

19



OFICINA ESPAÑOLA DE
PATENTES Y MARCAS

ESPAÑA



11 Número de publicación: **2 683 866**

21 Número de solicitud: 201700276

51 Int. Cl.:

C12Q 1/68 (2006.01)

12

PATENTE DE INVENCION CON EXAMEN

B2

22 Fecha de presentación:

28.03.2017

43 Fecha de publicación de la solicitud:

28.09.2018

Fecha de concesión:

01.02.2019

45 Fecha de publicación de la concesión:

08.02.2019

73 Titular/es:

**UNIVERSIDADE DE VIGO (100.0%)
Campus Universitario s/n
36310 Vigo (Pontevedra) ES**

72 Inventor/es:

**MARTÍNEZ ZORZANO, Vicenta Soledad ;
DE CHIARA PRADA , Loretta ;
OTERO ESTÉVEZ , Olalla ;
PÁEZ DE LA CADENA TORTOSA , María y
RODRÍGUEZ BERROCAL , Francisco Javier**

54 Título: **Método no invasivo para el diagnóstico y cribado de cáncer colorrectal y adenomas avanzados en individuos asintomáticos**

57 Resumen:

La invención se refiere al desarrollo de un método in vitro para diagnosticar cáncer colorrectal y adenomas avanzados en individuos asintomáticos, mediante una prueba en un biofluido humano, preferiblemente suero. Consiste en la cuantificación conjunta de las proteínas sCD26 y NDKA mediante inmunoensayos específicos, y del porcentaje de metilación del gen NEUROG1 mediante PCR en tiempo real específica para metilación. La combinación de los tres marcadores mediante regresión logística multivariante, dará lugar a una puntuación calculada de riesgo de cáncer colorrectal o adenomas avanzados, que se compara con un punto de corte establecido. Si la prueba es positiva, se recomienda realizar una colonoscopia confirmatoria. Por el contrario, si el resultado es negativo, se recomienda repetir la prueba en un año. Este método no invasivo constituye una herramienta muy útil para el diagnóstico de cáncer colorrectal y adenomas avanzados para ser empleado en programas de cribado en individuos asintomáticos.

ES 2 683 866 B2

DESCRIPCIÓN

Método no invasivo para el diagnóstico y cribado de cáncer colorrectal y adenomas avanzados en individuos asintomáticos.

5

Sector de la técnica

El sector de la técnica al que hace referencia la invención se encuadra en el ámbito sanitario, específicamente en el de Oncología Digestiva.

10

Antecedentes de la invención

El cáncer colorrectal (CCR) constituye uno de los tumores más frecuentes, representando la segunda causa de muerte por cáncer (Ferlay *et al. Int J Cáncer* 2015, 136:E359-86). La mayoría de los tumores colorrectales surgen a partir de adenomas mediante un proceso de carcinogénesis lento que puede durar décadas (Brenner *et al. Cáncer Epidemiol Biomarkers Prev* 2013, 22:1043-51). Son de especial interés los adenomas avanzados (AA), que son lesiones premalignas. Esto permite que los programas de cribado constituyan una estrategia de prevención muy eficaz para este tipo de tumor.

15

20

La colonoscopia es la prueba de referencia para diagnosticar neoplasia avanzada (NA: CCR o AA), aunque al tratarse de una prueba invasiva, supone una muy baja participación de la población en los programas de cribado (Salas *et al. Cáncer Causes Control* 2014, 25:985-97). Entre los métodos no invasivos destaca el test de sangre oculta en heces inmunológico (TSOHi), con una sensibilidad aceptable para la detección de CCR, pero inadecuada para el diagnóstico de AA, especialmente para las lesiones localizadas en el colon proximal (Chiu *et al. Clin Gastroenterol Hepatol* 2013, 11:832-8; Lin *et al. JAMA* 2016, 315:2576-94). Además, su aceptación es baja, por lo que resulta necesario conseguir nuevos métodos no invasivos para la detección de NA, como es el caso de biomarcadores presentes en suero (Ganepola *et al. World J Gastrointest Oncol* 2014, 6:83-97).

25

30

Las proteínas, como moléculas funcionales de la célula, resultan de interés para comprender la carcinogénesis colorrectal y como dianas de estudio para encontrar nuevos marcadores. En los últimos años se han propuesto muchos marcadores proteicos presentes en suero o plasma, con potencial para el diagnóstico de CCR (Fung *et al. World J Gastroenterol* 2014, 20:888-98; Hundt *et al. Cáncer Epidemiol Biomarkers Prev* 2007, 16:1935-53). Entre los marcadores proteicos destacan las proteínas: antígeno carcinoembrionario (CEA), piruvato quinasa M2 (PKM2), inhibidor de metaloproteínasa 1 (TIMP1), ferritina, galectina-3, proteína de choque térmico 70 (HSP 70), mucina 1 y 4 (MUC1, MUC4), metaloproteínasa de la matriz 9 (MMP9), péptido C reactivo (PCR), autoanticuerpo p53, entre otras (Wilhelmsen *et al. Int J Cáncer* 2017, 140:1436-46; revisado en Shah *et al. Cáncer Epidemiol Biomarkers Prev* 2014, 23:1712-28; revisado en Hundt *et al. Cáncer Epidemiol Biomarkers Prev* 2007, 16:1935- 53). Para estos marcadores se han descrito sensibilidades comprendidas entre 18 y 90% para la detección de cáncer (65-95% de especificidad), aunque su utilidad resulta aún más limitada para la detección de adenomas avanzados (sensibilidad 0-21 %) (Fung *et al. World J Gastroenterol* 2014, 20:888-98; revisado en Hundt *et al. Cancer Epidemiol Biomarkers Prev* 2007, 16:1935-53).

35

40

45

Los autores de esta patente han determinado en estudios previos la utilidad de la proteína CD26 soluble (sCD26) (Cordero *et al. Br J Cancer* 2000, 83:1139-46; De Chiara *et al. BMC Cancer* 2010, 10:333; Otero-Estévez *et al. Br J Cancer* 2015, 112:375-81; Patente P200102631) y la proteína nucleósido difosfato A (NDKA) (Alvarez-Chaver *et al. J Proteomics* 2011, 74:874-886; Otero-Estévez *et al. Sci Rep* 2016, 6:26703) para el diagnóstico de CCR y AA.

50

Los niveles séricos de sCD26 se presentan disminuidos en pacientes con CCR o con AA, en relación con individuos sin neoplasia avanzada (sin hallazgos, con patologías benignas, con adenomas no avanzados), describiéndose una sensibilidad entre 75-90% para la detección de los casos de cáncer (De Chiara *et al. BMC Cancer* 2010, 10:333; Otero-Estévez *et al. Br J Cancer* 2015, 112:375-81). En cuanto a la detección de AA, este marcador experimental alcanza una sensibilidad en torno al 40%, con una especificidad del 75-94%.

En relación a la NDKA, hemos descrito un incremento en la concentración de esta proteína en muestras de suero de pacientes con CCR o con AA. En una cohorte de cribado de más de 500 individuos asintomáticos, la NDKA mostró una sensibilidad del 30% para NA (CCR o AA) con un 85% de especificidad, sugiriendo su utilidad para el cribado de CCR (Otero-Estévez *et al. Sci Rep* 2016, 6:26703).

Por otra parte, en los últimos años la búsqueda de nuevos marcadores no invasivos se ha centrado también en el estudio de la metilación del ADN, que constituye uno de los principales eventos implicados en el origen y progresión de muchas neoplasias (Esteller. *N Engl J Med* 2008, 358:1148-59). En CCR se ha descrito un patrón de hipometilación global del genoma, acompañado de hipermetilación en las regiones promotoras de ciertos genes supresores de tumor. La metilación del ADN consiste en la adición de grupos metilo a residuos de citosina localizados en las llamadas islas CpG, detectándose en una variedad de muestras incluido el suero, por lo que resulta un potencial biomarcador para el CCR (Coppede *etal. World J Gastroenterol* 2014, 20:943- 56).

En la bibliografía se han descrito algunos potenciales marcadores de metilación en suero, tales como los genes *APC*, *hMLH1*, *ALX4*, *TMEFF2*, *NGFR*, *SFRP2*, *CDKN2A/P16*, *TPEF/HPP1* y *RUNX3*, con sensibilidades entre 6-83% y especificidades entre 69-100% para la detección de CCR (revisado en Wang *et al. World J Gastroenterol* 2014, 20:4276-87). Uno de los genes más estudiados es el gen *SEPT9*, para el que se ha desarrollado el ensayo comercial Epi proColon (Epigenomics AG), que detecta *SEPT9* metilado. Este test presenta una sensibilidad entre 48-75 (especificidad 87-91%) para CCR, con una capacidad diagnóstica limitada para identificar AA (Church *et al. Gut* 2014, 63:317-25; Jin *et al. J Gastroenterol Hepatol* 2015, 30:830-3).

La metilación del gen *NEUROG1* ha sido descrita frecuentemente en tejido tumoral colorrectal, por lo que este gen forma parte de algunos de los paneles empleados para clasificar tumores CIMP (fenotipo metilador de islas CpG, de sus siglas en inglés *CpG island methylator phenotype*) (Ogino *et al. Gut* 2006, 55:1000-6; Weisenberger *et al. Nat Genet* 2006, 38:787-93; Patente WO 2006119434 A2). El estado de metilación de *NEUROG1* en suero presenta un 51,9% y 67,1% de sensibilidad para CCR de estadio I y II, respectivamente, con un 80% de especificidad (Herbst *et al. Am J Gastroenterol* 2011, 106:1110-8). Cabe destacar que en dicho trabajo no se evaluó la capacidad diagnóstica de *NEUROG1* en pacientes con AA, cuya detección es de gran interés para programas de cribado.

En resumen, individualmente, ninguno de los marcadores proteicos o de metilación descritos hasta el momento presenta una capacidad diagnóstica adecuada para la detección de CCR y AA, por lo que su utilidad es limitada para un programa de cribado. El uso de una combinación de marcadores (panel de marcadores) resulta más ventajoso, permitiendo maximizar las cualidades de los marcadores individuales. Los inventores de esta patente, tras la evaluación de los marcadores proteicos sCD26 y NDKA, y el marcador de metilación *NEUROG1*, en suero de individuos con CCR y AA, además de un grupo extenso de individuos sin hallazgos, con una gran variedad de patologías benignas (hemorroides, divertículos, pólipos inflamatorios, pólipos hiperplásicos), y adenomas no avanzados, determinaron que la combinación de estos tres marcadores, además de las covariables edad y género, puede resultar de gran utilidad para el diagnóstico de neoplasia avanzada (CCR o AA), para ser empleado en programas de cribado.

Explicación de la invención

5 En un primer aspecto, la presente invención se refiere a la utilización del panel formado por las proteínas sCD26 y NDKA, y el marcador de metilación *NEUROG1*, en muestras de biofluido, como método no invasivo para el diagnóstico tanto de CCR como de AA, para ser empleado en el cribado de esta neoplasia en individuos asintomáticos. Este análisis será de gran ayuda para el clínico ya que le permitirá, en base a una puntuación calculada de riesgo de neoplasia avanzada (CCR o AA) para cada individuo y su comparación con un punto de corte establecido, conocer si el individuo tiene un riesgo incrementado de presentar CCR o AA, con la consiguiente recomendación de someterlo a una colonoscopia para su diagnóstico. Por el contrario, en el caso de los individuos que según la puntuación calculada, no presenten riesgo de NA, el clínico considerará que no es necesario realizar una colonoscopia en ese momento y así evitará que el sujeto sea sometido a una prueba invasiva como la colonoscopia, la cual lleva un riesgo de complicación asociado.

15 En una realización preferida de la invención, dicho cáncer colorrectal (CCR) es el cáncer de colon y/o cáncer de recto, que puede encontrarse en estadio 0 (carcinoma *in situ*), estadio I, estadio II, estadio III y/o estadio IV, y en donde los adenomas avanzados (AA) se refieren a adenomas de al menos 10 mm de tamaño, con componente vellosa en su histología o alto grado de displasia.

20 En otra realización preferida de la invención, el biofluido es sangre, plasma o suero. En una realización más preferida es suero.

25 En un segundo aspecto, la presente invención se refiere a un método para el diagnóstico de cáncer colorrectal y de adenomas avanzados, caracterizado por comprender los siguientes pasos:

- 30 a) Obtención de un biofluido de individuos asintomáticos.
- b) Cuantificación de los niveles de sCD26 y NDKA en el biofluido mediante ensayos inmunoenzimáticos específicos siguiendo la técnica de ELISA tipo sándwich y cuantificación del porcentaje de metilación relativo normalizado de *NEUROG1* mediante la técnica de PCR en tiempo real específica para metilación (MS- qPCR).
- 35 c) Obtención de la puntuación calculada de riesgo de cáncer colorrectal o adenomas avanzados (P) que consiste en el cálculo de regresión logística multivariante de la combinación de los marcadores sCD26, NDKA y *NEUROG1*, incluyendo las covariables sexo y edad de los individuos.

40 En una realización preferida, la cuantificación del porcentaje de metilación de *NEUROG1* comprende a su vez las siguientes etapas: a) extracción de ADN a partir del biofluido, b) modificación del ADN con bisulfito de sodio, c) preamplificación mediante PCR convencional empleando los cebadores SEQ ID NO 1 y 2, d) PCR en tiempo real específica para metilación de *NEUROG1* (SEQ ID NO 3-5), obteniendo para cada individuo un porcentaje de metilación relativo normalizado (PMRN) siguiendo esta fórmula:

$$45 \text{ PMRN}_{\text{NEUROG1}}(\%) = \frac{\text{PMR no normalizado}_{\text{NEUROG1}}}{\text{Cantidad de ADN relativa (ACTB)}} \times 100$$

50 donde PMRN es el porcentaje de metilación relativo normalizado; PMR es el porcentaje de metilación relativo de *NEUROG1*; *ACTB* se refiere al gen de referencia de la beta-actina para normalizar la cantidad de ADN (SEQ ID NO 6-8).

5 Los inventores de esta patente han observado que la media de los niveles de sCD26 medidos en suero se encuentran considerablemente disminuidos en individuos con NA ($404,3 \pm 210,1$ ng/mL) en relación con los individuos sin neoplasia ($553,4 \pm 192,0$ ng/mL), que incluyen aquellos sin hallazgos en la colonoscopia, con patologías benignas (hemorroides, divertículos, pólipos inflamatorios, pólipos hiperplásicos), o con adenomas no avanzados. En cuanto a la proteína NDKA, la media de la concentración sérica resultó superior en individuos con NA en comparación con los individuos sin neoplasia ($67,97 \pm 25,36$ vs $58,14 \pm 18,11$ pg/mL). El porcentaje de metilación en el gen *NEUROG1* también se encontró ampliamente incrementado en el grupo de individuos con NA ($10,92 \pm 27,79\%$), mientras que en individuos sin neoplasia permaneció bajo ($1,96 \pm 10,39\%$). En relación con la capacidad de discriminar individuos con NA del resto de la población, las proteínas sCD26, NDKA y el marcador de metilación *NEUROG1* mostraron un valor de área bajo la curva (AUC) de 0,748; 0,612 y 0,674, respectivamente.

15 En una realización preferida, el análisis conjunto de los 3 marcadores (panel), combinados mediante regresión logística multivariante, incrementa la capacidad diagnóstica para la detección de CCR y AA. La regla de clasificación (modelo de regresión) obtenida con la combinación de los 3 marcadores, además de las covariables sexo y edad, presenta un valor de AUC de 0,810 (IC 95%: 0,773-0,844) para detectar NA (CCR o AA). Por tanto, en base a un punto de corte de referencia establecido para P, se determina si el resultado de la prueba es positivo ($>$ al punto de corte; riesgo incrementado de presentar CCR o AA) o negativo (\leq al punto de corte). En caso de que la prueba resulte positiva, será conveniente realizar una prueba adicional de diagnóstico consistente en una sigmoidoscopia, una colonoscopia, una colonoscopia virtual o un test de diagnóstico por imagen, preferentemente una colonoscopia, para confirmar la presencia de CCR o AA. Por el contrario, si la prueba resulta negativa, por el momento no será necesario someter al individuo a una colonoscopia invasiva. Sin embargo, sería aconsejable repetir la prueba al cabo de 1 año para evaluar de nuevo el riesgo de NA.

25 En resumen, el procedimiento objeto de esta invención supone para el individuo una simple extracción de sangre, lo que resultará en una mayor participación de la población en programas de cribado para neoplasia colorrectal, si se compara con la colonoscopia directa o con el TSOHi. El incremento en la participación conseguirá aumentar la eficacia de los programas de cribado.

35 **Realización preferente de la invención**

Recogida y extracción de las muestras de biofluido

40 El método que proponemos comienza con la obtención de una muestra de sangre en individuos asintomáticos. El proceso para su obtención es muy simple, lo que tendrá como consecuencia que un mayor número de individuos accedan a participar en el cribado de esta neoplasia.

45 Las muestras de sangre se recogen en tubos con activador de coagulación, obteniéndose después de la centrifugación el suero, que será alícuotado (al menos 3 alícuotas) y almacenado a -20°C . Una de las alícuotas se empleará para determinar los niveles de sCD26, otra para determinar los niveles de NDKA, y una tercera para cuantificar el porcentaje de metilación de *NEUROG1*.

Cuantificación de los niveles de sCD26 y NDKA mediante inmunoensayo ELISA tipo sándwich

50 Los niveles circulantes de las proteínas sCD26 y NDKA se determinarán mediante ELISA empleando los ensayos comerciales *Human CD26 Platinum ELISA* de eBioscience, y el *Human Nucleoside Diphosphate Kinase A (NME1) ELISA* de Cusabio, respectivamente. Estos ensayos proporcionan placas de 96 pocillos que están recubiertas con un anticuerpo específico, además

de todos los reactivos necesarios para su ejecución, siguiendo el protocolo recomendado por el fabricante.

5 Para el protocolo general de ambos ensayos, se emplea una muestra de suero diluida o sin diluir, que se añade a la placa de ELISA y que se incuba para permitir la unión de la proteína, bien sea sCD26 o NDKA, a su anticuerpo específico. A continuación, se añade un segundo anticuerpo conjugado con biotina, que reconoce la proteína y completa el sándwich. La cuantificación de la proteína se realiza por espectrometría, mediante el acoplamiento de una
10 reacción enzimática colorimétrica, añadiendo a la placa estreptavidina conjugada con peroxidasa, seguida del sustrato de la enzima peroxidasa, obteniéndose un producto coloreado. La reacción se detiene finalmente añadiendo a cada pocillo una sustancia ácida, y se procede a medir en un espectrofotómetro la absorbancia a 450 nm, en el caso del ensayo para el sCD26, y a 450 y 570 nm en el caso del ensayo para la NDKA.

15 En ambos ensayos se incluyen estándares de sCD26 o NDKA de concentración conocida, para elaborar la curva estándar respectiva, que se emplea para calcular la concentración de la proteína.

20 *Cuantificación del porcentaje de metilación de NEUROG1*

La cuantificación de la metilación incluye las siguientes etapas: extracción de ADN a partir de suero, modificación del ADN con bisulfito de sodio, preamplificación del ADN modificado mediante PCR convencional, y cuantificación de la metilación de *NEUROG1* empleando una PCR en tiempo real específica para metilación (MS-qPCR).

25 Para el aislamiento del ADN libre se emplean, al menos, 500 µL de suero de cada individuo. Se utiliza el kit comercial *QIAamp DNA Mini kit* (Qiagen) siguiendo el protocolo del fabricante. El ADN aislado se conserva a -20°C hasta su uso. Una vez aislado el ADN de cada individuo, se realiza la modificación del ADN con bisulfito de sodio empleando el kit comercial *EZ DNA Methylation-Direct™ Kit* (Zymo Research Corp.). Esta modificación permitirá distinguir las citosinas metiladas de las citosinas no metiladas, ya que las primeras permanecerán intactas, mientras que las segundas se modificarán a uracilos y serán detectadas como timinas tras la PCR. El ADN modificado con bisulfito se conserva a -80°C hasta su uso. También se tratan con bisulfito de sodio los controles metilado y no metilado, que se preparan empleando el suero de
30 un donante sano, a partir del cual se extrae ADN. Para obtener el control metilado, el ADN se trata con una metiltransferasa que reconoce de forma específica la secuencia 5'-CG-3' y añade grupos metilo (CH₃-) en los residuos de citosina de las dobles hebras. Como donador de grupos metilo se utiliza S-adenosilmetionina. Para obtener el control no metilado se emplea el mismo ADN del donante sano, sin tratar con la metiltransferasa.

40 El primer paso para llevar a cabo la cuantificación de la metilación del gen *NEUROG1* consiste en una PCR convencional (preamplificación), empleando cebadores externos a la región de interés SEQ ID NO 1 y 2 (Tabla 1), que amplifican independientemente de su estado de metilación. Para la PCR se usa el ADN modificado con bisulfito de sodio, tanto de las muestras como del control metilado y no metilado, además del control negativo (agua). El amplicón de
45 interés se amplifica bajo unas condiciones restrictivas, en presencia de los cebadores externos SEQ ID NO 1 y 2, tampón de PCR, desoxirribonucleótidos trifosfato (dNTPs) y Taq polimerasa.

50 A continuación, se realiza la cuantificación de la metilación del gen *NEUROG1* por MS-qPCR empleando como ADN molde una dilución de la pre-amplificación realizada en el paso anterior. La qPCR se realiza en condiciones restrictivas, en presencia de los cebadores específicos para la secuencia metilada SEQ ID NO 3 y 4, y la sonda SEQ ID 5, descritos en la Tabla 1, y el tampón de reacción. En cada placa se incluyen, además de las muestras, el control metilado, el control no metilado y los controles negativos, por triplicado.

Tabla 1. Secuencia de cebadores para *NEUROG1* empleados en la invención.

SEQ ID NO	Cebadores PCR y MS-qPCR	Secuencia (5'-3')
1	NEUROG1 Cebador externo directo PCR	GGTAGTTAGGGTGAATGGAG
2	NEUROG1 Cebador externo inverso PCR	AAACCCCTAACCAACTTAACCC
3	NEUROG1 Cebador directo MS-qPCR	GGGAGGTYGTTATCGTTTT
4	NEUROG1 Cebador inverso MS-qPCR	CGACGCCGCCGATTAA
5	NEUROG1 Sonda MS-qPCR	5'-/6-FAM/TTAATTCGG/ZEN/AGTGTGTTTCGTAATTA/3IABkFQ/-3'

- 5 Con la MS-qPCR se obtiene para cada muestra un valor de ciclo de cuantificación (Cq) para la metilación del gen *NEUROG1*. Para determinar el porcentaje de metilación relativo de *NEUROG1* sin normalizar, se extrapola el valor de Cq en la recta patrón elaborada para este gen. La recta patrón del porcentaje de metilación de *NEUROG1* se prepara empleando diluciones de la preamplificación del control metilado, considerado como 100% metilado.
- 10 Para calcular el porcentaje de metilación relativo normalizado (PMRN) se emplea el gen de la beta-actina (*ACTB*), específicamente un fragmento que no es susceptible de metilación, a partir del cual se obtiene una cantidad relativa de ADN. Al igual que para *NEUROG1*, en el primer paso se realiza una preamplificación empleando los cebadores SEQ ID NO 6 y 7 (PCR convencional), y en el segundo paso la qPCR usando una dilución de la PCR del primer paso
- 15 con los mismos cebadores SEQ ID NO 6 y 7, y la sonda SEQ ID 8. Las condiciones tanto de la PCR como de la qPCR son restrictivas, y se utilizan los cebadores para *ACTB* presentados en la Tabla 2 (SEQ ID NO 6-8). En estas reacciones se incluyen las muestras, control metilado y no metilado, y controles negativos. Con la qPCR se obtiene para cada muestra un valor de Cq para el gen *ACTB*.
- 20 Para determinar la cantidad relativa de ADN se extrapola el valor de Cq en la recta patrón elaborada para este gen empleando diluciones de la preamplificación del control metilado, que consideramos como 100% de cantidad.
- 25 Finalmente, para obtener el porcentaje de metilación relativo normalizado (PMRN) de *NEUROG1* para cada muestra, se relacionan los valores obtenidos para cada uno de los genes aplicando la siguiente fórmula:

$$\text{PMRN}_{\text{NEUROG1}}(\%) = \frac{\text{PRM no normalizado}_{\text{NEUROG1}}}{\text{Cantidad de ADN relativa (ACTB)}} \times 100$$

- 30 *Obtención de la puntuación calculada de riesgo de cáncer colorrectal o adenomas avanzados (P)*
Una vez cuantificado en suero, por un lado, la concentración de sCD26 y NDKA, y por otro, el porcentaje de metilación de *NEUROG1*, los tres marcadores se combinan mediante regresión

logística multivariante, incluyendo además las covariables sexo y edad de los individuos. Mediante la aplicación de la siguiente fórmula se obtiene para cada individuo una puntuación calculada de riesgo de CCR o AA (P):

$$P = \frac{e^{(2,821-4,604 \cdot \log(sCD26)+2,759 \cdot \log(NDKA)+1,567 \cdot \log(NEUROG1)+0,841 \cdot \text{género}+0,023 \cdot \text{edad})}}{1 + e^{(2,821-4,604 \cdot \log(sCD26)+2,759 \cdot \log(NDKA)+1,567 \cdot \log(NEUROG1)+0,841 \cdot \text{género}+0,023 \cdot \text{edad})}}$$

Como se observa en la fórmula, para cada individuo se suma al valor de la constante del modelo (2,821) el producto de multiplicar el valor (transformado logarítmicamente) de cada marcador sérico cuantificado en dicho individuo por el coeficiente de regresión de ese marcador (4,604 para sCD26; 2,759 para NDKA; 1,567 para *NEUROG1*). Además, se suma el coeficiente de regresión de la variable género (0,841), que se multiplica por 1 si se trata de un hombre, o por 0 si es una mujer. Finalmente, se suma el valor resultante de multiplicar la edad (en años) del sujeto por el coeficiente de regresión obtenido para esa variable (0,023). De esta manera, se obtiene una puntuación *P* para cada individuo.

En base a un punto de corte de referencia establecido para *P*, se determina si el resultado de la prueba es positivo (> al punto de corte; riesgo incrementado de presentar CCR o AA) o negativo (≤ al punto de corte). En caso de que la prueba resulte positiva, será conveniente realizar una colonoscopia diagnóstica para confirmar la presencia de CCR o AA. Por el contrario, si la prueba resulta negativa, por el momento no será necesario someter al individuo a una colonoscopia invasiva. Sin embargo, sería aconsejable repetir la prueba al cabo de 1 año para evaluar de nuevo el riesgo de NA.

Empleando un punto de corte para $P \geq 0,1934$, el panel de marcadores séricos objeto de esta patente, presenta una sensibilidad de 52,63% para la detección de NA, y del 50,94% para AA, con una especificidad del 90,16%.

Tabla 2. Secuencia de cebadores para el gen *ACTB* para normalizar el porcentaje de metilación relativo de *NEUROG1*:

SEQ ID NO	Cebadores PCR y qPCR	Secuencia (5'-3')
6	ACTB Cebador directo PCR/qPCR	TCCCTTAAAAATTACAAAAACCACA
7	ACTB Cebador inverso PCR/qPCR	TGGTGATGGAGGAGGTTTAG
8	ACTB Sonda qPCR	5'-/VIC/ACCACCACCCAACACACAATAACAAACACA/MGBNFQ/-3'

El interés de esta invención radica en la distinción de individuos asintomáticos con CCR o AA, de individuos sin neoplasia, empleando una prueba no invasiva que supone una simple e indolora extracción de sangre, a partir de la cual se obtiene el suero. Aplicando el panel de marcadores compuesto por las proteínas sCD26, NDKA, y el marcador de metilación *NEUROG1*, además de las covariables sexo y edad, se obtendrá una puntuación calculada de riesgo de NA para cada individuo, que se comparará con la de un punto de corte establecido. Dado el carácter no invasivo de esta prueba, se conseguirá una mayor participación de la población en programas de cribado para neoplasia colorrectal si la comparamos con la colonoscopia directa o con el TSOHi que, a pesar de ser no invasivo este último, resulta una

prueba incómoda y poco aceptada por la población debido a la recolección de las heces. Está claro que una mayor aceptación por parte de la población de la prueba ofrecida para el cribado tendrá como consecuencia una mayor eficacia del cribado.

REIVINDICACIONES

- 5 1. Método *in vitro* para el diagnóstico y cribado de cáncer colorrectal y de adenomas avanzados mediante una prueba en un biofluido humano caracterizado por comprender la determinación en conjunto de los niveles de las proteínas sCD26 y NDKA, y del porcentaje de metilación del gen *NEUROG1*, en un individuo.
- 10 2. Método según reivindicación 1, en donde el diagnóstico del cáncer colorrectal incluye cáncer colorrectal de estadio 0 carcinoma *in situ*, estadio I, estadio II, estadio III y/o estadio IV, y en donde los adenomas avanzados se refieren a adenomas de tamaño igual o superior a 10 mm, con componente vellosos en su histología, o alto grado de displasia.
- 15 3. Método según las reivindicaciones 1 a 2, en donde el individuo es un sujeto asintomático.
4. Método para el diagnóstico de cáncer colorrectal y de adenomas avanzados mediante una prueba, según reivindicaciones 1 a 3, caracterizado por comprender los siguientes pasos:
- a) Obtención de un biofluido de individuos asintomáticos.
- 20 b) Cuantificación de los niveles de sCD26 y NDKA en el biofluido mediante ensayos inmunoenzimáticos específicos siguiendo la técnica de ELISA tipo sándwich, y cuantificación del porcentaje de metilación relativo normalizado de *NEUROG1* mediante la técnica de PCR en tiempo real específica para metilación (MS- qPCR).
- 25 c) Obtención de la puntuación calculada de riesgo de cáncer colorrectal o adenomas avanzados (*P*) para cada individuo, que consiste en el cálculo mediante regresión logística multivariante de la combinación de los marcadores sCD26, NDKA y *NEUROG1*, y las covariables sexo y edad de los individuos, según la fórmula:

$$30 \quad P = \frac{e^{(2,821-4,604 \cdot sCD26+2,759 \cdot NDKA+1,567 \cdot NEUROG1+0,841 \cdot \text{género}+0,023 \cdot \text{edad})}}{1 + e^{(2,821-4,604 \cdot sCD26+2,759 \cdot NDKA+1,567 \cdot NEUROG1+0,841 \cdot \text{género}+0,023 \cdot \text{edad})}}$$

- 35 donde para cada individuo se suma al valor de la constante del modelo 2,821 el producto de multiplicar el valor, transformado logarítmicamente, de cada marcador sérico cuantificado en dicho individuo por el coeficiente de regresión de ese marcador, 4,604 para el sCD26, 2,759 para la NDKA, 1,567 para *NEUROG1*; el coeficiente de regresión de la variable género 0,841, que se multiplica por 1 si se trata de un hombre, o por 0 si es una mujer; y se suma el valor resultante de multiplicar la edad en años del sujeto por el coeficiente de regresión obtenido para esa variable 0,023.
- 40 5. Método según reivindicación 4, donde la cuantificación del porcentaje de metilación relativo normalizado de *NEUROG1* comprende a su vez las siguientes etapas: a) extracción de ADN a partir del biofluido, b) modificación del ADN con bisulfito de sodio, c) preamplificación mediante PCR convencional, d) PCR en tiempo real específica para metilación de *NEUROG1*, obteniendo para cada individuo un porcentaje de metilación relativo normalizado (PMRN) siguiendo la siguiente fórmula:
- 45

$$\text{PMRN}_{NEUROG1}(\%) = \frac{\text{PRM no normalizado}_{NEUROG1}}{\text{Cantidad de ADN relativa (ACTB)}} \times 100$$

Donde PMRN es el porcentaje de metilación relativo normalizado; PMR es el porcentaje de metilación relativo de *NEUROG1*; *ACTB* se refiere al gen de referencia de la beta-actina para normalizar la cantidad de ADN.

- 5 6. Método según las reivindicaciones 4 a 5, en donde el biofluido es sangre, suero o plasma, preferentemente suero.
- 10 7. Método según reivindicación 4, caracterizado por que la puntuación calculada de riesgo de cáncer colorrectal o adenomas avanzados para cada individuo (*P*) es comparada con un punto de corte de referencia, de manera que una puntuación mayor al punto de corte se considera una prueba positiva, mientras que una puntuación menor o igual al punto de corte se considera una prueba negativa.
- 15 8. Método según cualquiera de las reivindicaciones 4 a 7 que comprende además uno o más medios de diagnóstico consistente en una sigmoidoscopia, una colonoscopia, una colonoscopia virtual o un test de diagnóstico por imagen, preferentemente una colonoscopia, en caso de un resultado positivo en la prueba.
- 20 9. Método según cualquiera de las reivindicaciones 4 a 7, caracterizado por que comprende la repetición de la prueba en un plazo recomendable de un año, en caso de un resultado negativo en la prueba.
- 25 10. Kit que consta de los medios necesarios para llevar a cabo el método de cualquiera de las reivindicaciones 1 a 9 en donde dicho kit comprende los elementos esenciales que permitan la cuantificación del porcentaje de metilación de *NEUROG1* como los cebadores SEQ ID NO 1 y 2 para la PCR convencional, los cebadores SEQ ID NO 3 y 4, y sonda SEQ ID NO 5 para la PCR en tiempo real específica para metilación del gen *NEUROG1*, además de los cebadores SEQ ID NO 6 y 7, y la sonda SEQ ID NO 8 correspondientes al gen de referencia *ACTB* para normalizar el porcentaje de metilación de *NEUROG1*.

LISTADO DE SECUENCIAS

<110> Universidade de Vigo

<120> Método no invasivo para el diagnóstico de cáncer colorrectal y adenomas avanzados en individuos asintomáticos

<140> ESP201700276

<141> 2017-03-28

<160> 8

<170> BiSSAP 1.3.6

<210> 1

<211> 20

<212> DNA

<213> Artificial Sequence

<220>

<223> Cebador. ADN modificado con bisulfito de sodio.

<400> 1

ggtagttagg gtgaatggag

20

<210> 2

<211> 23

<212> DNA

<213> Artificial Sequence

<220>

<223> Cebador. ADN modificado con bisulfito de sodio.

<400> 2

aaacccccta accaacttaa ccc

23

<210> 3

<211> 20

<212> DNA

<213> Artificial Sequence

<220>

<223> Cebador. ADN modificado con bisulfito de sodio.

<400> 3

gggaggygt tatcgttttt

20

<210> 4
<211> 16
<212> DNA
<213> Artificial Sequence

<220>
<223> Cebador. ADN modificado con bisulfito de sodio.

<400> 4
cgacgccgcc gattaa 16

<210> 5
<211> 25
<212> DNA
<213> Artificial Sequence

<220>
<223> Sonda. ADN modificado con bisulfito de sodio.

<400> 5
ttaattcgga gtgtgttcgt aatta 25

<210> 6
<211> 25
<212> DNA
<213> Artificial Sequence

<220>
<223> Cebador. ADN modificado con bisulfito de sodio.

<400> 6
tcccttaaaa atacaaaaa ccaca 25

<210> 7
<211> 20
<212> DNA
<213> Artificial Sequence

<220>
<223> Cebador. ADN modificado con bisulfito de sodio.

<400> 7
tggtgatgga ggaggttag 20

<210> 8

<211> 30

<212> DNA

<213> Artificial Sequence

<220>

<223> Sonda. ADN modificado con bisulfito de sodio.

<400> 8

accaccaccc aacacacaat acaaacaca

30



- ②¹ N.º solicitud: 201700276
 ②² Fecha de presentación de la solicitud: 28.03.2017
 ③² Fecha de prioridad:

INFORME SOBRE EL ESTADO DE LA TECNICA

⑤¹ Int. Cl.: **C12Q1/68** (2006.01)

DOCUMENTOS RELEVANTES

Categoría	⑤ ⁶ Documentos citados	Reivindicaciones afectadas
A	Ng L. et al. BIOMARKERS FOR PREDICTING FUTURE METASTASIS OF HUMAN GASTROINTESTINAL TUMORS. Cell. Mol. Life Sci, 2013, Vol. 70, Páginas 3631-3656. (Todo el documento)	1-10
A	Otero-Estévez, O. et al. EVALUATION OF SERUM NUCLEOSIDE DIPHOSPHATE KINASE A FOR THE DETECTION OF COLORECTAL CANCER. Sci. Rep., 25/05/2016, Vol. 6, N° 26703. (Todo el documento)	1-10
A	De Chiara L. et al. SERUM CD26 IS RELATED TO HISTOPATHOLOGICAL POLYP TRAITS AND BEHAVES AS A MARKER FOR COLORECTAL CANCER AND ADVANCED ADENOMAS. Cancer, 28/06/2010, Vol. 10, N° 333. (Todo el documento)	1-10
A	Herbst A. et al. METHYLATION OF NEUROG1 IN SERUM IS A SENSITIVE MARKER FOR THE DETECTION OF EARLY COLORECTAL CANCER. Am J Gastroenterol, 15/02/2011, Vol. 106, N° 6, Páginas 1110-8. (Todo el documento)	1-10

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 n°:

Fecha de realización del informe
18.12.2017

Examinador
M. Cumbreño Galindo

Página
1/4

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

C12Q

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

INVENES, EPODOC, WPI, MEDLINE, NPL, EMBASE, BIOSIS, EBI

Fecha de Realización de la Opinión Escrita: 18.12.2017

Declaración

Novedad (Art. 6.1 LP 11/1986)	Reivindicaciones 1-10	SI
	Reivindicaciones	NO
Actividad inventiva (Art. 8.1 LP11/1986)	Reivindicaciones 1-10	SI
	Reivindicaciones	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 se publica.

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	Ng L. et al. Cell. Mol. Life Sci, Vol. 70, Páginas 3631-3656	2013
D02	Otero-Estévez, O. et al. Sci. Rep., Vol. 6, N° 26703	25.05.2016
D03	De Chiara L. et al. Cancer, Vol. 10, N° 333	28.06.2010
D04	Herbst A. et al. Am J Gastroenterol, Vol. 106, N° 6, Páginas 1110-8	15.02.2011

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

D01 resume los hallazgos sobre biomarcadores potenciales en cánceres gastrointestinales. También discute cómo ciertos biomarcadores están asociados con el microambiente tumoral que favorece la metástasis del cáncer. Entre los biomarcadores asociados con cáncer colorrectal se encuentran CD26 y NM23-H1.

D02 encuentra que la NDKA sérica está elevada en pacientes con cáncer colorrectal y también en adenomas avanzados.

D03 muestra que la medición de sCD26 en muestras de sangre constituye un ensayo no invasivo y razonablemente sensible que podría combinarse con otros, como la prueba de sangre oculta en heces, para el diagnóstico precoz y el cribado de cáncer colorrectal y adenomas avanzados.

D04 analiza el estado de metilación de un panel de genes con el fin de identificar marcadores de cáncer colorrectal en muestras de sangre. La metilación del gen NEUROG1 se encuentra con frecuencia en el suero de pacientes con cáncer colorrectal independientemente de la etapa del tumor. Así pues, la detección cuantitativa de la metilación del ADN NEUROG1 en suero es un enfoque adecuado para la detección no invasiva de cáncer colorrectal asintomático.

NOVEDAD (ART. 6.1 LP 11/1986) Y ACTIVIDAD INVENTIVA (ART. 8.1 LP11/1986)

En el estado de la técnica es perfectamente conocido el análisis, por separado, de los niveles de las proteínas sCD26 y NDKA, y del porcentaje de metilación del gen NEUROG1, como método de diagnóstico de cáncer colorrectal y de adenomas avanzados. Incluso existen publicaciones (D01) en las que aparecen dos de estos tres biomarcadores asociándolos con cáncer colorrectal. Sin embargo, en la documentación y bases de datos que han sido consultadas no se ha encontrado ninguna referencia a que se lleve a cabo tal diagnóstico mediante el análisis simultáneo de los tres biomarcadores, ni el análisis combinado de los mismos aplicando la fórmula objeto de la reivindicación 4. Por tanto, se considera que las reivindicaciones 1-10 son nuevas y presentan actividad inventiva.