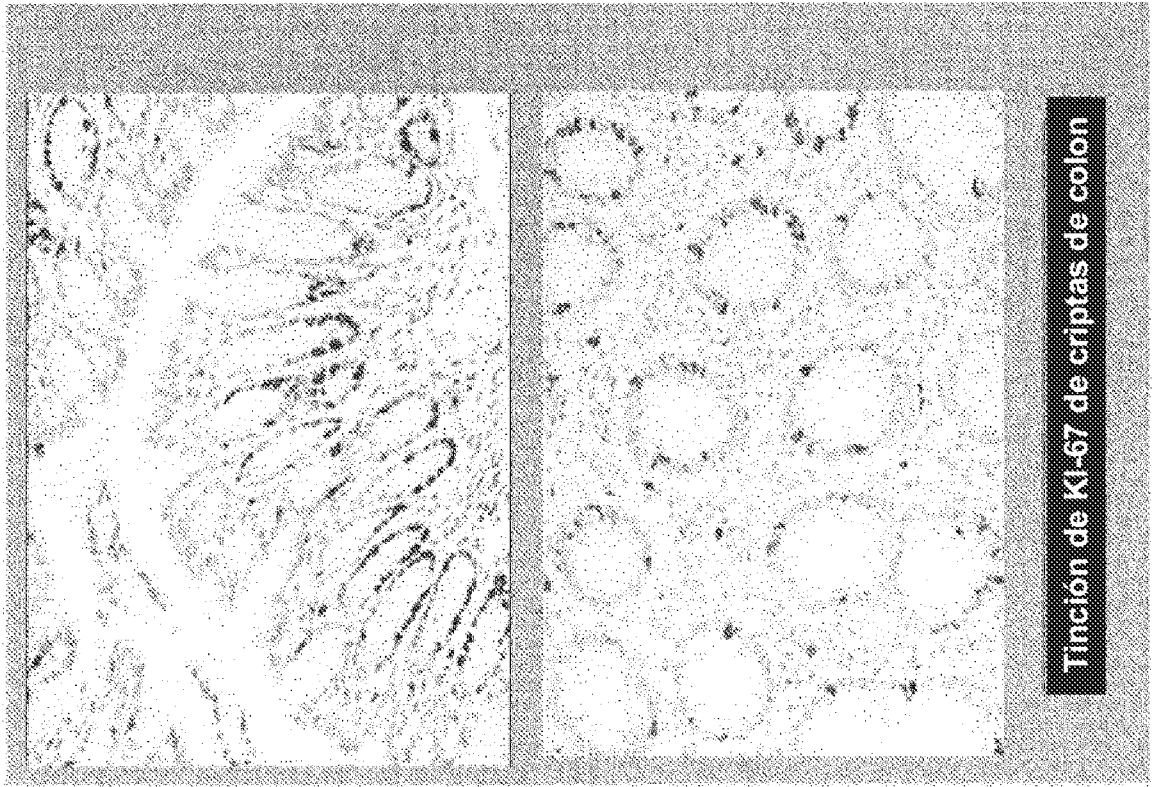


Figura 3

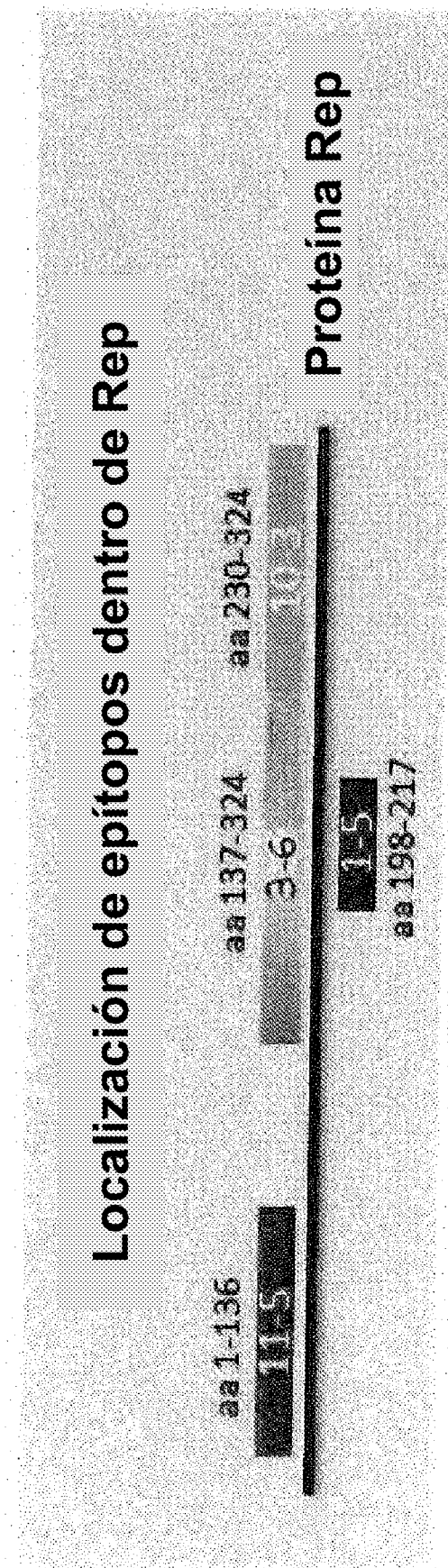


Figura 4

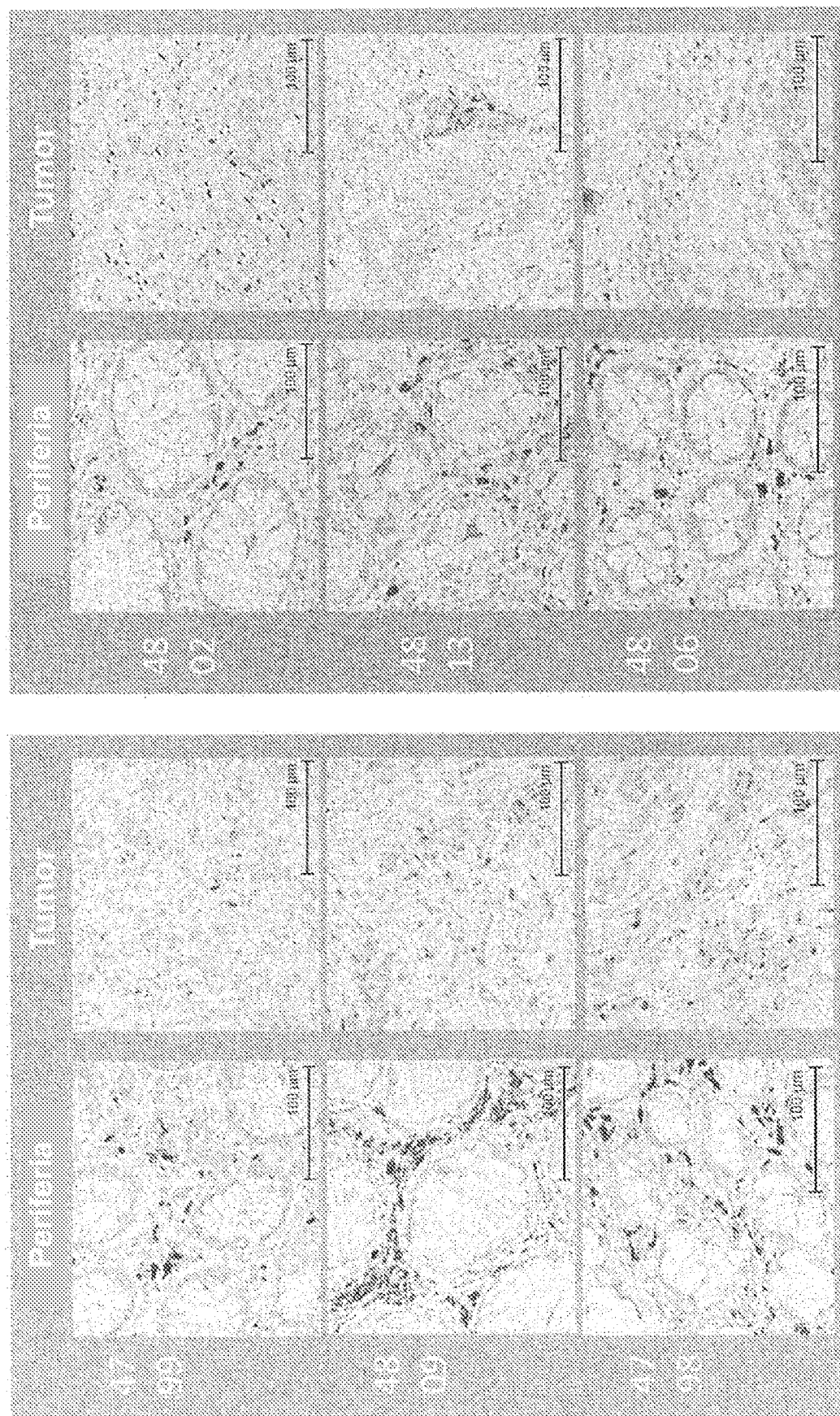
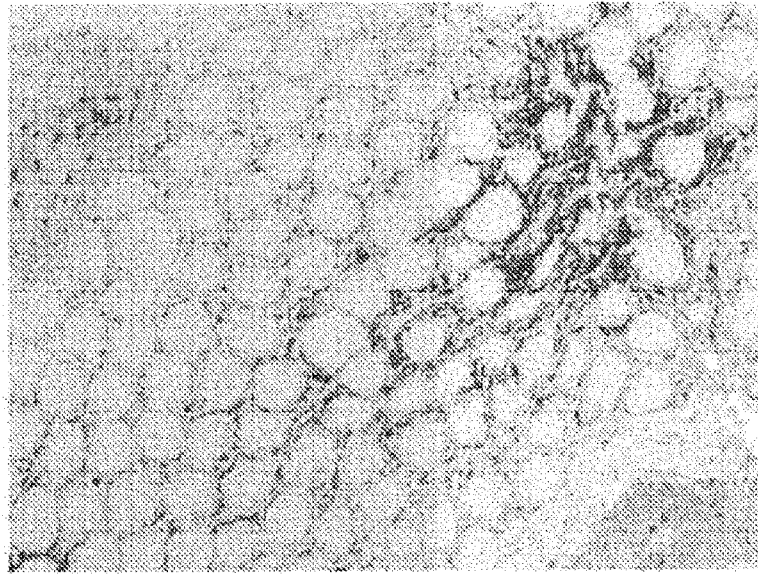
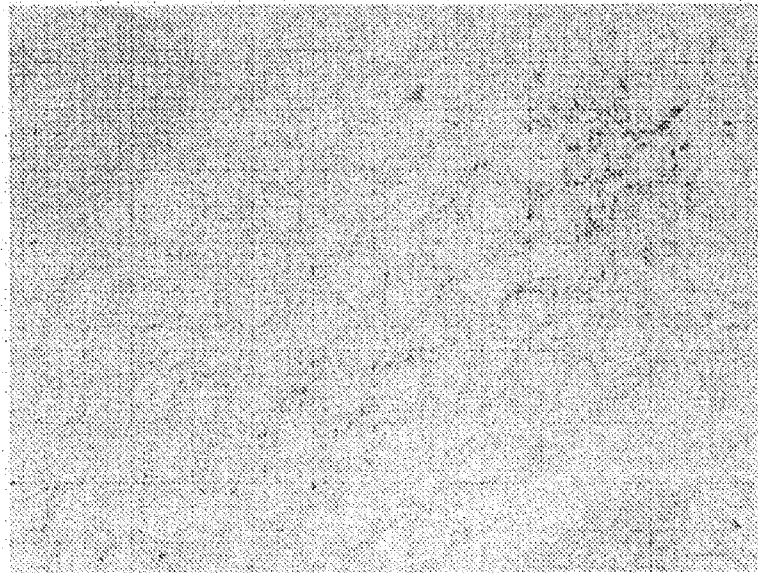


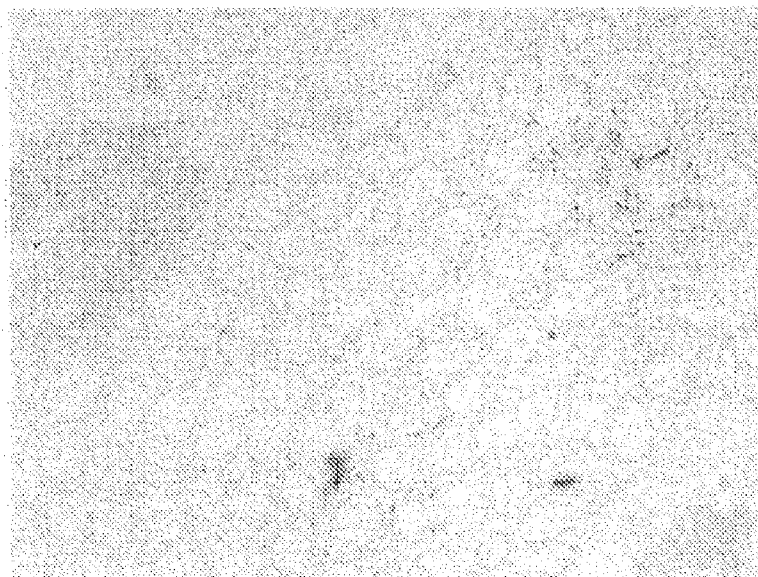
Figura 5



anti-
CD68



mAb anti-Rep
10-3



mAb anti-Rep
3-6

Figura 6

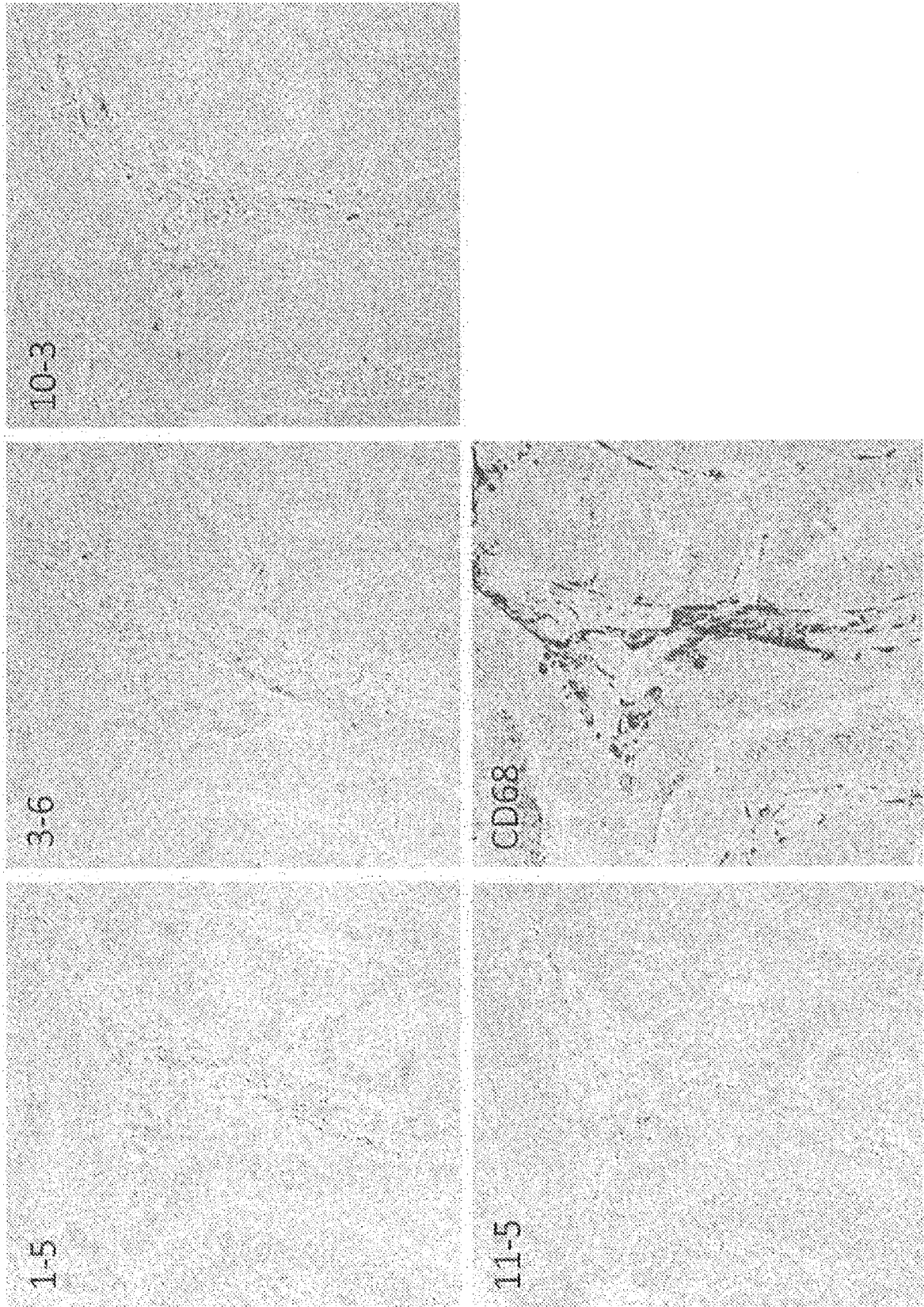


Figura 7

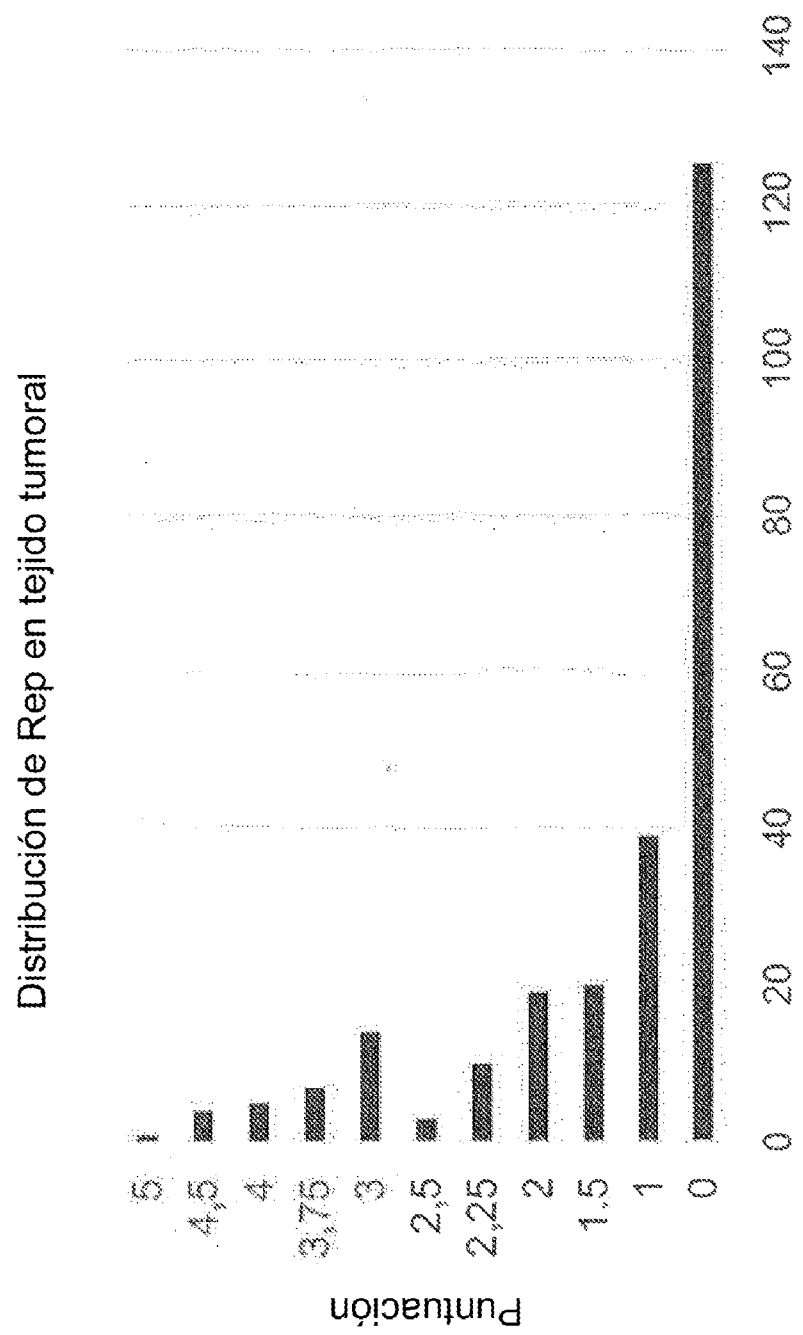


Figura 8

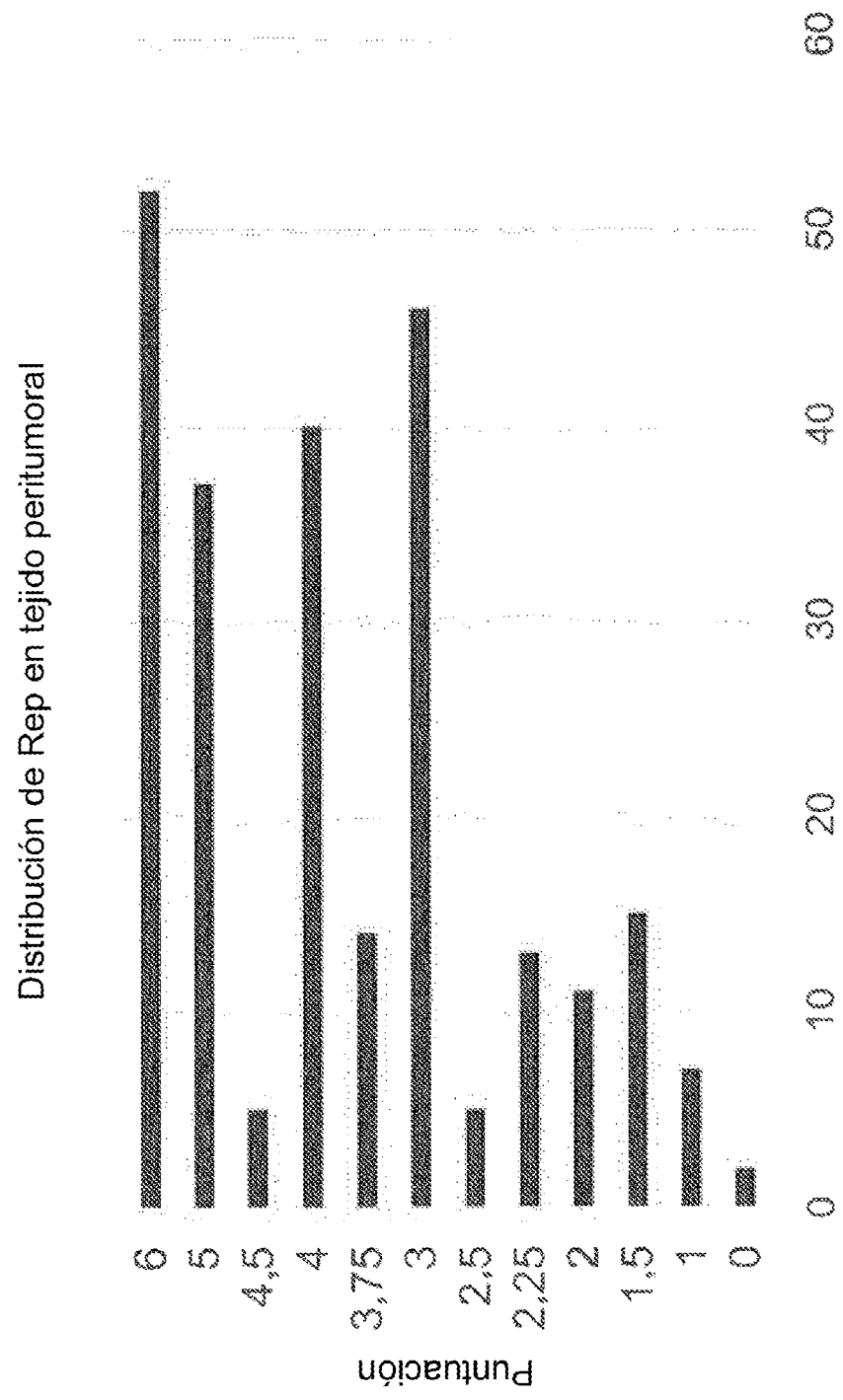


Figura 9

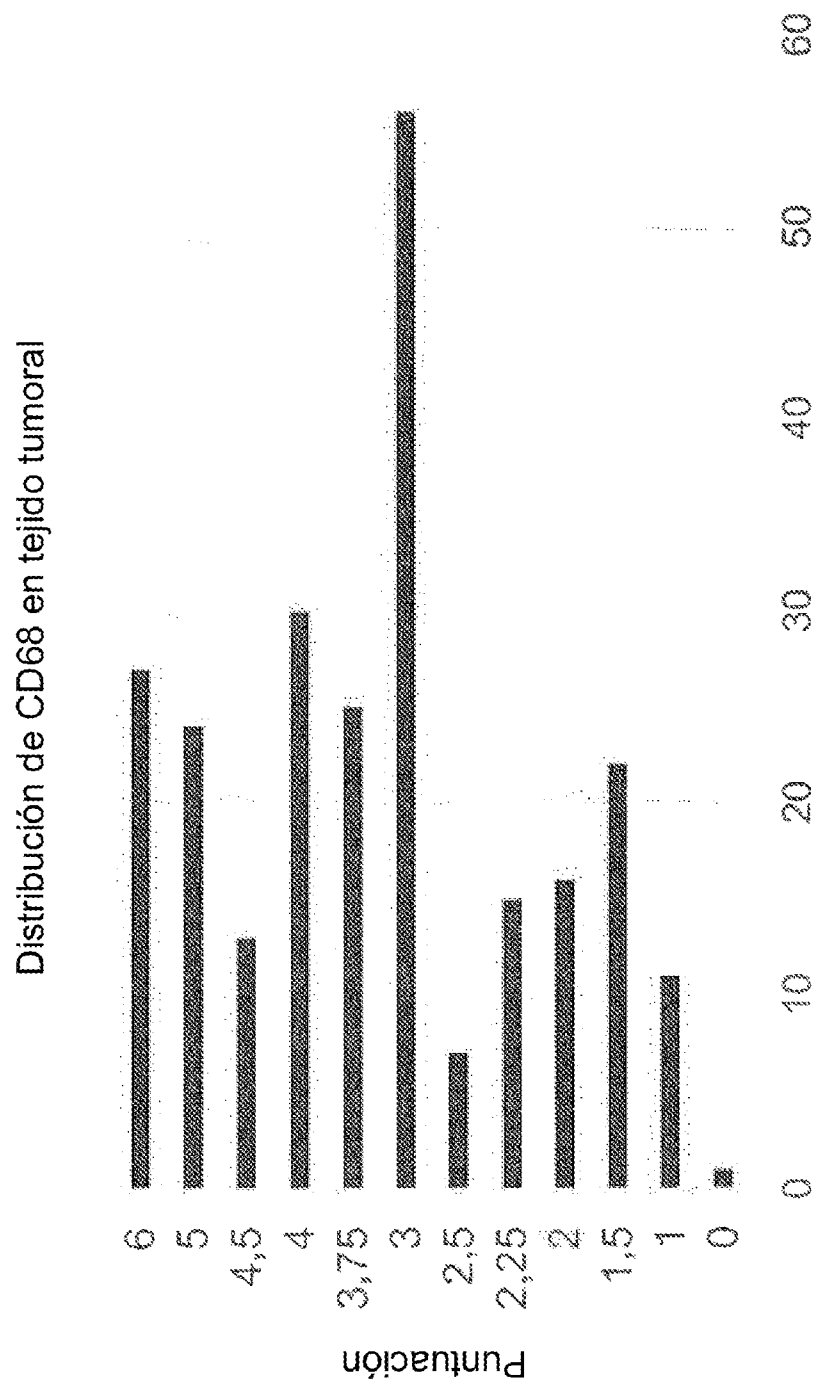


Figura 10

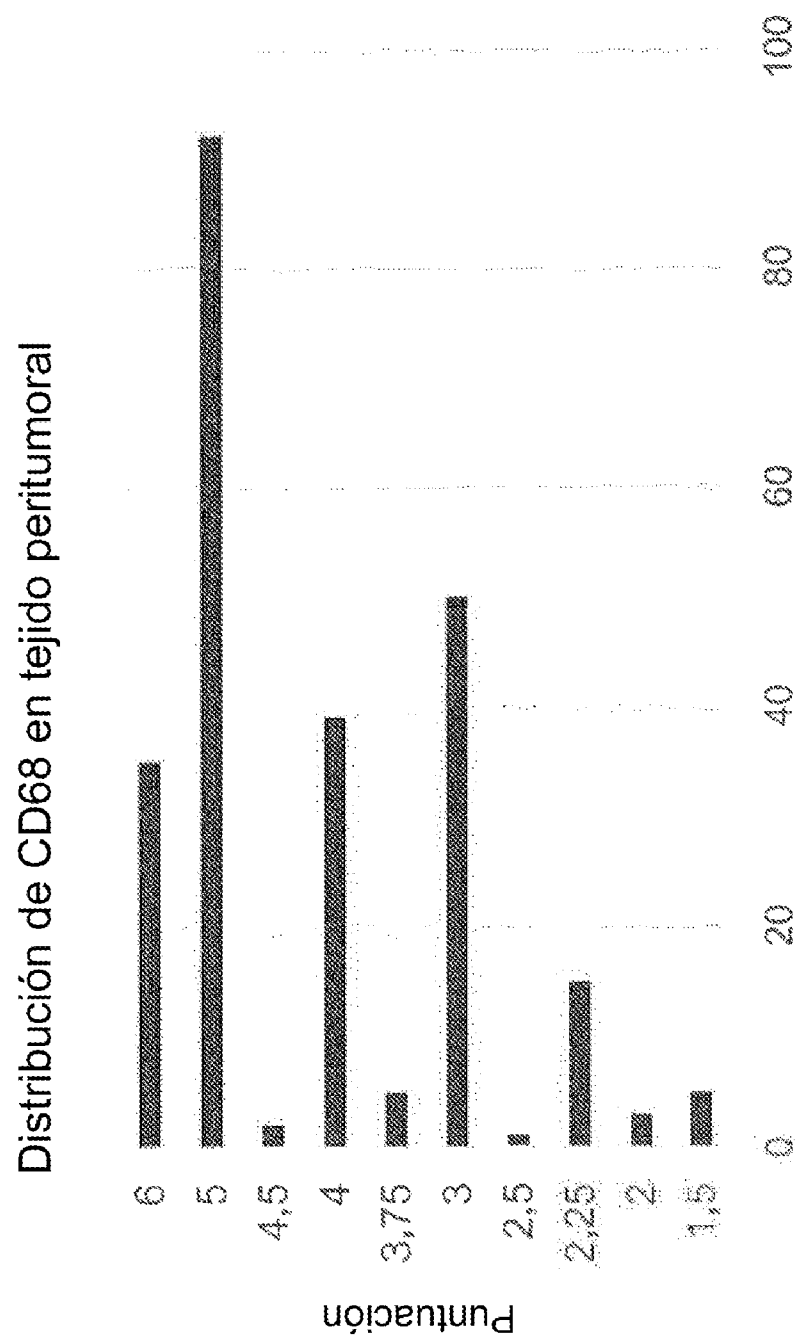


Figura 11

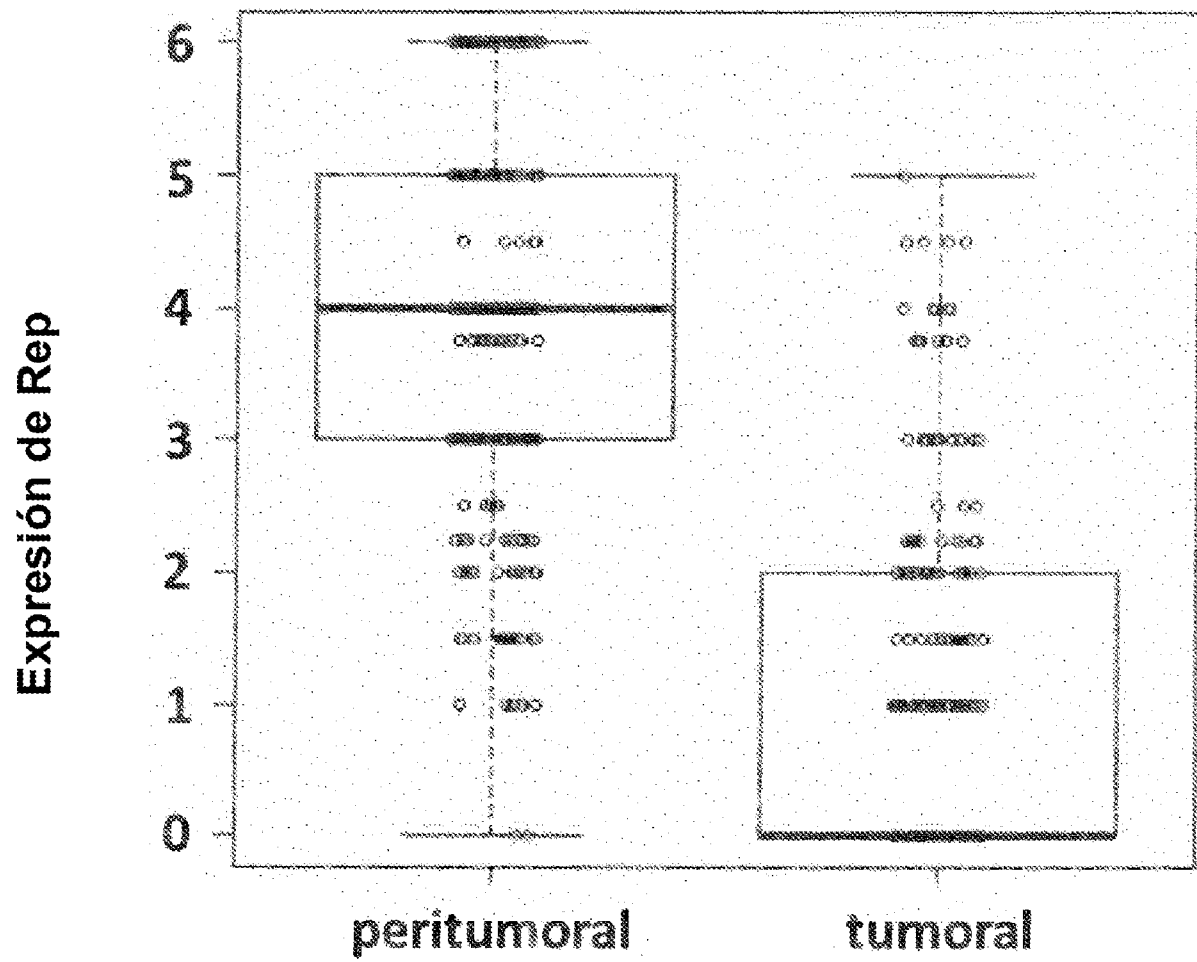


Figura 12

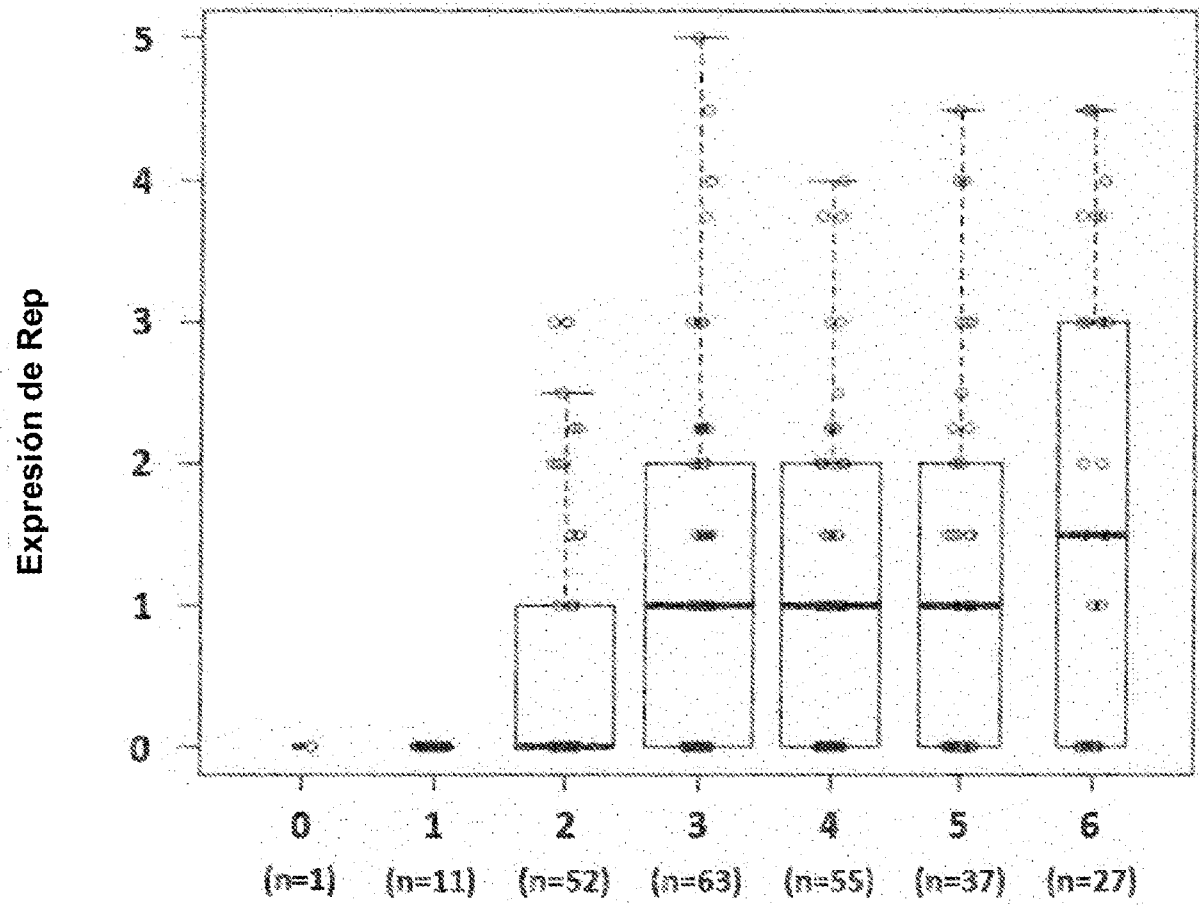


Figura 13

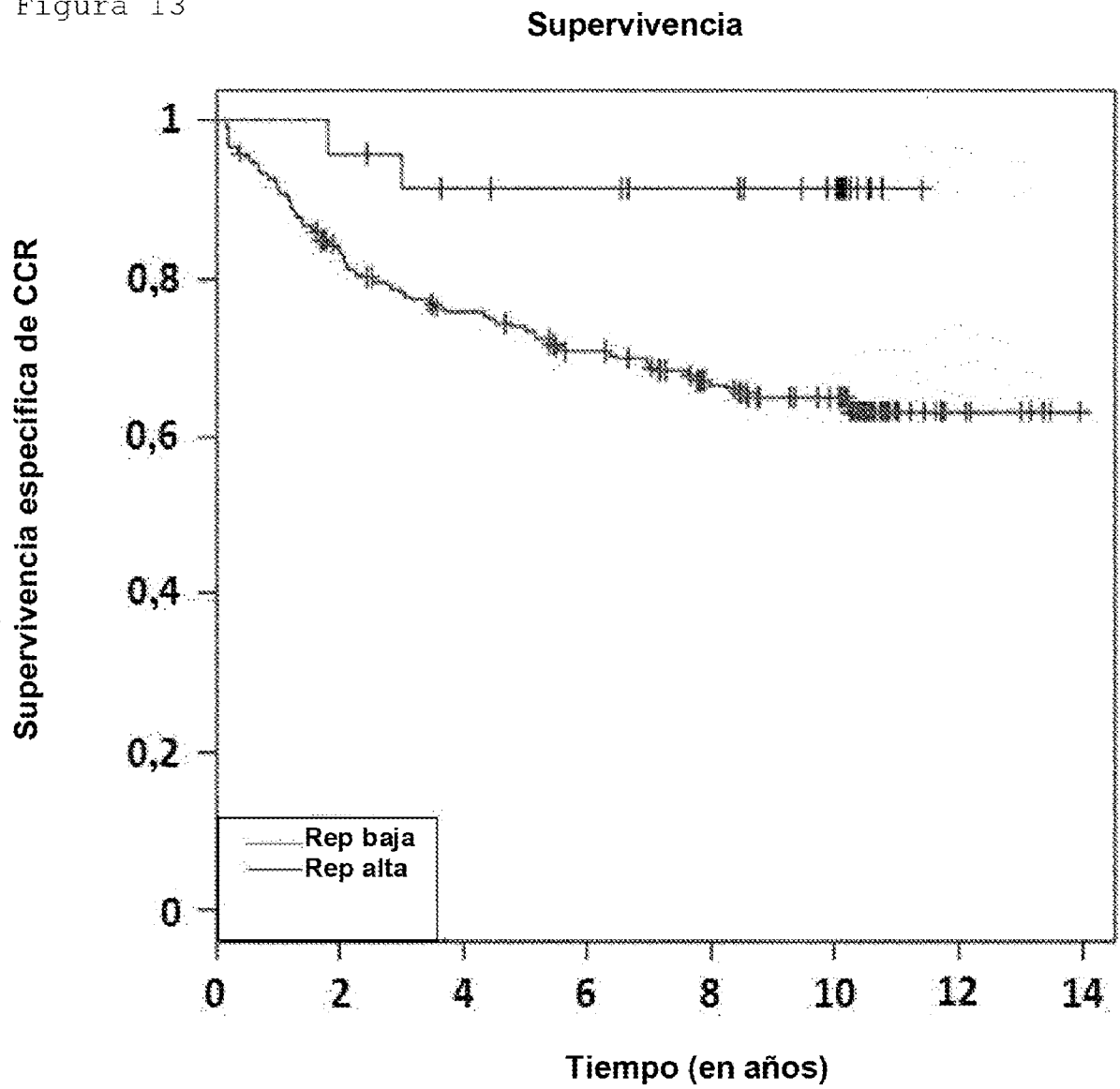


Figura 14

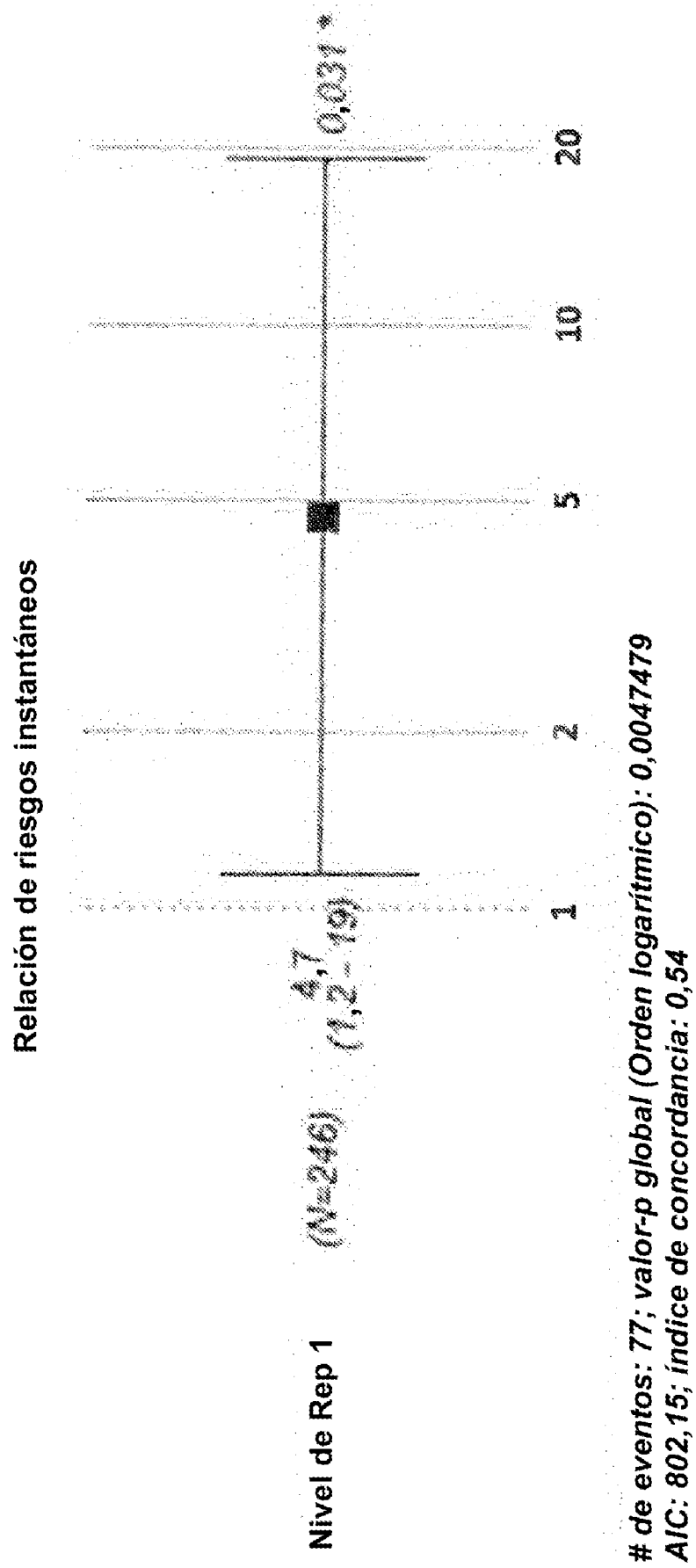


Figura 15

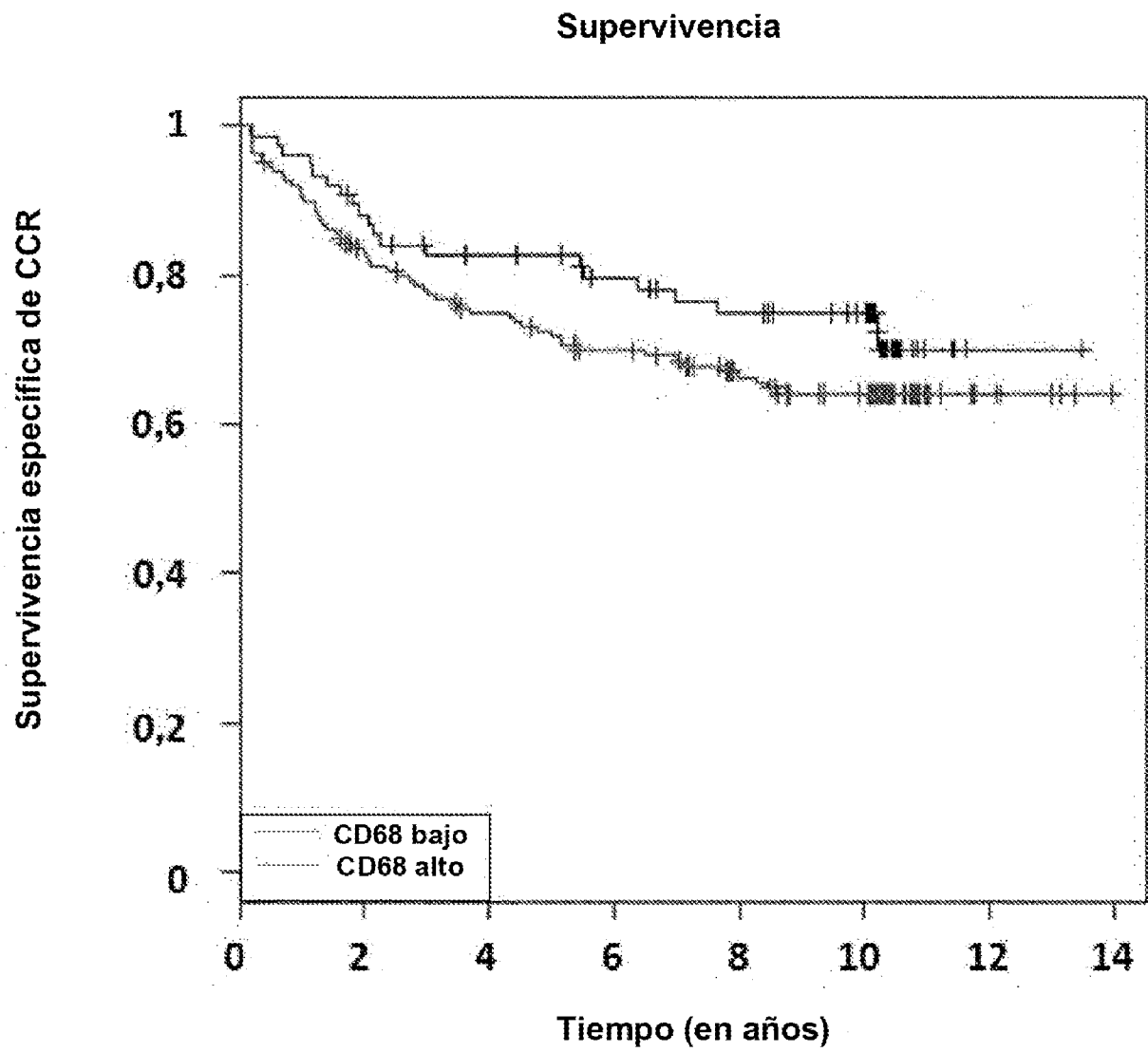


Figura 16

