



OFICINA ESPAÑOLA DE
PATENTES Y MARCAS

ESPAÑA

① Número de publicación: **2 332 167**

② Número de solicitud: 200703230

⑤ Int. Cl.:

C12Q 1/68 (2006.01)

A61B 5/00 (2006.01)

G01N 33/50 (2006.01)

⑫

PATENTE DE INVENCION

B1

⑫ Fecha de presentación: **04.12.2007**

⑬ Fecha de publicación de la solicitud: **27.01.2010**

Fecha de la concesión: **11.10.2010**

⑮ Fecha de anuncio de la concesión: **25.10.2010**

⑯ Fecha de publicación del folleto de la patente:
25.10.2010

⑰ Titular/es: **Universidad Autónoma de Madrid
c/ Einstein, 3
28049 Madrid, ES**

⑱ Inventor/es: **Casado Sáenz, Enrique;
Cejas Guerrero, Paloma;
González Baron, Manuel;
Perona Abellon, Rosario y
Sánchez Hernández, José Javier**

⑲ Agente: **Arias Sanz, Juan**

⑳ Título: **Empleo de Trefoil Factor-Family 3 (TFF3) en el pronóstico de sujetos diagnosticados con cáncer colorectal.**

㉑ Resumen:

Empleo de Trefoil Factor-Family 3 (TFF3) en el pronóstico de sujetos diagnosticados con cáncer colorectal.

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 respecto a niveles de expresión basales. Dichos métodos comprende la cuantificación del nivel de expresión del gen TFF3 o de la proteína codificada por dicho gen.

ES 2 332 167 B1

Aviso: Se puede realizar consulta prevista por el art. 37.3.8 LP.

DESCRIPCIÓN

Empleo de Trefoil Factor-Family 3 (TFF3) en el pronóstico de sujetos diagnosticados con cáncer colorectal.

5 **Campo de la invención**

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 respecto a niveles de expresión basales.

10

Antecedentes

15 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).

20 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).

25 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., 3 51: 1731-1740; Bosset, J.F., *et al.* 2006 N.Engl.J Med., 3 55: 1114-1123).

30 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 pueden ser subsidiarios de tratamientos más intensivos.

35 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; Reibischung, 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.

40 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.

55

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 microdissección tumoral con láser, se acompañó de una mayor tasa de recidivas (Liersch, T. *et al.* 2006, J Clin Oncol, 24: 4062-4068).

65 “Trefoil Factor Family 3” (TFF3), también llamado “Intestinal Trefoil Factor” (ITF), es una proteína liberada por las células caliciformes de la mucosa intestinal a la luz del intestino (Figura 2). Su función principal es colaborar en la reparación del epitelio intestinal. Para ello, actúa sobre las células de reserva epiteliales estimulando su división y migración para reepitelizar las superficies dañadas donde se ha perdido el epitelio. TFF3 activa una serie de rutas de señalización intracelular que inducen proliferación, actúan sobre las adhesiones celulares para facilitar la movilidad

celular, inhiben la apoptosis celular e incluso pueden mandar señales de activación de la angiogénesis a las células endoteliales de la mucosa y la lámina propia.

5 Los ratones knockout para TFF3 son fenotípicamente normales a menos que su intestino sea dañado, en cuyo caso los ratones mueren por fallo al curar la herida. Se ha propuesto el uso de un TFF3 recombinante para la terapia relacionada con síndrome del intestino irritable y otras enfermedades intestinales (e.g., la patente US 6,063,755, 6,316,218 y solicitud de patente US20010052483).

10 Los efectos fisiológicos de TFF3 en las células intestinales pueden considerarse beneficiosos para el crecimiento de las células cancerígenas, proliferación y metástasis. Por ejemplo, la resistencia a la apoptosis, inducción de la migración y protección de la activación del complemento se cree que son mecanismos a través de los cuales las células cancerígenas escapan al control del crecimiento, invaden los tejidos normales colindantes y escapan a la vigilancia del sistema inmune. Los datos recogidos de la práctica clínica sugieren que la expresión de TFF3 puede estar correlacionado con el mal pronóstico del cáncer gástrico (Yamachika, *et al.*, Clin. Cancer Res., 2002, 8, 1092).

15 Yio, X. *et al.*, 2005 (Clin Exp Metastasis. Vol. 22(2): 157-165) describen la correlación entre la expresión endógena y constitutiva de TFF3 y un fenotipo agresivo en células de cáncer de colon. Más concretamente, los autores han observado que todas las metástasis de colon humano examinadas expresan TFF3 y que TFF3 confiere un comportamiento maligno a las células de cáncer de colon. Adicionalmente, citan conclusiones de otros autores, dentro de las cuales se señala el hecho de que en células de cáncer gástrico, la inhibición de la expresión de TFF3 provoca un descenso en el crecimiento celular y una sensibilidad incrementada a la quimioterapia.

20 Por otro lado, Solmi, R. *et al.*, 2004 (Int J Oncol. Col. 25(4):1049-56) describen un conjunto de 11 genes, entre los que se encuentra TFF3, que se expresan diferencialmente en cáncer de colon.

25 La solicitud de patente US2007/0172857, a nombre de Sysmex Corporation, describe un conjunto de proteínas, entre las que se cita a TFF3, que se encuentran expresadas en exceso en células de cáncer derivadas de cáncer de colon. Tras varios ciclos de PCR, TFF3 es identificado como un marcador efectivo para detectar metástasis hacia el nódulo linfático de cáncer de colon.

30 La solicitud de patente internacional WO2007/082099, a nombre de Genomic Health, INC y NASBP Foundation, describe marcadores de expresión génica para el pronóstico de cáncer colorectal en distintos estados de desarrollo del cáncer. Entre los marcadores descritos se encuentra TFF3, que es empleado en un método para predecir el resultado clínico en un sujeto diagnosticado con cáncer tras la eliminación quirúrgica de dicho cáncer. En función del estado en que se encuentre el cáncer, es decir, Dukes B (estado II) o Dukes C (estado III), el nivel de expresión de TFF3 indica un mayor o menor probabilidad de un desarrollo clínico positivo para el paciente.

35 Por último, Rau, U. *et al.*, 2003 (J Clin Oncol. Vol. 21(18): 3391-401) describe la expresión dinámica de dos genes, P21WAF1/CIP1 y Ki-67 en pacientes con carcinoma o de recto, antes y después de someter a dichos pacientes a un tratamiento preoperatorio de radioquimioterapia. Así, los autores encontraron que la reducción de la expresión inmunohistoquímica de p21 y el aumento de la expresión de ki-67, estaba asociado a un peor pronóstico del paciente.

40 Por tanto, existe en el estado de la técnica la necesidad de proporcionar un marcador de expresión génica alternativo a los ya existentes, que permita pronosticar con fiabilidad la respuesta de un sujeto diagnosticado con cáncer colorectal a la terapia administrada en el tratamiento de dicho cáncer.

Compendio de la invención

50 En un aspecto, la invención se relaciona con un método *in vitro* para pronosticar la evolución de un sujeto diagnosticado con cáncer colorectal tras la administración de una terapia que comprende

- (i) cuantificar los niveles de expresión del gen *TFF3* o
- (ii) cuantificar los niveles de expresión de la proteína codificada por dicho gen, o cualquier variante funcionalmente equivalente de dicha proteína TFF3,

60 en una muestra biológica procedente de dicho sujeto antes y después de la terapia, en donde un aumento de la expresión de *TFF3* o del nivel de expresión de la proteína codificada por dicho gen, o cualquier variante funcionalmente equivalente de dicha proteína TFF3, tras la terapia administrada con respecto a la expresión de *TFF3* o del nivel de expresión de la proteína codificada por dicho gen, o cualquier variante funcionalmente equivalente de dicha proteína TFF3, antes de la terapia, es indicativa de una peor evolución del sujeto.

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

- (i) cuantificar los niveles de expresión del gen *TFF3* o

- (ii) cuantificar los niveles de la proteína codificada por dicho gen, o cualquier variante funcionalmente equivalente de dicha proteína TFF3,

5 en una muestra biológica procedente de dicho sujeto antes y después de dicha terapia, en donde un aumento de la expresión de *TFF3* o del nivel de expresión de la proteína codificada por dicho gen, o cualquier variante funcionalmente equivalente de dicha proteína TFF3, tras la terapia administrada con respecto a la expresión de *TFF3* o del nivel de expresión de la proteína codificada por dicho gen, o cualquier variante funcionalmente equivalente de dicha proteína TFF3, antes de la terapia, es indicativa de que la terapia administrada no es efectiva.

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

- (i) cuantificar los niveles de expresión del gen *TFF3* o

15 (ii) cuantificar los niveles de la proteína codificada por dicho gen, o cualquier variante funcionalmente equivalente de dicha proteína TFF3,

20 en una muestra biológica procedente de dicho sujeto antes y después de la terapia, en donde un aumento de la expresión de *TFF3* o del nivel de expresión de la proteína codificada por dicho gen, o cualquier variante funcionalmente equivalente de dicha proteína TFF3, tras la terapia administrada con respecto a la expresión de *TFF3* o del nivel de expresión de la proteína codificada por dicho gen, o cualquier variante funcionalmente equivalente de dicha proteína TFF3, antes de la terapia es indicativa de que el sujeto necesita una terapia alternativa a la terapia administrada originalmente.

25 En otro aspecto, la invención se relaciona con un método *in vitro* para pronosticar la evolución de un sujeto diagnosticado con cáncer colorectal, que comprende determinar el patrón de distribución de la proteína codificada por el gen *TFF3*, o cualquier variante funcionalmente equivalente de dicha proteína TFF3, en el tumor, en donde la detección de TFF3, o cualquier variante funcionalmente equivalente de dicha proteína TFF3, en la luz de las microglándulas tumorales y/o en el interior de los vasos linfáticos o sanguíneos, es indicativo de una peor evolución de un sujeto.

30 Por último, en otro aspecto, la invención se relaciona con un método para predecir la respuesta clínica de un sujeto diagnosticado con cáncer colorectal a una terapia que comprende

- (i) cuantificar los niveles de expresión del gen *TFF3* o

40 (ii) cuantificar los niveles de expresión de la proteína codificada por dicho gen, o cualquier variante funcionalmente equivalente de dicha proteína TFF3,

45 en una muestra biológica procedente de dicho sujeto antes de la administración de la terapia, en donde unos niveles de expresión de *TFF3* elevados respecto a los niveles de expresión basales de *TFF3*, es indicativo de una mala respuesta clínica del sujeto a la terapia.

Breve descripción de las figuras

50 La Figura 1 son unas gráficas que muestran la Supervivencia global (A) y la supervivencia libre de enfermedad (B) en función de las alteraciones en la expresión de TFF3 tras el tratamiento con quimiorradioterapia.

La Figura 2 es una gráfica que describe la relación estadísticamente significativa ($P < 0,0001$) entre la inmunotinción intensa de TFF3 en la secreción en la luz de las microglándulas del tumor y el riesgo de recaída de los pacientes.

55 La Figura 3 son fotografías que muestran la inmunotinción de TFF3 en la secreción de la luz de la microglándula tumoral. A: Caso con expresión baja de TFF3 en los citoplasmas de las células del tumor. B: Caso con expresión alta de TFF3 en los citoplasmas de las células tumorales. C: Inmunotinción de TFF3 en la luz del vaso.

60 Descripción detallada de la invención

La selección del tratamiento quimioterapéutico para cada caso individual de cáncer 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 descubierto que, sorprendentemente, un aumento de los niveles de expresión del gen *TFF3*, o de la proteína codificada por dicho gen, tras el tratamiento con quimiorradioterapia (QRT) se asocia a un elevado riesgo de recaída del sujeto que padece dicho cáncer.

ES 2 332 167 B1

En un aspecto, la invención se relaciona con un método *in vitro* para pronosticar la evolución de un sujeto diagnosticado con cáncer colorectal tras la administración de una terapia que comprende

- (i) cuantificar los niveles de expresión del gen *TFF3* o
- (ii) cuantificar los niveles de expresión de la proteína codificada por dicho gen, o cualquier variante funcionalmente equivalente de dicha proteína TFF3,

en una muestra biológica procedente de dicho sujeto antes y después de la terapia, en donde un aumento de la expresión de *TFF3* o del nivel de expresión de la proteína codificada por dicho gen, o cualquier variante funcionalmente equivalente de dicha proteína TFF3, tras la terapia administrada con respecto a la expresión de *TFF3* o del nivel de expresión de la proteína codificada por dicho gen, o cualquier variante funcionalmente equivalente de dicha proteína TFF3, antes de la terapia, es indicativa de una peor evolución del sujeto.

En una realización particular del método *in vitro* para pronosticar la evolución de un sujeto diagnosticado con cáncer colorectal, el parámetro que indica la evolución de dicho sujeto se selecciona del grupo de riesgo de recaída, de supervivencia libre de enfermedad y/o de supervivencia global del sujeto.

En la presente invención se entiende por “riesgo de recaída”, a la probabilidad de un sujeto de volver a desarrollar cáncer 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 detecta 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 con cáncer colorectal, que comprende

- (i) cuantificar los niveles de expresión del gen *TFF3* o
- (ii) cuantificar los niveles de la proteína codificada por dicho gen, o cualquier variante funcionalmente equivalente de dicha proteína TFF3,

en una muestra biológica procedente de dicho sujeto antes y después de dicha terapia, en donde un aumento de la expresión de *TFF3* o del nivel de expresión de la proteína codificada por dicho gen, o cualquier variante funcionalmente equivalente de dicha proteína TFF3, tras la terapia administrada con respecto a la expresión de *TFF3* o del nivel de expresión de la proteína codificada por dicho gen, o cualquier variante funcionalmente equivalente de dicha proteína TFF3, antes de la terapia, es indicativa de que la terapia administrada no es efectiva.

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

- (i) cuantificar los niveles de expresión del gen *TFF3* o
- (ii) cuantificar los niveles de la proteína codificada por dicho gen, o cualquier variante funcionalmente equivalente de dicha proteína TFF3,

en una muestra biológica procedente de dicho sujeto antes y después de la terapia, en donde un aumento de la expresión de *TFF3* o del nivel de expresión de la proteína codificada por dicho gen, o cualquier variante funcionalmente equivalente de dicha proteína TFF3, tras la terapia administrada con respecto a la expresión de *TFF3* o del nivel de expresión de la proteína codificada por dicho gen, o cualquier variante funcionalmente equivalente de dicha proteína TFF3, antes de la terapia es indicativa de que el sujeto necesita una terapia alternativa a la terapia administrada originalmente.

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 de la proteína TFF3”, una proteína cuya secuencia de aminoácidos (i) es sustancialmente homóloga a la secuencia de aminoácidos de la proteína TFF3 y (ii) realiza las mismas funciones que la proteína TFF3. La similitud funcional de una proteína con otra concreta puede

determinarse mediante ensayos de interferencia con la expresión del gen que codifica 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 realizan utilizando secuencias de ARNs de interferencia específicas y complementarias 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].

El experto en la materia entiende que, las mutaciones en la secuencia de nucleótidos de *TFF3* 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 *TFF3* que presenten inserciones, deleciones o modificaciones de uno o más aminoácidos respecto a *TFF3*, y conserven, además, las mismas funciones que *TFF3*.

Por tanto, tal como aquí se utiliza, el término “variante funcionalmente equivalente” también incluye cualquier fragmento funcionalmente equivalente de una *TFF3*. El término “fragmento” se refiere a un péptido que comprende una porción de una proteína. En este caso, un fragmento funcionalmente equivalente de *TFF3* es un péptido o proteína que comprende una porción de *TFF3* y las mismas funciones que *TFF3*.

En la presente invención se entiende por “terapia alternativa” a una terapia distinta de la terapia administrada originalmente, aquí denominada terapia estándar, 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, kilos 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.

La cuantificación de los niveles de expresión del gen *TFF3* puede realizarse a partir del ARN resultante de la transcripción de dicho gen (ARNm) o, alternativamente, a partir del ADN complementario (ADNc) de dicho gen. Por tanto, en una realización particular de la invención, la cuantificación de los niveles de expresión del gen *TFF3* comprende la cuantificación del ARN mensajero del gen *TFF3*, un fragmento de dicho ARNm, ADN complementario del gen *TFF3*, 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 el gen *TFF3* o de su ADNc correspondiente. A modo ilustrativo, no limitativo, los niveles de ARNm codificados por dicho gen puede ser cuantificado 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 del gen de interés (*TFF3*) o de su ADNc correspondiente, mapeo con la nucleasa S1, RT-LCR, hibridación, microarrays, etc., preferentemente, mediante PCR cuantitativa a tiempo real usando un marcador apropiado. Análogamente, los niveles del ADNc correspondiente a dicho ARNm codificado por el gen *TFF3* 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, la cuantificación de los niveles de expresión del gen *TFF3* se realiza mediante una reacción en cadena de la polimerasa (PCR) cuantitativa.

Por otro lado, para la puesta en práctica de la invención, a parte de cuantificar los niveles de expresión del gen *TFF3*, también se pueden cuantificar los niveles de expresión de la proteína codificada por dicho gen, es decir, la proteína TFF3 (TFF3), o cualquier variante funcionalmente equivalente de dicha proteína TFF3. Así, en una realización particular, la cuantificación de los niveles de la proteína codificada por el gen *TFF3* comprende la cuantificación de la proteína TFF3.

El nivel de expresión de la proteína TFF3 puede ser cuantificado mediante cualquier método convencional que permita detectar y cuantificar dicha proteína en una muestra de un sujeto. A modo ilustrativo, no limitativo, los niveles de dicha proteína puede cuantificarse, por ejemplo, mediante el empleo de anticuerpos con capacidad de unirse a TFF3 (o a fragmentos de la misma 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 sándwich 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 TFF3 que pueden emplearse en el contexto de la presente invención, como por ejemplo, el anticuerpo monoclonal comercial contra TFF3 Abnova H00007033-M01 y empleado en el Ejemplo 2 que acompaña a la presente descripción.

En una realización particular, la cuantificación de los niveles de proteína codificada por el gen *TFF3* se realiza mediante western blot, inmunohistoquímica o ELISA.

En la terapia del cáncer colorectal, se pueden utilizar una variedad de tratamientos para tratar de eliminar o contener el cáncer. Dependiendo de la salud del sujeto, 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, quimioterapia, 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; antraciclina, 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, tulipóxido, irinotecán 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, procarbazona 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, 13^a 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.

ES 2 332 167 B1

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 de señalización es Cetuximab, Panitumumab o Erlotinib.

5 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, plasmas 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.

15 Adicionalmente, en otra realización particular, la cuantificación de los niveles de expresión de la proteína codificada por el gen *TFF3*, o cualquier variante funcionalmente de dicha proteína, pueden medirse en el citoplasma de las células tumorales a partir de la muestra de tejido tumoral.

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

25 Adicionalmente, mediante la biopsia del tumor, los inventores han descubierto que la distribución espacial de la proteína TFF3 en el tejido tumoral muestra un patrón que se correlaciona con el pronóstico de un sujeto diagnosticado con cáncer colorectal. Así, la presencia de TFF3 en la luz de las microglándulas tumorales y/o en el interior de los vasos linfáticos o sanguíneos es indicativo de una peor evolución de un sujeto.

30 Por tanto, en otro aspecto la invención se relaciona con un método *in vitro* para pronosticar la evolución de un sujeto diagnosticado con cáncer colorectal, que comprende determinar el patrón de distribución de la proteína codificada por el gen *TFF3* en el tumor, o cualquier variante funcionalmente equivalente de dicha proteína TFF3, en donde la detección de TFF3, o cualquier variante funcionalmente equivalente de dicha proteína TFF3, en la luz de las microglándulas tumorales y/o en el interior de los vasos linfáticos o sanguíneos, es indicativo de una peor evolución de un sujeto.

35 Tal como se ha indicado anteriormente, el parámetro que indica la evolución de un sujeto diagnosticado con cáncer colorectal se selecciona del grupo de riesgo de recaída, la supervivencia libre de enfermedad y/o la supervivencia global del sujeto, términos que han sido definidos anteriormente.

40 En otra realización particular, al sujeto diagnosticado con cáncer colorectal se le ha administrado quimiorradioterapia antes de la extracción del tumor.

45 Las técnicas de inmunohistoquímica permiten la identificación, sobre muestras tisulares o citológicas, de determinantes antigénicos característicos de distintas líneas de diferenciación y funcionalismo celular. La aplicación directa de anticuerpos policlonales o monoclonales sobre secciones tisulares permite la localización microanatómica de su expresión y su correlación con los parámetros morfológicos.

Así, en otra realización particular, la detección de proteína codificada por el gen *TFF3* se realiza mediante inmunohistoquímica.

50 En otra realización particular, el cáncer colorectal es adenocarcinoma de intestino grueso en estadios II ó III ó IV.

En otro aspecto, la invención se relaciona con un método para predecir la respuesta clínica de un sujeto diagnosticado con cáncer colorectal a una terapia que comprende

- 55
- (i) cuantificar los niveles de expresión del gen *TFF3* o
 - (ii) cuantificar los niveles de expresión de la proteína codificada por dicho gen, o cualquier variante funcionalmente equivalente de dicha proteína TFF3,
- 60

en una muestra biológica procedente de dicho sujeto antes de la administración de la terapia, en donde unos niveles de expresión de *TFF3* elevados respecto a los niveles de expresión basales de *TFF3*, es indicativo de una mala respuesta clínica del sujeto a la terapia.

65 En la presente invención se entiende por “niveles de expresión basales” al nivel de expresión de *TFF3* en células epiteliales intestinales que proliferan de manera normal, es decir, sin dar lugar al desarrollo de un tumor.

ES 2 332 167 B1

Adicionalmente, en la presente invención también puede entenderse por “niveles de expresión basales” a aquel nivel de expresión que resulta de calcular la media de las expresiones de *TFF3* en un conjunto de muestras tumorales de cáncer colorectal.

5 Como entiende el experto en la materia, los diferentes tratamientos contra cáncer, las distintas técnicas del estado de la técnica para cuantificar los niveles de expresión de un gen o de su proteína correspondiente citados en la presente descripción pueden aplicarse al presente método y constituyen, por tanto, realizaciones particulares del mismo.

10 Ejemplo 1

Análisis del cambio dinámico del transcriptoma después de la quimiorradioterapia

I. Material y métodos

15 *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.

25 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 (uT3N0), adyacente al margen anal, que requirió amputación abdominoperineal. 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.

30 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.

35 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 margen 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 (ver Tabla 1 en la página siguiente).

40

(Tabla pasa a página siguiente)

45

50

55

60

65

TABLA 1

Pacientes y características tumorales

| | Total | | GRT 0/I | | GRT II/III | | GRT IV | |
|--|-------|-------|---------|-------|------------|-------|--------|-------|
| | n | % | n | NTR | n | TR | n | % |
| | | | | % | | % | | |
| Número total de pacientes | 95 | 100 | 17 | 18 | 62 | 65 | 17 | 17 |
| Edad media (rango) | 62 | 23-84 | 63 | 37-75 | 63 | 23-84 | 61 | 36-73 |
| Sexo | | | | | | | | |
| Varones | 55 | 58 | 10 | 59 | 34 | 56 | 11 | 65 |
| Mujeres | 40 | 42 | 7 | 41 | 27 | 44 | 6 | 35 |
| Distancia a anal | | | | | | | | |
| <6 cms | 36 | 38 | 13 | 76 | 39 | 64 | 7 | 41 |
| >6 cms | 59 | 62 | 4 | 24 | 22 | 26 | 10 | 59 |
| Clasificación pre-QRT clínica del tumor (cT) | | | | | | | | |
| cT2 | 8 | 8 | 1 | 6 | 5 | 8 | 2 | 12 |
| cT3 | 61 | 64 | 11 | 64 | 38 | 62 | 12 | 70 |
| cT4 | 9 | 9 | 2 | 12 | 6 | 10 | 1 | 6 |
| indeterminado | 17 | 18 | 3 | 18 | 12 | 20 | 2 | 12 |
| Clasificación pre-QRT clínica nodal (cN) | | | | | | | | |
| cN- | 40 | 42 | 8 | 47 | 26 | 42 | 6 | 35 |
| cN+ | 41 | 43 | 6 | 35 | 27 | 44 | 8 | 47 |
| indeterminado | 14 | 15 | 3 | 18 | 8 | 13 | 3 | 18 |
| Clasificación post-QRT patológica del tumor (ypT) | | | | | | | | |
| ypT0 | 16 | 17 | 0 | | 3 | 5 | 17 | 100 |
| ypT1 | 4 | 4 | 1 | 6 | 3 | 5 | | |
| ypT2 | 22 | 23 | 4 | 23 | 17 | 28 | | |
| ypT3 | 52 | 55 | 11 | 65 | 38 | 62 | | |
| ypT4 | 1 | 1 | 1 | 5 | 0 | 0 | | |
| Clasificación post-QRT patológica nodal (ypN) | | | | | | | | |
| ypN0 | 76 | 80 | 11 | 64 | 49 | 80 | 17 | 100 |
| ypN1 | 13 | 14 | 3 | 18 | 9 | 15 | 0 | 0 |
| ypN2 | 6 | 6 | 3 | 18 | 3 | 5 | 0 | 0 |
| ypNx | 0 | 0 | 0 | 0 | 0 | 0 | 0 | 0 |
| Tipo de resección | | | | | | | | |
| R0 | 95 | 100 | 17 | 18 | 62 | 65 | 17 | 17 |
| QRT preoperatoria | | | | | | | | |
| Oxaliplatino-Raltitrexed | 49 | 52 | 5 | 30 | 36 | 59 | 8 | 47 |
| 5-FU en infusión/UFT | 46 | 48 | 12 | 70 | 25 | 41 | 9 | 53 |
| Patrones de recurrencia | | | | | | | | |
| Local | 6 | | 2 | | 4 | | 0 | |
| Distancia | 16 | | 4 | | 11 | | 1 | |
| Ambas | 1 | | 1 | | 0 | | 0 | |
| Muerte | | | | | | | | |
| Sí | 12 | 13 | 4 | 24 | 8 | 13 | 0 | 0 |
| No | 83 | 87 | 13 | 76 | 53 | 87 | 17 | 100 |

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

ES 2 332 167 B1

En el análisis estadístico se incluyeron 95 pacientes, 34 de los cuales fueron descartados como resultado de datos de expresión génica incompletos o muestras patológicas inapropiadas.

5 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.

10

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/ascodownloads/Colon_Cancer_Tool_11-1-05.xls).

15

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

20

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 hematoxilina 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 especímenes quirúrgicos congelados. Se requirió que todas las muestras contuvieran al menos un 90% de muestras tumorales tras la microdissección.

25

De los 129 pacientes reclutados mencionados anteriormente, se seleccionaron 95 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 macrodissección 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.

35

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 concatémicos. 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 comercializado por la casa comercial (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.

50

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 basando en 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.

55

PCR cuantitativa múltiple

60

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 $50\ \mu\text{l}$ con TaqMan Universal PCR Master Mix (Applied Biosystems) y $50\ \mu\text{l}$ 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 2), y el resto a partir de la literatura (Tabla 3).

65

ES 2 332 167 B1

TABLA 2

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 | fMiosina 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 | | |
| FXVD3 | 86/36 | 52/16 | 4/22 | 301350 | FXVD 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 | | |

ES 2 332 167 B1

TABLA 2 (continuación)

| Gene | Patient A Pre/post (p) | Patient B Pre/Post (p) | Patient C Pre/post (p) | Unigene ID | Descripción |
|----------|------------------------------|------------------------------|------------------------------|---------------|---|
| 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 transcrito asociado 1 |
| | 0,032457 | 0,1675 | 0,5122 | | |
| SELENBP1 | 15/5 | 14/5 | 20/6 | 334841 | Proteína 1 de 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 | | |
| ZYG | 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 | Tryptophanyl-tRNA sintetasa |
| | 0,0354 | 0,0091 | 0,36992 | | |
| PCYT2 | 41/20 | 23/8 | 3/11 | 514635 | Citidililtransferase 2 fosfato, etanolamina |
| | 0,0039 | 0,0045 | 0,02292 | | |
| GSTP1 | 13/10 | 16/7 | 8/12 | 523836 | Glutación S-transferase pi |
| | 0,324 | 0,0458 | 0,20702 | | |
| EFF2 | 52/34 | 45/32 | 40/37 | 515070 | Factor de elongación Traducción de proteínas |
| | 0,0257 | 0,0754 | 0,48 | | |

ES 2 332 167 B1

TABLA 3

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

| Símbolo gen | Unigene | Descripción |
|-------------|-----------|--|
| MKI67 | Hs.80976 | Antígeno 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 aldehído 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 | Proteína tumoral p53 (síndrome de Li-Fraumeni) |
| RELB | Hs.654402 | Homólogo B del oncogen de la reticuloendoteliosis viral, factor nuclear del enhancer del polipéptido de cadenas ligeras kappa en células B 3 (aviar) |
| ALDH3A1 | Hs.531882 | Familia de la Aldehído deshidrogenasa 3, miembro A1 |
| 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 |
| EGGF1 | Hs.592212 | Endothelial cell growth factor 1 (platelet-derived) |
| MLH1 | Hs.195364 | MutL homolog 1, cáncer de colon, tipo II no poliposico (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.582338 | 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.589019 | 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 corrección 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 asunción 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 95 pacientes para el análisis de PCR cuantitativa múltiple. Se ilustran en la Tabla 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 2).

Cribaje de cambios transcripcionales después de la QRT mediante PCR cuantitativa múltiple

El análisis de alteraciones en la expresión de los genes incluidos en las tarjetas microfluídicas, antes y después del tratamiento, mostró una serie de genes que se regularon significativamente tras el tratamiento (Tabla 4).

TABLA 4

Genes que se regulan significativamente tras el tratamiento quimiorradioterápico

| Gen | Diferencia | p |
|---------------------------------|------------|--------|
| 4342379-18S (FAM,NFQ) | 1,81 | 0,0001 |
| ACTB-Hs99999903_m1 (FAM,NFQ) | 1,71 | 0,0001 |
| ABCB4-Hs00240956_m1 (FAM,NFQ) | 0,4 | 0,07 |
| AKT1-Hs00178289_m1 (FAM,NFQ) | 0,74 | 0,02 |
| ALDH1A1-Hs00167445_m1 (FAM,NFQ) | 2,07 | 0,0001 |
| ALDH3A1-Hs00167469_m1 (FAM,NFQ) | 0,58 | 0,04 |
| AURKB-Hs00177782_m1 (FAM,NFQ) | -0,59 | 0,11 |
| BAK1-Hs00832876_g1 (FAM,NFQ) | 0,63 | 0,13 |

ES 2 332 167 B1

TABLA 4 (continuación)

| | Gen | Diferencia | p |
|----|------------------------------------|------------|--------|
| 5 | BCL2-Hs00153350_m1 (FAM,NFQ) | 1,2 | 0,0001 |
| | BIRC5-Hs00153353_m1 (FAM,NFQ) | -0,75 | 0,06 |
| 10 | CDKN1A-Hs00355782_m1 (FAM,NFQ) | 2,02 | 0,0001 |
| | CDKN1B-Hs00153277_m1 (FAM,NFQ) | 0,89 | 0,01 |
| 15 | CHKA-Hs00608045_m1 (FAM,NFQ) | 0,15 | 0,62 |
| | DPYD-Hs00559278_m1 (FAM,NFQ) | 1,8 | 0,0001 |
| 20 | ECGF1-Hs00157317_m1 (FAM,NFQ) | 0,96 | 0,008 |
| | EGFR-Hs00193306_m1 (FAM,NFQ) | 0,79 | 0,03 |
| 25 | ERCC1-Hs00157415_m1 (FAM,NFQ) | 1,25 | 0,0001 |
| | ERCC2-Hs00361161_m1 (FAM,NFQ) | 0,48 | 0,11 |
| 30 | FOS-Hs00170630_m1 (FAM,NFQ) | 3,58 | 0,0001 |
| | FRAP1-Hs00234508_m1 (FAM,NFQ) | 0,24 | 0,47 |
| 35 | KDR-Hs00176676_m1 (FAM,NFQ) | 0,15 | 0,67 |
| | LGALS4-Hs00196223_m1 (FAM,NFQ) | -1,08 | 0,03 |
| 40 | MAPK14-Hs00176247_m1 (FAM,NFQ) | 0,34 | 0,26 |
| | MAPK9-Hs00177102_m1 (FAM,NFQ) | 0,43 | 0,21 |
| 45 | MKI67-Hs00606991_m1 (FAM,NFQ) | -0,61 | 0,1 |
| | MLH1-Hs00179866_m1 (FAM,NFQ) | 0,85 | 0,01 |
| 50 | PIK3R1-Hs00236128_m1 (FAM,NFQ) | 1,06 | 0,003 |
| | RELB-Hs00232399_m1 (FAM,NFQ) | 1,11 | 0,001 |
| 55 | SPARC-Hs00234160_m1 (FAM,NFQ) | 2,38 | 0,0001 |
| | STAT3-Hs00374280_m1 (FAM,NFQ) | 1,07 | 0,001 |
| 60 | TP53-Hs00153340_m1 (FAM,NFQ) | 0,35 | 0,43 |
| | TYMS-Hs00426591_m1 (FAM,NFQ) | 0,22 | 0,52 |
| | 4342379-18S (FAM,NFQ) | 2,56 | 0,0001 |
| 65 | ACTB-Hs99999903_m1 (FAM,NFQ) | 0,74 | 0,13 |
| | ANGPTL4-Hs00211522_m1 (FAM,NFQ) | 0,43 | 0,007 |

ES 2 332 167 B1

TABLA 4 (continuación)

| | Gen | Diferencia | p |
|----|--------------------------------------|------------|--------|
| 5 | BAT1-Hs00366447_m1 (FAM,NFQ) | 0,99 | 0,02 |
| | CCNB1IP1-Hs00603841_m1 (FAM,NFQ) | 1,47 | 0,002 |
| 10 | CHC1-Hs00154399_m1 (FAM,NFQ) | 1,58 | 0,0001 |
| | CKB-Hs00176484_m1 (FAM,NFQ) | 2,24 | 0,0001 |
| 15 | COL1A1-Hs00164004_m1 (FAM,NFQ) | 1,5 | 0,001 |
| | EEF2-Hs00157330_m1 (FAM,NFQ) | 0,98 | 0,009 |
| 20 | FXD3-Hs00254209_m1 (FAM,NFQ) | 0,62 | 0,11 |
| | GPX2-Hs00702173_s1 (FAM,NFQ) | 0,17 | 0,71 |
| 25 | GSTP1-Hs00168310_m1 (FAM,NFQ) | 1,89 | 0,0001 |
| | HIG2-Hs00203383_m1 (FAM,NFQ) | 3,31 | 0,0001 |
| 30 | HLA-C-Hs00740298_g1 (FAM,NFQ) | 1,27 | 0,008 |
| | ITGB4-Hs00173995_m1 (FAM,NFQ) | -1,2 | 0,007 |
| 35 | K-ALPHA-1-Hs00744842_sH (FAM,NFQ) | 1,12 | 0,04 |
| | MMP14-Hs00237119_m1 (FAM,NFQ) | -1,46 | 0,15 |
| 40 | MYO5B-Hs00393037_m1 (FAM,NFQ) | 0,62 | 0,12 |
| | PCYT2-Hs00161098_m1 (FAM,NFQ) | 0,62 | 0,05 |
| 45 | PH-4-Hs00214665_m1 (FAM,NFQ) | -5,93 | 0,0001 |
| | PMM1-Hs00160195_m1 (FAM,NFQ) | -0,05 | 0,9 |
| 50 | PSMB4-Hs00160598_m1 (FAM,NFQ) | 0,32 | 0,45 |
| | PSMB6-Hs00382586_m1 (FAM,NFQ) | 1,72 | 0,0001 |
| 55 | S100A10-Hs00237010_m1 (FAM,NFQ) | 0 | - |
| | SELENBP1-Hs00187625_m1 (FAM,NFQ) | 0,28 | 0,52 |
| 60 | SMAD2-Hs00183425_m1 (FAM,NFQ) | 0,67 | 0,05 |
| | TFF3-Hs00173625_m1 (FAM,NFQ) | 1,08 | 0,009 |
| 65 | WARS-Hs00188259_m1 (FAM,NFQ) | 1,08 | 0,009 |
| | XIST-Hs00300535_s1 (FAM,NFQ) | 1,38 | 0,001 |
| | ZYX-Hs00170299_m1 (FAM,NFQ) | 1 | 0,05 |

Correlación de cambios dinámicos en la expresión con el pronóstico

El análisis de los cambios dinámicos en la expresión de los genes incluidos en las tarjetas microfluídicas, en relación a las recaídas del cáncer de recto, mostró que la regulación positiva de TFF3 tras el tratamiento se asoció con una pronunciada tendencia a la recaída estadísticamente significativa ($p=0,005$), como se muestra en la Figura 1. En dicha figura se ilustran la supervivencia libre de enfermedad (Figura 1A) y supervivencia global (Figura 1B). Hubo también una clara diferencia en las curvas de supervivencia, aunque no llega a alcanzar la significación estadística, en el probable contexto de un seguimiento inferior a 5 años, como es el caso, dada la supervivencia media de las recaídas, de 20-30 meses, en la enfermedad diseminada.

III. *Discusión*

En la presente invención se demuestra que una estrategia de cribaje ciego de los cambios en el transcriptoma tumoral que se desarrollan tras las quimiorradioterapia, seguida de una exploración dirigida de estos cambios y de otras dianas sugeridas en la literatura antes y después del tratamiento, es eficaz para encontrar un marcador dinámico que identifica pacientes con alto riesgo de recaída. Se trata por tanto de una interesante diana terapéutica, particularmente dada la gran plausibilidad biológica que deriva de la biología de esta diana candidata, TFF3.

La gran tendencia a la recaída que presentan los pacientes que regulan al alza TFF3 tras el tratamiento identifica a pacientes de mal pronóstico que bien podrían beneficiarse de tratamientos alternativos al tratamiento estándar, en el contexto perioperatorio de la enfermedad localizada o la enfermedad diseminada. Los datos aquí recogidos ponen de relieve que TFF3 puede ser empleado con fines pronósticos y además desvela el interés clínico que su abordaje puede tener, muy compatible con la mayor agresividad que se ha sugerido en el comportamiento de líneas celulares de cáncer de colon.

Ejemplo 2

*Análisis inmunohistoquímico de la distribución de TFF3 en el cáncer colorectal*I. *Material y métodos*

Para el estudio inmunohistoquímico se eligieron 77 pacientes de la serie de 129 con estadios II/III de cáncer de recto a menos de 10 centímetros de margen anal, que recibieron dos o más ciclos de quimioterapia y 50.4 Gy de radioterapia antes de la cirugía, cuyas variables clínicopatológicas están registradas en la Tabla 1 anterior.

Se utilizaron los mismos bloques parafinados que se habían empleado para la extracción de ARN. Se cortaron secciones de 4 μm de estos bloques y se adhirieron a portaobjetos xilanizados (Dako Corporation). Estas preparaciones se desparafinaron y se bloqueó la peroxidasa endógena incubando en 3% H_2O_2 en metanol durante 10 minutos a temperatura ambiente. El desmascaramiento antigénico se llevó a cabo mediante incubación con EDTA durante 45 minutos a 155°C. El anticuerpo monoclonal comercial contra TFF3 (Abnova H00007033-M01) se utilizó a una dilución de 1:500 en 1% BSA en TBS. La incubación se llevó a cabo durante 30 minutos a temperatura ambiente. Para la visualización de la reacción se utilizó el sistema EnVision™ kit (Dako Corporation, Carpintería, CA) que utiliza un anticuerpo secundario unido a peroxidasa. Se incubó este anticuerpo secundario durante 30 minutos a temperatura ambiente. Finalmente, se incubaron las preparaciones con el sustrato cromogénico diaminobencidina (Dako Corporation, Carpintería, CA) durante 5 minutos a temperatura ambiente. Las preparaciones se contratiñeron con hematoxilina y se deshidrató el tejido utilizando alcoholes de grado creciente y xilol. Las preparaciones fueron analizadas por un patólogo.

II. *Resultados**Inmunohistoquímica de TFF3*

El estudio inmunohistoquímico se realizó en muestras de 77 pacientes. Los pacientes restantes de la serie no pudieron ser estudiados por falta de muestra. Se analizó la muestra completa (antes y después del tratamiento) en 18 pacientes. El análisis preliminar de estos 18 pacientes no mostró diferencias de expresión de TFF3 significativas al comparar las muestras antes y después del tratamiento. Por tanto, en los 59 pacientes restantes solo se estudió la muestra de la pieza quirúrgica tras QRT. Del total de las 77 muestras quirúrgicas ya tratadas, 65 resultaron con inmunotinción valorable y mostraron, en algunos casos, la presencia de inmunotinción intensa de TFF3 en la secreción en la luz de las microglándulas del tumor. El análisis realizado de estas inmunotinciones, se reduce a la valoración de si hay o no presencia de inmunotinción intensa de la secreción en la luz de las microglándulas (Figura 3A y 3B). Estas 65 muestras presentaron expresión variable de TFF3 y de ellas se encontró la imagen característica de inmunotinción intensa de la secreción en microglándula (Figura 3A y 3B) en 19 de los casos. Los 46 restantes no presentaron inmunotinción de la secreción extracelular. De los 19 casos con secreción, 16 pertenecieron a pacientes que sufrieron recaída de su enfermedad. Sin embargo entre los 46 restantes solo 10 recayeron. Estos resultados muestran una relación estadísticamente significativa ($P<0,0001$) entre la presencia de este tipo de inmunotinción intensa de la secreción en microglándula y el riesgo de recaída en los pacientes estudiados; este resultado se muestra en la Figura 2.

Los pacientes que mostraron inmunotinción intensa de la secreción mostraron una significativa peor respuesta tumoral (Tabla 1), menor supervivencia global (Figura 3A) y menor supervivencia libre de enfermedad (Figura 3B).

5 Además, en algunos de los 19 casos con inmunotinción intensa de la secreción en microglándulas, también mostraron inmunotinción de TFF3 en la luz de vasos linfáticos y sanguíneos (Figura 3C).

Comparación del resultado de análisis de expresión de TFF3 mediante QRT-PCR e inmunohistoquímica

10 De las 65 muestras con expresión valorable mediante inmunohistoquímica de TFF3, 57 tienen medida la expresión de TFF3 mediante PCR cuantitativa. Se tomaron estos 57 pacientes para analizar la posible correlación entre los resultados de la medida de expresión de TFF3 con una y otra técnica. Los resultados mostraron una correlación significativa entre los pacientes que aumentan la expresión de TFF3 al comparar la medida antes y después del tratamiento mediante PCR cuantitativa y los pacientes que mostraron inmunotinción intensa de la secreción en microglándulas.

15 III. *Discusión*

TFF3 también se ha estudiado mediante inmunohistoquímica y se han comparado los resultados obtenidos mediante ambas técnicas. Los resultados del análisis mediante inmunohistoquímica muestran, como hallazgo más significativo al estudiar la muestra tras el tratamiento, que algunos casos presentan inmunotinción positiva de TFF3 en la secreción a la luz de las microglándulas del tumor. La imagen de esta inmunotinción, que se muestra en la Figura 3, es muy característica y permite obtener un parámetro de análisis objetivable. La aparición de estas secreciones se relaciona con un mayor riesgo de recaída de la enfermedad. Además, los resultados muestran una correlación estadísticamente significativa al comparar la expresión obtenida mediante análisis del ARN mensajero utilizando PCR cuantitativa y los resultados obtenidos por análisis mediante inmunohistoquímica de la proteína. Este resultado es muy interesante, ya que esta técnica es de uso habitual para el diagnóstico en los servicios de Anatomía Patológica de los hospitales de todo el mundo. Por tanto, la utilización de esta técnica para analizar la presencia o no de inmunotinción de TFF3 en las secreciones extracelulares a la luz de las microglándulas tumorales en la pieza quirúrgica posterior al tratamiento, podría tener valor pronóstico en sujetos diagnosticados de cáncer colorectal.

30

35

40

45

50

55

60

65

REIVINDICACIONES

5 1. Método *in vitro* para pronosticar la evolución de un sujeto diagnosticado con cáncer colorectal tras la administración de una terapia, para monitorizar el efecto de una terapia administrada a un sujeto diagnosticado con cáncer colorrectal o para diseñar una terapia personalizada a un sujeto diagnosticado con cáncer colorrectal que comprende

- (i) cuantificar los niveles de expresión del gen *TFF3* o
- 10 (ii) cuantificar los niveles de expresión de la proteína codificada por dicho gen, o cualquier variante funcionalmente equivalente de dicha: proteína TFF3,

15 en una muestra biológica procedente de dicho sujeto antes y después de la terapia, en donde un aumento de la expresión de *TFF3* o del nivel de expresión de la proteína codificada por dicho gen, o cualquier variante funcionalmente equivalente de dicha proteína TFF3, tras la terapia administrada con respecto a la expresión de *TFF3* o del nivel de expresión de la proteína codificada por dicho gen, o cualquier variante funcionalmente equivalente de dicha proteína TFF3, antes de la terapia, es indicativa de una peor evolución del sujeto, de que la terapia administrada no es efectiva o de que el sujeto necesita una terapia alternativa a la terapia administrada originalmente.

20 2. Método según cualquiera de las reivindicación 1, en donde la cuantificación de los niveles de expresión del gen *TFF3* comprende la cuantificación del ARN mensajero (ARNm) del gen *TFF3*, un fragmento de dicho ARNm, ADN complementario (ADNc) del gen *TFF3*, un fragmento de dicho ADNc, o sus mezclas.

25 3. Método según cualquiera de las reivindicaciones 1 ó 2, en donde la cuantificación de los niveles de expresión del gen *TFF3* se realiza mediante una reacción en cadena de la polimerasa (PCR) cuantitativa.

4. Método según cualquiera de las reivindicaciones 1 a 3, en donde la cuantificación de los niveles de la proteína codificada por el gen *TFF3* comprende la cuantificación de la proteína TFF3.

30 5. Método según cualquiera de las reivindicaciones 1 a 4, en donde la cuantificación de los niveles de proteína codificada por el gen *TFF3* se realiza mediante western blot, inmunohistoquímica o ELISA.

35 6. Método según cualquiera de las reivindicaciones 1 a 5, en donde la terapia administrada es un tratamiento citotóxico y/o citostático.

7. Método según la reivindicación 6, en donde el tratamiento citotóxico y/o citostático es quimioterapia, radioterapia, agentes antitumorales o combinaciones de los mismos.

40 8. Método según la reivindicación 7, 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.

45 9. Método según la reivindicación 8, 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.

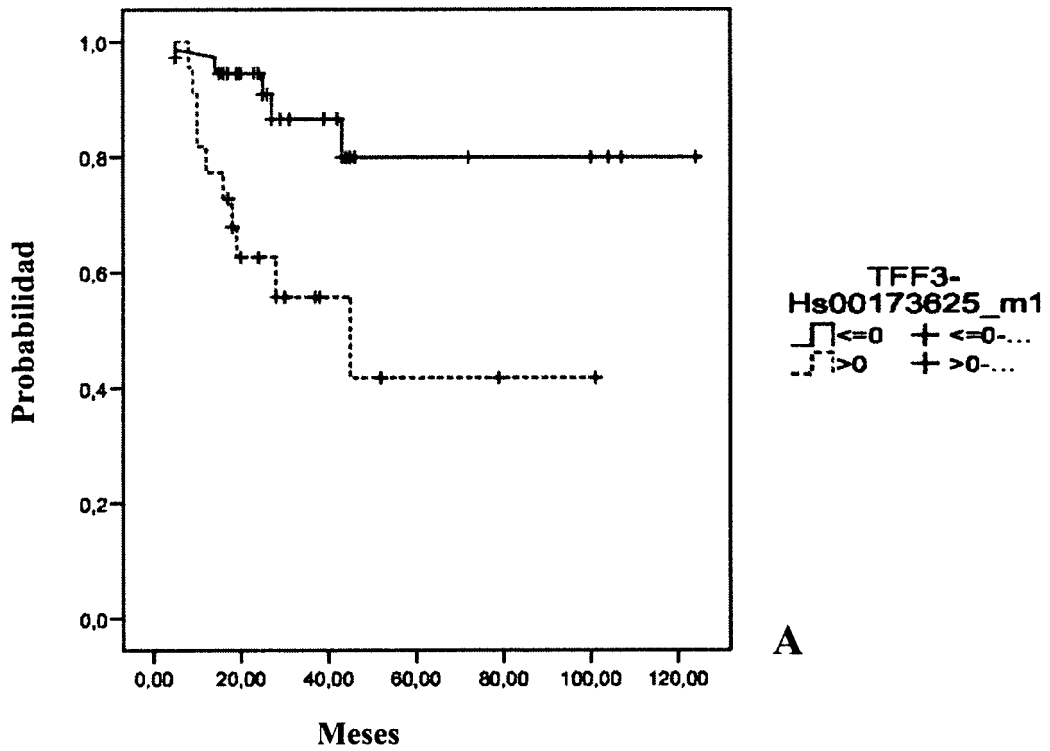
10. Método según la reivindicación 7 en donde el agente antitumoral comprende agentes antiangiogénicos e inhibidores de rutas de señalización.

50 11. Método según la reivindicación 10, en donde el agente antiangiogénico es Bevacizumab y el inhibidor de la ruta de señalización es Cetuximab, Panitumumab o erlotinib.

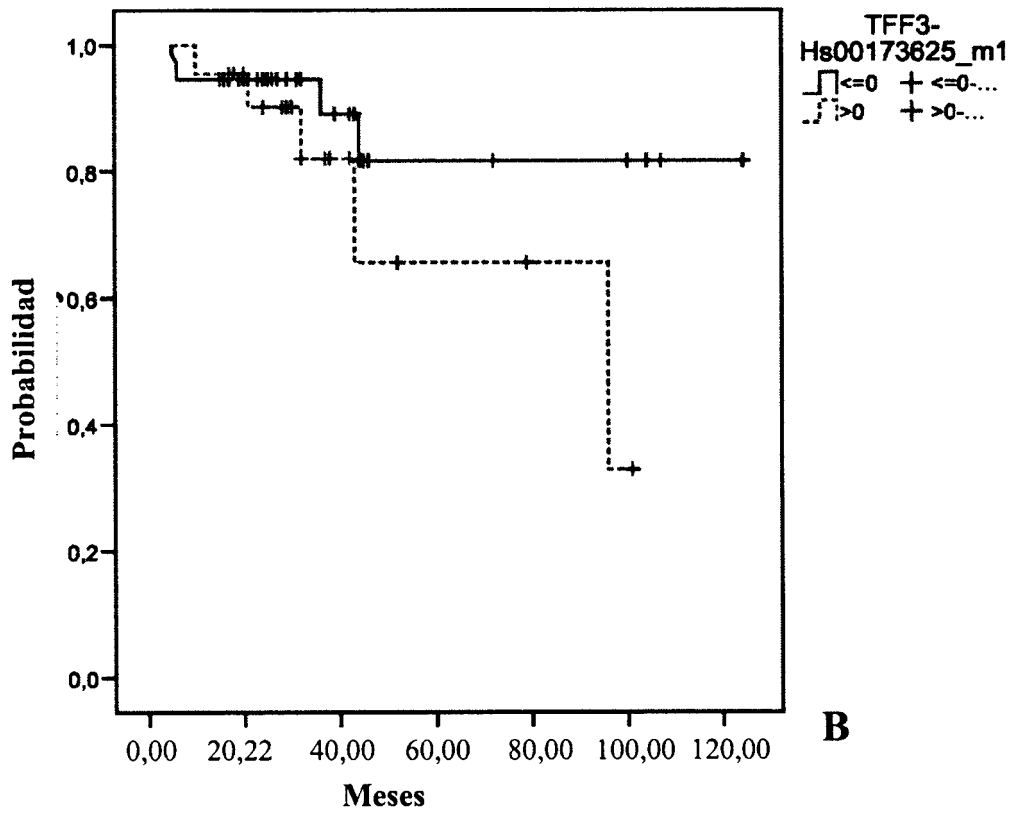
55 12. Método según cualquiera de las reivindicaciones 1 a 11, en donde la muestra biológica es una muestra de tejido o un fluido biológico.

13. Método según la reivindicación 12, en donde la muestra de tejido es tumoral.

60 14. Método según cualquiera de las reivindicaciones 1 a 13 en donde el cáncer colorectal es adenocarcinoma de intestino grueso en estadios II ó III ó IV.



A



B

FIGURA 1

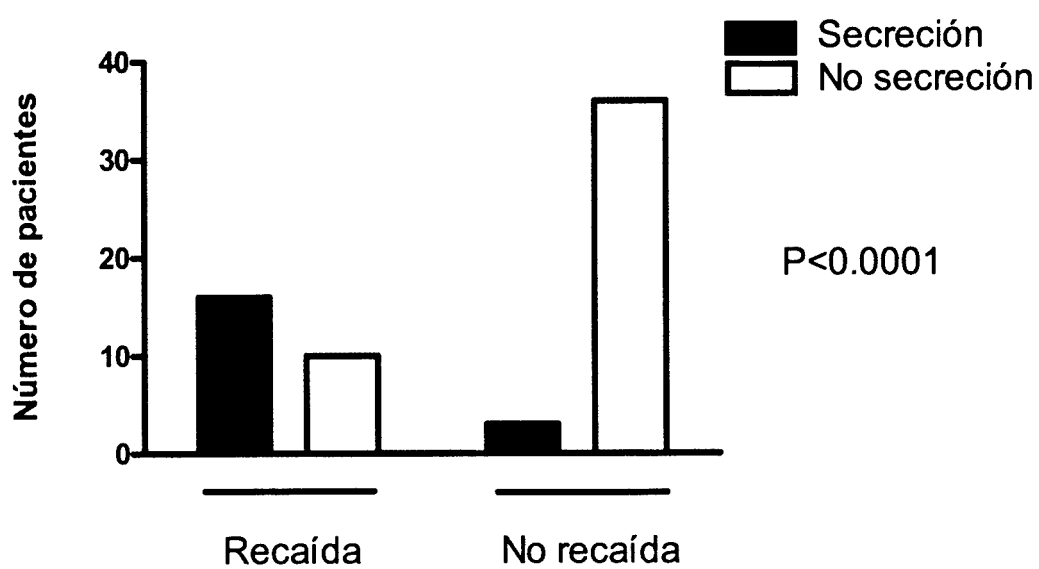
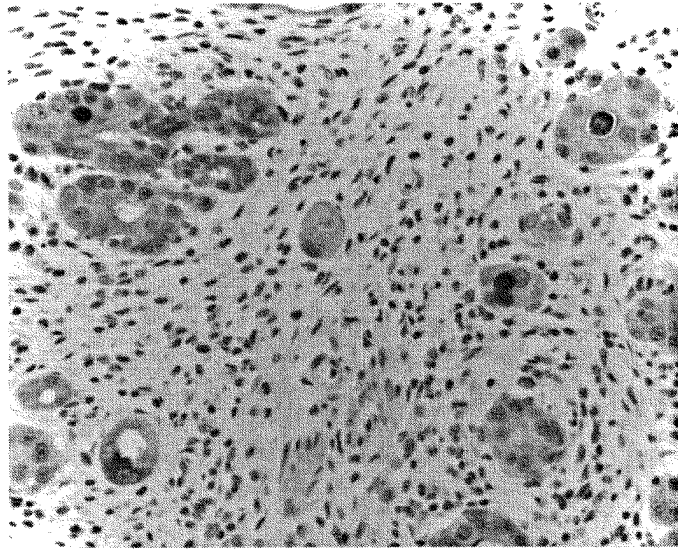
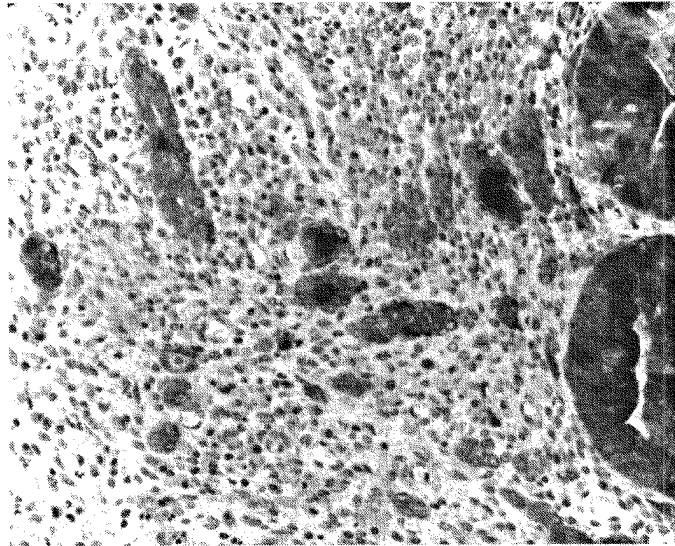


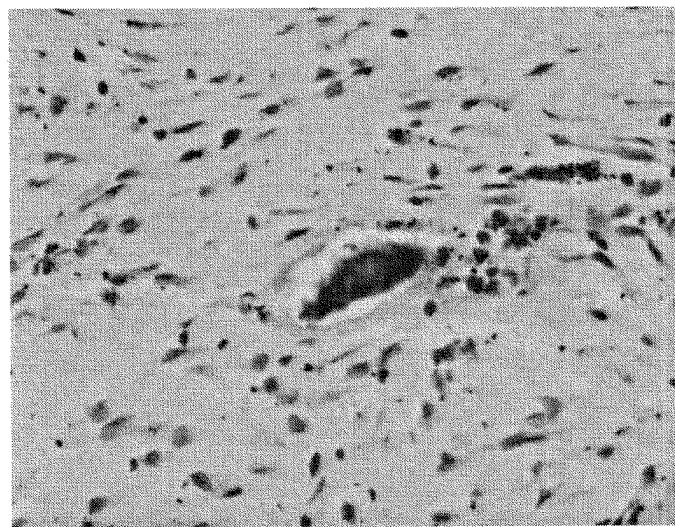
FIGURA 2



A



B



C

FIGURA 3



OFICINA ESPAÑOLA DE
PATENTES Y MARCAS

ESPAÑA

① ES 2 332 167

② Nº de solicitud: 200703230

③ Fecha de presentación de la solicitud: **04.12.2007**

④ Fecha de prioridad:

INFORME SOBRE EL ESTADO DE LA TÉCNICA

⑤ **Int. Cl.:** Ver hoja adicional

DOCUMENTOS RELEVANTES

| Categoría | ⑥ Documentos citados | Reivindicaciones afectadas |
|-----------|---|----------------------------|
| X | WO 2005013802 A2 (CHIRON CORPORATION) 17.02.2005, todo el documento. | 1-6,12-14 |
| X | GARCÍA ALFONSO P. et al., "Tratamiento paliativo del cáncer colorrectal" Cir Esp (2003), Vol. 73, N.º. 1, páginas 46-51, artículo 51.581; [Recuperado el 01.03.2009] Recuperado de Internet <URL: http://www.cirugest.com/htm/revisiones/cir15-14/15-14-20.pdf > | 6-14 |

Categoría de los documentos citados

X: de particular relevancia

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

A: refleja el estado de la técnica

O: referido a divulgación no escrita

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

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

El presente informe ha sido realizado

para todas las reivindicaciones

para las reivindicaciones nº:

Fecha de realización del informe

13.01.2010

Examinador

A. García Coca

Página

1/4

CLASIFICACIÓN DEL OBJETO DE LA SOLICITUD

C12Q 1/68 (2006.01)

A61B 5/00 (2006.01)

G01N 33/50 (2006.01)

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

C12Q, A61B, G01N

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

INVENES, EPODOC

Fecha de Realización de la Opinión Escrita: 13.01.2010

Declaración

| | | |
|--|-----------------------|-----------|
| Novedad (Art. 6.1 LP 11/1986) | Reivindicaciones | SÍ |
| | Reivindicaciones 1-14 | NO |
| Actividad inventiva (Art. 8.1 LP 11/1986) | Reivindicaciones | SÍ |
| | Reivindicaciones 1-14 | NO |

Se considera que la solicitud cumple con el requisito de **aplicación industrial**. Este requisito fue evaluado durante la fase de examen formal y técnico de la solicitud (Artículo 31.2 Ley 11/1986).

Base de la Opinión:

La presente opinión se ha realizado sobre la base de la solicitud de patente tal y como ha sido publicada.

1. Documentos considerados:

A continuación se relacionan los documentos pertenecientes al estado de la técnica tomados en consideración para la realización de esta opinión.

| Documento | Número Publicación o Identificación | Fecha Publicación |
|-----------|-------------------------------------|-------------------|
| D01 | WO 2005/013802 A2 | 17.02.2005 |
| D02 | GARCÍA ALFONSO P. et al. | 2003 |

2. Declaración motivada según los artículos 29.6 y 29.7 del Reglamento de ejecución de la Ley 11/1986, de 20 de marzo, de patentes sobre la novedad y la actividad inventiva; citas y explicaciones en apoyo de esta declaración

El objeto de la invención, tal y como se recoge en las reivindicaciones 1-14, es un método in vitro para pronosticar la evolución de un sujeto diagnosticado con cáncer colorrectal tras la administración de una terapia, para monitorizar el efecto de una terapia administrada o para diseñar una terapia personalizada a un sujeto diagnosticado con cáncer colorrectal. El método se basa en la cuantificación de los niveles de expresión del gen TFF3 o de la proteína codificada por dicho gen, donde un aumento de dichos niveles respecto a los observados antes de la terapia es indicativo de una peor evolución del sujeto.

NOVEDAD y ACTIVIDAD INVENTIVA

El documento D01 describe métodos para evaluar la progresión del cáncer en un paciente, basándose en la comparación de los niveles de expresión de TFF3 medidos en un primer momento y los tomados en un tiempo posterior en un mismo paciente. El incremento de los niveles de expresión es indicativo de una progresión del cáncer, es decir, es indicativo de una peor evolución del paciente (ver párrafos [0020] y [0021]). Este documento divulga el hecho de que el gen TFF3 es un marcador bioquímico que puede ser utilizado para detectar cambios durante la carcinogénesis, para monitorizar la eficacia de varias terapias y de acciones preventivas, así como para evaluar la respuesta clínica a un determinado tratamiento y para clasificar, diagnosticar y tratar diferentes formas y estadios del cáncer, para de esta forma poder establecer el mejor tratamiento para el paciente (ver párrafo [00237]). La cuantificación de los niveles de expresión del gen TFF3 se realizan tanto en muestras de tejido tumoral como en fluidos biológicos mediante distintos métodos(ver párrafos [00248], [00252], [00258] y [00260]).

El documento D02 divulga los tratamientos que se suelen administrar a los pacientes con cáncer colorrectal, entre los que se incluyen aquellos en los que se administran fármacos como oxaliplatino, 5fluoruracilo, raltitrexed, entre otros, y las combinaciones de dichos fármacos.

A la vista de los documentos del estado de la técnica, D01 y D02, la invención, tal y como se recoge en las reivindicaciones 1-14 no es nueva en el sentido del artículo 6.1 de la Ley 11/1986 de Patentes, ni implica actividad inventiva según el artículo y 8.1 de la Ley 11/1986 de Patentes.