

19



OFICINA ESPAÑOLA DE
PATENTES Y MARCAS

ESPAÑA



11 Número de publicación: **2 972 307**

51 Int. Cl.:

C12Q 1/68

(2008.01)

12

TRADUCCIÓN DE PATENTE EUROPEA

T3

86 Fecha de presentación y número de la solicitud internacional: **15.04.2020 PCT/EP2020/060517**

87 Fecha y número de publicación internacional: **22.10.2020 WO20212378**

96 Fecha de presentación y número de la solicitud europea: **15.04.2020 E 20723791 (8)**

97 Fecha y número de publicación de la concesión europea: **06.12.2023 EP 3956464**

54 Título: **Método in vitro para el diagnóstico o pronóstico del cáncer colorrectal o un estadio precanceroso del mismo**

30 Prioridad:

15.04.2019 EP 19382290

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

12.06.2024

73 Titular/es:

**SERVIZO GALEGO DE SAÚDE (50.0%)
Edificio Administrativo de San Lázaro s/n
15703 Santiago de Compostela, A Coruña, ES y
FUNDACIÓN INSTITUTO DE INVESTIGACIÓN
SANITARIA DE SANTIAGO DE COMPOSTELA
(50.0%)**

72 Inventor/es:

**DÍAZ LAGARES, ÁNGEL;
LÓPEZ LÓPEZ, RAFAEL;
CRUJEIRAS MARTÍNEZ, ANA BELÉN y
RODRÍGUEZ CASANOVA, AITOR**

74 Agente/Representante:

MENDIGUTÍA GÓMEZ, María Manuela

Observaciones:

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

ES 2 972 307 T3

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

DESCRIPCIÓN

Método in vitro para el diagnóstico o pronóstico del cáncer colorrectal o un estadio precanceroso del mismo

Campo de la invención

5 La presente invención se refiere al campo médico. Particularmente, la presente invención se refiere a un método in vitro para el diagnóstico y/o pronóstico del cáncer colorrectal (CCR) y/o un estadio precanceroso del mismo. El método de la invención comprende la determinación del estado de metilación del gen LINC00473, preferiblemente en una biopsia líquida obtenida del paciente, donde un mayor nivel de metilación del gen LINC00473 con respecto a un nivel de control de referencia establecido, es indicativo de la presencia de cáncer colorrectal, un estadio precanceroso del mismo y/o de mal pronóstico de la enfermedad.

10 Estado de la técnica

15 El CCR, también conocido como cáncer de colon, cáncer de recto o cáncer de intestino, es el desarrollo de cáncer en el colon o el recto (partes del intestino grueso). La gran mayoría de los cánceres colorrectales son adenocarcinomas. Esto se debe a que el colon tiene numerosas glándulas dentro del tejido. Cuando estas glándulas sufren una serie de cambios a nivel genético, proceden de manera predecible a medida que pasan de un cáncer de colon benigno a uno maligno e invasivo. Los adenomas de colon, en particular el adenoma colorrectal (AA) avanzado, son una versión benigna de los adenocarcinomas malignos, pero aún tienen potencial maligno si no se extirpan (generalmente se extirpan debido a su tendencia a volverse malignos y provocar cáncer de colon).

20 El cribado es una forma eficaz de prevenir y disminuir las muertes por cáncer colorrectal y se recomienda a partir de los 50 a los 75 años. La prueba de cribado más conocida y utilizada con mayor frecuencia para el cáncer colorrectal se denomina prueba inmunoquímica fecal (FIT). FIT detecta sangre en las muestras de heces, lo que puede ser un signo de precáncer o cáncer. Si se obtienen resultados anormales, generalmente se recomienda una colonoscopia que le permite al médico observar el interior del colon y el recto para hacer un diagnóstico. Durante la colonoscopia, se pueden extirpar pequeños pólipos si se encuentran. Si se encuentra un pólipo o un tumor grande, se puede realizar una biopsia para comprobar si es canceroso. El gastroenterólogo utiliza una colonoscopia para encontrar y extirpar estos adenomas y pólipos para evitar que sigan adquiriendo cambios genéticos que conducirán a un adenocarcinoma invasivo.

25 Aunque, como se explicó anteriormente, la FIT se utiliza hoy en día para detectar el cáncer colorrectal, es importante señalar que la FIT ofrece una baja sensibilidad para AA, lo que significa que la mayoría de dicho tipo de pacientes pueden clasificarse erróneamente como si no tuvieran la enfermedad. En consecuencia, la FIT no es capaz de identificar adenomas debido a su baja sensibilidad. Además, dado que FIT utiliza muestras de heces, ofrece un bajo cumplimiento. Por otro lado, la colonoscopia es una técnica invasiva donde la complicación más grave generalmente es la perforación gastrointestinal. Además, hoy en día la colonoscopia es un procedimiento que requiere anestesia y los laxantes que normalmente se administran durante la preparación intestinal para la colonoscopia están asociados con varios problemas digestivos. Es importante señalar que los métodos utilizados hoy en día para el cribado de la población general con riesgo de padecer CCR o AA se asocian a una alta tasa de falsos positivos. En consecuencia, hoy en día se realizan una gran cantidad de colonoscopias de seguimiento innecesarias.

30 La presente invención ofrece una solución clara a los problemas citados anteriormente porque se centra en un método in vitro para identificar o cribar sujetos humanos con riesgo de sufrir cáncer colorrectal o adenomas colorrectales (particularmente adenomas colorrectales avanzados). Dado que el método de la invención se basa preferiblemente en una biopsia líquida obtenida del paciente (por ejemplo, plasma, sangre o suero), se espera que mejore el cumplimiento de la detección del cáncer colorrectal. Además, el método de la invención ofrece alta sensibilidad y especificidad, lo que significa que es un método sólido y rentable para la detección tanto de cáncer colorrectal como de adenomas colorrectales. Li et al (Oncogene, 2014) divulga que la expresión de PDE10a (en D3 se denomina PDE10 pero en la primera línea del resumen se identifica como PDE10a) aumenta en el cáncer de colon y si la expresión aumenta en ganancia de los experimentos funcionales, el tejido normal y precanceroso se vuelve más cancerígeno. Chen et al (Biochemical and Biophysical Research Communications, 2018) divulgan que la expresión de Lnc00473 está asociada con la proliferación e invasión del cáncer hepatocelular.

Descripción de la invención

Breve descripción de la invención

50 La presente invención se refiere a un método in vitro (en adelante "método de la invención") para el diagnóstico o pronóstico del cáncer colorrectal y/o un estadio precanceroso del mismo. Preferiblemente se implementa en una biopsia líquida obtenida del paciente, que es una muestra biológica mínimamente invasiva. El método de la invención ofrece alta sensibilidad y especificidad, lo que significa que es un método sólido y rentable para la detección tanto del cáncer colorrectal como de un estadio precanceroso del mismo.

55 Dado que el método de la invención tiene mayor sensibilidad y especificidad en comparación con el método utilizado hoy en día (FIT) para detectar a la población general en riesgo de sufrir CCR o AA, este se asocia con un menor

- 5 porcentaje de falsos positivos. En consecuencia, el método descrito en la presente invención ayuda claramente a reducir el número de colonoscopias de seguimiento, mejorando así la forma en que hoy en día se examina o diagnostica a los pacientes. Una vez realizado el método de la invención, si se determina que los pacientes podrían estar padeciendo cáncer colorrectal y/o estadio precanceroso, el resultado se confirma mediante colonoscopia. Sin embargo, si no se determina que el paciente podría estar padeciendo cáncer colorrectal y/o estadio precanceroso, no es necesario realizar una colonoscopia y se recomiendan pruebas de rutina con el método de la invención.
- 10 En particular, la primera realización de la presente invención se refiere a un método in vitro para el diagnóstico de cáncer colorrectal y/o una estadio precanceroso del mismo, que comprende determinar el estado de metilación de al menos el gen LINC00473 en una biopsia líquida obtenida del paciente, en el que un mayor nivel de metilación del gen LINC00473, en comparación con un nivel de referencia de metilación del gen LINC00473 medido en sujetos sanos, es una indicación de que el sujeto padece cáncer colorrectal y/o un estadio precanceroso del mismo.
- 15 La segunda realización de la invención se refiere a un método in vitro para el pronóstico de cáncer colorrectal y/o un estadio precanceroso del mismo, que comprende determinar el estado de metilación de al menos el gen LINC00473 en una biopsia líquida obtenida del paciente, en el que un mayor nivel de metilación del gen LINC00473, en comparación con un nivel de referencia de metilación del gen LINC00473 medido en el paciente, es una indicación de que el paciente tiene un mal pronóstico.
- La tercera realización de la presente invención se refiere al uso in vitro de al menos el estado de metilación del gen LINC00473 para el diagnóstico y/o pronóstico del cáncer colorrectal y/o un estadio precanceroso del mismo.
- 20 La cuarta realización de la presente invención se refiere al uso in vitro de un kit que comprende reactivos para la determinación de al menos el estado de metilación del gen LINC00473 para el diagnóstico y/o pronóstico de cáncer colorrectal y/o un estadio precanceroso del mismo.
- En una realización preferida, la biopsia líquida es una muestra de plasma, sangre o suero. Se prefiere particularmente el plasma.
- En una realización preferida, el estadio precanceroso es adenoma colorrectal, preferiblemente AA.
- 25 En una realización preferida, el estado de metilación del gen LINC00473 se determina en al menos un CpG de la región promotora.
- En una realización preferida, el estado de metilación del gen LINC00473 se determina en al menos un CpG de la región promotora que está a 3000 pb alrededor del sitio de inicio de la transcripción (TSS). Esto significa 1500 pb aguas arriba o 1500 pb aguas abajo del TSS.
- 30 En una realización preferida, el estado de metilación del gen LINC00473 se determina en al menos un CpG de la región promotora ubicada entre las posiciones cromosómicas Chr6: 166402081 y Chr6: 166402638.
- En una realización preferida, el estado de metilación del gen LINC00473 se determina en al menos un CpG de la región promotora ubicada en una posición cromosómica seleccionada del grupo que comprende: Chr6: 166402638, y/o Chr6: 166402474, y/o Chr6: 166402463, y/o Chr6: 166402457, y/o Chr6: 166402416, y/o Chr6: 166402379, y/o Chr6: 166402375, y/o Chr6: 166402364, y/o Chr6: 166402081, preferiblemente un CpG seleccionado del grupo que comprende: cg06545143, y/o cg08886973 y/o cg21306006.
- 35 En una realización preferida, el diagnóstico del cáncer colorrectal y/o un estadio precanceroso del mismo se confirma mediante una técnica de imagen, preferiblemente colonoscopia.
- 40 De acuerdo con el método de la invención, después de medir el estado de metilación del gen LINC00473, se obtiene un valor de puntuación y este valor de puntuación se compara con un valor umbral que define la regla de diagnóstico. Si este valor de puntuación es superior al umbral, entonces la muestra correspondiente se clasifica como una muestra positiva, lo que es una indicación de que el paciente podría estar padeciendo cáncer colorrectal y/o un estadio precanceroso del mismo. El valor umbral se ha definido para optimizar los valores de sensibilidad y especificidad. En consecuencia, en una realización preferida, el método de la invención comprende: a) Medir el estado de metilación del gen LINC00473, en una biopsia líquida obtenida del sujeto, b) procesar los valores de metilación para obtener una puntuación de riesgo y c) en donde si se identifica una desviación o variación del valor de puntuación de riesgo obtenido, en comparación con un valor de referencia, esto es indicativo de que el sujeto padece cáncer colorrectal y/o un estadio precanceroso del mismo.
- 45 La última realización de la presente invención se refiere a un método para el diagnóstico y tratamiento del cáncer colorrectal o una estadio precanceroso del mismo, que comprende: a) obtener una biopsia líquida de un sujeto humano; b) detectar el estado de metilación del gen LINC00473, y c) diagnosticar al paciente con cáncer colorrectal o una estadio precanceroso del mismo cuando se identifica un mayor nivel de metilación del gen LINC00473, en comparación con un nivel de referencia de metilación del gen LINC00473 medido en sujetos sanos, y realizando una colonoscopia al paciente. La colonoscopia puede comprender la extirpación del cáncer colorrectal o de los pólipos.
- 50

A los efectos de la presente invención, se definen los siguientes términos:

- LINC00473 (ARN codificante no proteico intergénico largo 473) es un gen de ARN y está afiliado a la clase de ARN no codificante. Se puede identificar en bases de datos públicas de la siguiente manera: HGNC: 21160. Entrez Gene: 90632. Ensembl ID: ENSG00000223414. UniProtKB: A8K010.
- 5 - El término “cáncer colorrectal” es una afección médica caracterizada por el cáncer de las células del tracto intestinal debajo del intestino delgado (es decir, el intestino grueso (colon), incluido el ciego, el colon ascendente, el colon transversal, el colon descendente, el colon sigmoide y recto).
- La expresión “adenoma colorrectal” se refiere a adenomas de colon, también llamados pólipos adenomatosos, que es una etapa benigna y precancerosa del cáncer colorrectal pero aún con alto riesgo de progresión a cáncer colorrectal.
- 10 - La expresión “adenoma colorrectal avanzado” se refiere a adenomas que tienen un tamaño de al menos 10 mm o que histológicamente tienen displasia de alto grado o un componente vellosos superior al 20 %; o lesiones serradas que tienen un tamaño de al menos 10 mm o displasia. Para obtener una explicación más detallada del concepto “adenoma colorrectal avanzado”, consulte los siguientes artículos científicos que pertenecen al conocimiento general común en el campo de la invención: [Rex DK, Boland CR, Dominitz JA, Giardiello FM, Johnson DA, Kaltenbach T, Levin TR, Lieberman D, Robertson DJ. Colorectal Cancer Screening: Recommendations for Physicians and Patients From the U.S. Multi-Society Task Force on Colorectal Cancer. *Gastroenterology*. 2017 Jul;153(1): 307-323. doi: 10.1053/j.gastro.2017.05.013. Epub 2017 Jun 9. PMID: 28600072][East JE, Atkin WS, Bateman AC, Clark SK, Dolwani S, Ket SN, Leedham SJ, Phull PS, Rutter MD, Shepherd NA, Tomlinson I, Rees CJ. British Society of Gastroenterology position statement on serrated polyps in the colon and rectum. *Gut*. 2017 Jul;66(7):1181-1196. doi: 10.1136/gutjnl-2017-314005. Epub 2017 Apr 27. Review. PMID: 28450390].
- 15
- 20 - La expresión “biopsia líquida” se refiere a cualquier muestra de fluidos biológicos que pueda contener material derivado de tumores. En particular, una biopsia líquida es cualquier muestra de fluidos biológicos (por ejemplo: plasma, suero, sangre, saliva, líquido cefalorraquídeo u orina) que puede contener material derivado de tumores, como ADN tumoral circulante.
- 25 - La expresión “muestra biológica mínimamente invasiva” se refiere a cualquier muestra que se toma del cuerpo del paciente sin necesidad de utilizar instrumentos nocivos, distintos de las finas agujas utilizadas para extraer la sangre del paciente, y en consecuencia sin ser nociva para el paciente. Específicamente, muestra biológica mínimamente invasiva se refiere en la presente invención a: muestras de sangre, suero o plasma.
- Tal como se utiliza en el presente documento, se entenderá que el término “metilación” significa la presencia de un grupo metilo añadido por la acción de una enzima ADN metiltransferasa a una base o bases de citosina en una región de ácido nucleico, por ejemplo, ADN.
- 30 - Por consiguiente, el término “estado de metilación”, tal como se utiliza en el presente documento, se refiere al nivel de metilación medido en el paciente que se está analizando. El “estado de metilación” puede ser un nivel superior/inferior de metilación en comparación con el nivel de referencia o control.
- 35 - Tal como se utiliza en el presente documento, se considerará que un “dinucleótido CpG”, un “sitio de metilación de CpG” o equivalente denota una citosina unida a una guanina mediante un enlace fosfodiéster. Los dinucleótidos CpG son dianas para la metilación del residuo de citosina y pueden residir dentro de ácidos nucleicos codificantes o no codificantes. En la técnica se entiende que los ácidos nucleicos no codificantes incluyen intrones, regiones 5' no traducidas, regiones 3' no traducidas, regiones promotoras de un gen genómico o regiones intergénicas.
- 40 - La expresión “CpG diana” se refiere al CpG específico que se encuentra que está metilado diferencialmente en la presente invención.
- La expresión “CpG consecutivos” se refiere a CpG que pueden estar metilados diferencialmente y pueden encontrarse hasta 1500 pb aguas arriba o aguas abajo del sitio de inicio de la transcripción (TSS) (3000 pb alrededor del TSS).
- 45 - Tal como se utiliza en la presente invención “determinar el estado de metilación del gen” significa que el método de la invención se realiza midiendo el estado de metilación de cualquier región del gen, que comprende también cualquier secuencia reguladora que sea capaz de aumentar o disminuir la expresión de dichos genes. En particular, dicha secuencia reguladora incluye el promotor que es una región del ADN que inicia la transcripción del gen. Los promotores se encuentran cerca de los sitios de inicio de la transcripción de los genes, en la misma cadena, aguas arriba o aguas
- 50
- 55 - Tal como se utiliza en el presente documento, se entenderá que un “nivel de metilación de control, referencia o base” significa un nivel de metilación detectado en un ácido nucleico correspondiente de un paciente sano. Por lo tanto, es probable que el paciente sufra CCR o AA, con una sensibilidad y especificidad dadas, si se mide un “nivel más alto de metilación” en este paciente en comparación con un “nivel de metilación de control, referencia o basal” medido en un paciente sano. Un “valor de referencia” puede ser un valor umbral o un valor límite. Normalmente, un “valor umbral” o

“valor límite” se puede determinar de forma experimental, empírica o teórica. También se puede seleccionar arbitrariamente un valor umbral basándose en las condiciones experimentales y/o clínicas existentes, como reconocería un experto habitual en la técnica. El valor umbral debe determinarse para obtener la sensibilidad y especificidad óptimas de acuerdo con la función de la prueba y el equilibrio beneficio/riesgo (consecuencias clínicas de falsos positivos y falsos negativos). Preferiblemente, el experto en la técnica puede comparar los niveles (o puntuaciones) de biomarcadores obtenidos de acuerdo con el método de la invención con un valor umbral definido. Normalmente, la sensibilidad y especificidad óptimas (y, por lo tanto, el valor umbral) se pueden determinar utilizando una curva de característica operativa del receptor (ROC) basada en datos experimentales. Por ejemplo, después de determinar el nivel de metilación de los biomarcadores en un grupo de referencia, se puede usar análisis algorítmico para el tratamiento estadístico del nivel de metilación medido de los biomarcadores en muestras biológicas a analizar, y así obtener un estándar de clasificación que tenga importancia para la clasificación de la muestra. El nombre completo de la curva ROC es curva característica del operador del receptor, que también se conoce como curva característica de operación del receptor. Se utiliza principalmente para pruebas de diagnóstico bioquímico clínico. La curva ROC es un indicador integral que refleja las variables continuas de tasa de verdaderos positivos (sensibilidad) y tasa de falsos positivos (1-especificidad). Divulga la relación entre sensibilidad y especificidad con el método de composición de imágenes. Una serie de diferentes valores de corte (umbrales o valores críticos, valores límite entre resultados normales y anormales de una prueba de diagnóstico) se establecen como variables continuas para calcular una serie de valores de sensibilidad y especificidad. Luego se utiliza la sensibilidad como coordenada vertical y la especificidad como coordenada horizontal para dibujar una curva. Cuanto mayor sea el área bajo la curva (AUC), mayor será la precisión del diagnóstico. En la curva ROC, el punto más cercano al extremo superior izquierdo del diagrama de coordenadas es un punto crítico que tiene valores altos de sensibilidad y especificidad. El valor AUC de la curva ROC está entre 1.0 y 0.5. Cuando el AUC > 0.5, el resultado del diagnóstico mejora cada vez más a medida que el AUC se acerca a 1. Cuando el AUC está entre 0.5 y 0.7, la precisión es baja. Cuando el AUC está entre 0.7 y 0.9, la precisión es buena. Cuando el AUC es superior a 0.9, la precisión es bastante alta. Este método algorítmico se realiza preferiblemente con un ordenador. Se puede usar software o sistemas existentes en la técnica para dibujar la curva ROC, tales como: software de estadística médica MedCalc 9.2.0.1, SPSS 9.0, preferiblemente GraphPad Prism 6.

- La expresión “nivel superior de metilación” se refiere a un aumento estadísticamente significativo en la cantidad relativa de metilación de un ácido nucleico, por ejemplo, ADN, en comparación con la cantidad de metilación medida en un sujeto/paciente utilizado como control/referencia. Por lo tanto, en la presente divulgación, el “nivel superior de metilación” se determina con referencia a un nivel inicial representado por el estado de metilación de una región genómica determinada en una muestra obtenida del sujeto o paciente. Por ejemplo, un “nivel más alto de metilación” puede ser al menos un 2 % mayor que el nivel inicial de metilación, por ejemplo al menos un 5 % mayor que el nivel inicial de metilación, o al menos un 10 % mayor que el nivel inicial de metilación o al menos un 15 % mayor que el nivel inicial de metilación, o al menos un 20 % mayor que el nivel inicial de metilación, o al menos un 25 % mayor que el nivel inicial de metilación, o al menos un 30 % mayor que el nivel inicial de metilación, o al menos un 40 % mayor que el nivel inicial de metilación, o al menos un 50 % mayor que el nivel inicial de metilación, o al menos un 60 % mayor que el nivel inicial de metilación, o al menos un 70 % mayor que el nivel inicial de metilación, o al menos un 80 % mayor que el nivel inicial de metilación, o al menos un 90 % mayor que el nivel inicial de metilación.

- Por “que comprende” se entiende que incluye, pero no está limitado a, todo lo que sigue a la palabra “que comprende”. Por lo tanto, el uso del término “que comprende” indica que los elementos enumerados son requeridos u obligatorios, pero que otros elementos son opcionales y pueden estar presentes o no.

- Por “que consiste en” se entiende “que incluye y se limita a” todo lo que sigue a la frase “que consiste en”. Por lo tanto, la frase “que consiste de” indica que los elementos enumerados son requeridos u obligatorios y que no puede haber otros elementos presentes.

Breve descripción de las figuras

Figura 1. Los niveles de metilación del ADN del promotor LINC00473 en muestras de tejido colorrectal. En las cohortes 1 (A) y 2 (B), los pacientes con cáncer colorrectal mostraron niveles de metilación significativamente más altos de LINC00473 que los controles sin tumores. Los niveles de metilación del promotor LINC00473 se analizaron (A) mediante Infinium HumanMethylation450K BeadChip (matriz 450K) y (B) mediante pirosecuenciación. Los datos de metilación del ADN se expresan como valores β en A y como % de metilación en B. Las líneas horizontales representan la mediana de los niveles de metilación. P, indica el valor p analizado mediante la prueba U de Mann-Whitney. Tumor, representa el cáncer colorrectal.

Figura 2. Curva de características operativas del receptor (ROC) para la metilación del promotor LINC00473 en muestras de tejido colorrectal. El área bajo la curva ROC (AUC) en la cohorte 1 (A) y la cohorte 2 (B) muestra la alta precisión diagnóstica de la metilación del promotor LINC00473 para discriminar entre pacientes con cáncer colorrectal y controles sin tumores. P, indica el valor p de la curva ROC. IC, es el intervalo de confianza.

Figura 3. Niveles de metilación del ADN del promotor LINC00473 en muestras de tejido colorrectal del Atlas del Genoma del Cáncer (TCGA) de acuerdo con su estadio clínico. Todos los estadios de los pacientes con cáncer colorrectal mostraron niveles de metilación significativamente más altos de LINC00473 en (A) Cohorte 1 (I: $0.55 \pm$

0.023; II: 0.53 ± 0.018 ; III: 0.45 ± 0.028 ; IV: 0.47 ± 0.031) y (B Cohorte 2 (I: $38.54 \% \pm 7.67 \%$; II: $34.31 \% \pm 2.11 \%$; III: $32.14 \% \pm 2.84 \%$; IV: $35.31 \% \pm 3.95 \%$) que sus respectivos controles no tumorales (Cohorte 1: 0.11 ± 0.006 ; Cohorte 2: $5.84 \% \pm 0.78 \%$). Los niveles de metilación de LINC00473 se analizaron (A) mediante Infinium HumanMethylation450K BeadChip (matriz 450K) y se expresaron como valores β , y (B) mediante pirosecuenciación y se expresaron como % de metilación. Asteriscos (*), indican $P < 0.0001$ respecto a los controles. El valor p se analizó mediante la prueba U de Mann-Whitney. Tumor, representa el cáncer colorrectal.

Figura 4. Niveles de metilación del ADN del promotor LINC00473 en adenomas. Los pacientes con adenomas y cáncer colorrectal mostraron niveles de metilación significativamente más altos de LINC00473 que los controles sin tumores. Los niveles de metilación del promotor LINC00473 se analizaron mediante pirosecuenciación y se expresaron como % de metilación. Las líneas horizontales representan la mediana de los niveles de metilación. P, indica el valor p analizado mediante la prueba U de Mann-Whitney.

Figura 5. Curva de características operativas del receptor (ROC) para la metilación del promotor LINC00473 en adenomas. El área bajo la curva ROC (AUC) en la cohorte 3 muestra la alta precisión diagnóstica de la metilación del promotor LINC00473 para discriminar entre adenomas y controles no tumorales. P, indica el valor p de la curva ROC. IC, es el intervalo de confianza.

Figura 6. Niveles de metilación del ADN del promotor LINC00473 en el ADN plasmático circulante de pacientes con cáncer colorrectal y controles sanos. Los pacientes con cáncer colorrectal mostraron niveles de metilación significativamente más altos de LINC00473 que los controles sanos. Los niveles de metilación de LINC00473 se analizaron por triplicado mediante PCR en tiempo real. Las líneas horizontales representan la mediana de los niveles de metilación. P, indica el valor p analizado mediante la prueba U de Mann-Whitney.

Figura 7. Curva de características operativas del receptor (ROC) para la metilación del promotor LINC00473 en el ADN plasmático circulante de pacientes con cáncer colorrectal respecto a controles normales. El área bajo la curva ROC (AUC) muestra la alta precisión diagnóstica de la metilación del promotor LINC00473 para discriminar entre pacientes con cáncer colorrectal e individuos sanos. P, indica el valor p de la curva ROC.

Figura 8. Análisis de supervivencia de Kaplan-Meier para la metilación del promotor LINC00473 en pacientes con cáncer colorrectal. Los pacientes con cáncer colorrectal se clasificaron de acuerdo con un mayor o menor nivel de metilación de LINC00473 respecto al nivel de metilación medio del grupo (10 % de metilación). Los análisis de supervivencia de Kaplan mostraron que los niveles altos de metilación de LINC00473 se asociaron significativamente con una supervivencia general (SG) más corta ($P = 0.0256$). P, se refiere al valor p de la prueba Log-Rank. H (Alto) indica un nivel de metilación $>10 \%$; y L (Bajo), un nivel de metilación $<10 \%$.

Figura 9. Niveles de metilación del ADN del promotor LINC00473 en el ADN plasmático circulante de pacientes con adenoma colorrectal avanzado y controles sanos. Los pacientes con adenoma colorrectal avanzado mostraron niveles de metilación significativamente más altos de LINC00473 que los controles sanos. Los niveles de metilación de LINC00473 se analizaron por triplicado mediante PCR en tiempo real. Las líneas horizontales representan la mediana de los niveles de metilación. P, indica el valor p analizado mediante la prueba U de Mann-Whitney.

Figura 10. Curva de características operativas del receptor (ROC) para la metilación del promotor LINC00473 en ADN plasmático circulante de adenomas colorrectales avanzados respecto a controles normales. El área bajo la curva ROC (AUC) muestra la alta precisión diagnóstica de la metilación del promotor LINC00473 para discriminar entre adenomas colorrectales avanzados y controles sanos. P, indica el valor p de la curva ROC. IC, es el intervalo de confianza.

Figura 11. Niveles de metilación del ADN del promotor LINC00473 en adenomas colorrectales avanzados de tejidos. Los adenomas colorrectales avanzados mostraron niveles de metilación significativamente más altos de LINC00473 que los controles no tumorales. Los niveles de metilación del promotor LINC00473 se analizaron mediante pirosecuenciación y se expresaron como % de metilación. Las líneas horizontales representan la mediana de los niveles de metilación. P, indica el valor p analizado mediante la prueba U de Mann-Whitney.

Figura 12. Curva de características operativas del receptor (ROC) para la metilación del promotor LINC00473 en adenoma colorrectal avanzado de tejidos. El área bajo la curva ROC (AUC) muestra la alta precisión diagnóstica de la metilación del promotor LINC00473 para discriminar entre adenomas colorrectales avanzados y controles no tumorales. P, indica el valor p de la curva ROC. IC, es el intervalo de confianza.

Figura 13. Niveles de metilación del ADN del promotor LINC00473 en el ADN plasmático circulante del cáncer colorrectal mediante PCR digital en gotas (ddPCR). Los pacientes con cáncer colorrectal mostraron niveles de metilación significativamente más altos de LINC00473 que los controles sin tumores. Los niveles de metilación del promotor LINC00473 se analizaron por triplicado mediante ddPCR. Las líneas horizontales representan la mediana de los niveles de metilación. P, indica el valor p analizado mediante la prueba U de Mann-Whitney.

Figura 14. Curva de características operativas del receptor (ROC) para la metilación del promotor LINC00473 en el ADN plasmático circulante de pacientes con cáncer colorrectal respecto a controles normales analizados mediante PCR digital en gotas (ddPCR). El área bajo la curva ROC (AUC) muestra la alta precisión diagnóstica de la metilación

del promotor LINC00473 para discriminar entre pacientes con cáncer colorrectal e individuos sanos. P, indica el valor p de la curva ROC.

5 Figura 15. Niveles de metilación del ADN del promotor LINC00473 en el ADN plasmático circulante de adenomas colorrectales avanzados mediante PCR digital en gotas. Los pacientes con adenoma colorrectal avanzado mostraron niveles de metilación significativamente más altos de LINC00473 que los controles sanos. Los niveles de metilación de LINC00473 se analizaron por triplicado mediante PCR digital en gotas. Las líneas horizontales representan la mediana de los niveles de metilación y P indica el valor de p mediante la prueba U de Mann-Whitney analizada.

Descripción detallada de la invención

Ejemplo 1. Métodos.

10 **Ejemplo 1.1. Participantes del estudio para análisis de tejido colorrectal.**

Inicialmente analizamos 3 cohortes independientes (Cohorte 1, Cohorte 2 y Cohorte 3) para estudiar la metilación del ADN de LINC00473 en tejidos colorrectales. La cohorte 1 está representada por pacientes con cáncer colorrectal primario (n = 273) y controles sin tumores (n = 38). La cohorte 2 incluye 180 pacientes con cáncer colorrectal primario y 93 controles sin tumores. Y en la Cohorte 3 hay 12 pacientes con cáncer colorrectal primario, 12 adenomas y 12 controles no tumorales.

Además, para los fines de la presente solicitud PCT, también analizamos una nueva cohorte independiente (Cohorte 4) para estudiar la metilación del ADN de LINC00473 en tejidos colorrectales, que incluye 50 adenomas colorrectales (que comprenden 20 adenomas colorrectales avanzados confirmados) y 10 controles no tumorales.

Ejemplo 1.2. Análisis de datos de metilación del ADN de tejidos colorrectales mediante matriz de 450K.

20 Los resultados de la metilación del ADN de la cohorte 1 se analizaron a partir de los datos del Infinium HumanMethylation450K BeadChip (matriz 450K) obtenidos en la base de datos pública The Cancer Genome Atlas (TCGA). La matriz de 450K (Illumina) cubre > 450.000 sitios CpG a lo largo del genoma humano, y la puntuación de metilación de cada CpG se representa como valores beta (β) que oscilan entre 0.0 (completamente no metilado) y 1.0 (completamente metilado).

25 **Ejemplo 1.3. Análisis de pirosecuenciación con bisulfito de tejidos colorrectales.**

Se analizó el estado de metilación del ADN del promotor LINC00473 en las cohortes 2, 3 y 4 mediante pirosecuenciación con bisulfito. Después de la conversión con bisulfito de ~ 500 ng de ADN con el kit de metilación de ADN EZ-96 (Zymo Research Corp.), los niveles de metilación del ADN del promotor LINC00473 se analizaron con un sistema PyroMark Q96 (Qiagen) de acuerdo con las instrucciones del fabricante. La cuantificación de la metilación del sitio CpG se obtuvo utilizando Pyro Q-CpG 1.0.9 (Qiagen). Las secuencias de cebador (Tabla 1) se diseñaron con PyroMark Assay Design 2.0 (Qiagen). La Tabla 1 muestra los cebadores para los análisis de metilación de LINC00473 mediante pirosecuenciación.

Tabla 1

Secuencia del cebador (5'-3')	Tamaño del cebador (nt)
F: SEQ ID NO: 1	27
R: SEQ ID NO: 2	23
S: SEQ ID NO: 3	22
F: Adelante; R: Inversa; S: Secuenciación; nt: nucleótidos	

35 En una realización preferida, los cebadores utilizados en la presente invención, preferiblemente el cebador de SEQ ID NO: 2, están biotinilados mediante la incorporación de una molécula de biotina.

Ejemplo 1.4. Participantes del estudio para análisis de biopsia líquida.

40 Para el análisis de LINC00473 en biopsia líquida de cáncer colorrectal, el estudio incluyó 26 pacientes con cáncer colorrectal avanzado (estadio III y IV) reclutados prospectivamente en el momento del diagnóstico (línea base), antes del inicio del tratamiento y la cirugía. Las características demográficas y clínicas de los pacientes se representan en la Tabla 2. También se incluyeron en el estudio veintiocho controles sanos. El estado de la enfermedad y la estadificación de los pacientes con cáncer colorrectal fueron obtenidos por los oncólogos médicos del Departamento

de Oncología del Complejo Hospitalario Universitario de Santiago de Compostela (CHUS). La tabla 2 muestra las características clínicas de los pacientes con cáncer colorrectal.

Tabla 2

Características	Pacientes (n=26)
Género	
Masculino	17
Femenino	9
Años de edad	
Media \pm DE	67 \pm 10
Estadio	
III	4
IV	22
Histología	
adenocarcinoma	24
Carcinoma mucinoso	2
DE: desviación estándar	

5 Para el análisis de LINC00473 en biopsia líquida de adenoma colorrectal avanzado, el estudio incluyó 5 controles sanos y 12 pacientes con adenoma avanzado. Todos los individuos para el análisis de biopsia líquida fueron reclutados en el Complejo Hospitalario Universitario de Santiago de Compostela (CHUS).

10 Para el análisis de LINC00473 en biopsia líquida de cáncer colorrectal mediante PCR digital en gotitas (ddPCR), el estudio incluyó a 5 pacientes con cáncer colorrectal avanzado reclutados prospectivamente en el momento del diagnóstico (valor inicial), antes del inicio del tratamiento y la cirugía. También se incluyeron en el estudio diez adenomas avanzados y cinco controles sanos. Los pacientes y controles se obtuvieron en el Complejo Hospitalario Universitario de Santiago de Compostela (CHUS).

Ejemplo 1.5. Recogida de muestras de sangre y aislamiento de plasma.

15 Se obtuvieron muestras de sangre mediante flebotomía utilizando tubos de recogida que contenían EDTA como anticoagulante. El plasma se aisló de las muestras de sangre dentro de las 2 h posteriores a la recolección con una primera centrifugación de los tubos de sangre (1500 g, 10 min, 4 °C). El plasma se transfirió a tubos de 1.5 ml y se realizó una segunda centrifugación (15.000 g, 10 min, 4 °C). El plasma se transfirió a tubos nuevos de 1.5 ml y se almacenó a -80 °C.

Ejemplo 1.6. Aislamiento de ADN circulante a partir de muestras de plasma.

20 Después de descongelar las muestras de plasma, se aisló ADN circulante de 2-3 ml de plasma usando el kit de ácido nucleico circulante QIAamp® (Qiagen) y el sistema de vacío QIAvac 24 Plus (Qiagen) siguiendo las recomendaciones del fabricante. Finalmente se eluyó el ADN circulante en 75 μ L de tampón de elución y 1 μ L de esta elución se usó para cuantificar la concentración de ADN circulante mediante el kit QuantiFluor® ONE dsDNA con el fluorómetro Quantus™ (Promega). Después de la cuantificación, el ADN circulante se almacenó a -80 °C.

Ejemplo 1.7. Conversión con bisulfito del ADN circulante.

25 Para la conversión de bisulfito de ADN, se usaron 15-50 ng de ADN circulante y la conversión se realizó con el kit EZ DNA Methylation-Lightning (Zymo Research) de acuerdo con las recomendaciones del fabricante siguiendo estas etapas de termociclado: 98 °C 8 min, 54 °C. 60 min y 4 °C. Después de la purificación en columna con las etapas de unión, L-desulfonación y lavado, el ADN convertido con bisulfito (bis-ADN) se eluyó en 15 μ L de tampón de elución y se almacenó a -80 °C.

30 **Ejemplo 1.8. Análisis de metilación del ADN de la región promotora LINC00473 en biopsia líquida mediante PCR en tiempo real.**

Se analizó el estado de metilación de la región promotora del ARN 473 codificante no proteico intergénico largo (LINC00473; símbolo anterior C6orf176) en ADN plasmático circulante. El gen no codificante LINC00473 (NCBI ID:

90632; UCSC ID: uc063sul.1; Ensambl ID: ENSG00000223414; HGNC ID: HGNC:21160) está ubicado en el cromosoma (chr) 6 en la posición 6q27 y tiene una isla CpG que contiene su región promotora, que se encuentra en chr6: 166401527-166402659. Además, la región promotora de LINC00473 se superpone en el genoma con el cuerpo del ARN codificante no proteico intergénico largo 602 o LINC00602 (NCBI ID: 441177; UCSC ID: uc011egm.4; Ensambl ID: ENSG00000281832; HGNC ID: HGNC: 43917).

Los niveles de metilación de la región promotora de LINC00473 se determinaron mediante PCR en tiempo real con un ensayo de PCR cuantitativo específico de metilación (qMSP) en un sistema StepOne Plus (Applied Biosystems). Cada reacción contenía 2 uL de ADN convertido con bisulfito (bis-DNA) como plantilla, 10 µl de Power SYBR™ Green PCR Master Mix (ThermoFisher) y 150 nM de cada cebador directo e inverso (Tabla 3) para detectar la metilación o desmetilación en un volumen total de 20 µl. Las reacciones se realizaron en una placa de reacción de 96 pocillos MicroAmp™ Fast Optical (Applied Biosystems). Las condiciones de termociclado en el sistema StepOne Plus fueron: 10 min a 95 °C, seguido de 50 ciclos de 94 °C por 15 s y 60 °C por 30 s. Se incluyó agua como control sin plantilla en cada ejecución para verificar la ausencia de contaminación durante las reacciones. En cada análisis se utilizaron la línea celular de cáncer colorrectal HCT-116 y leucocitos normales (NL) como controles positivos para la metilación y la desmetilación, respectivamente. Todas las muestras y controles se analizaron por triplicado. El ciclo umbral (Ct) se determinó para cada reacción con los cebadores específicos para metilación y desmetilación utilizando el software StepOne Real-Time PCR (Applied Biosystems). El nivel de metilación del ADN de cada muestra se expresó como porcentaje de metilación (%) de acuerdo con el siguiente cálculo basado en Cottrell et al. (2007):

$$(\%) \text{ de metilación} = 100/[1 + 2^{(CT_{CG} - CT_{TG})}]$$

En esta fórmula, CT_{CG} representa el ciclo umbral del estado de metilación y CT_{TG} indica el ciclo umbral del estado de no metilación. Con este cálculo los niveles de metilación pueden estar entre rangos de 0 % a 100 % de metilación. La Tabla 3 muestra los cebadores para los análisis de metilación de LINC00473 mediante PCR en tiempo real.

Tabla 3

Estado de metilación	Secuencia del cebador (5'-3')	Tamaño del cebador (nt)	Tamaño del amplicón (pb)
Metilado	F: SEQ ID NO: 4	20	114 (*)
	R: SEQ ID NO: 5	20	
sin metilar	F: SEQ ID NO: 6	23	116 (#)
	R: SEQ ID NO: 7	23	

F: Adelante; R: Inversa; nt: nucleótidos; pb: pares de bases.
 (*)Posición: chr6: 166402364-166402477; (#)Posición: chr6:166402363-166402478.

Los cebadores directos e inversos utilizados para el análisis de metilación de LINC00473 permiten detectar el estado de metilación de 6 CpG (Tabla 4) ubicados en la región promotora de LINC00473. Uno de los CpG (chr6: 166402416) contenido en la secuencia amplificada (amplicón) por PCR en tiempo real se corresponde con el CpG denominado cg08886973 de acuerdo con los ensayos Infinium Human Methylation 450K e Infinium MethylationEPIC (Illumina), que son ensayos de micromatrices capaces de detectar el estado de metilación de más de 450.000 y 850.000 CpG, respectivamente. Estas micromatrices también son capaces de detectar otros CpG del promotor LINC00473 identificado como cg06545143 (chr6: 166402638) y cg21306006 (chr6: 166402081) que se encuentran, respectivamente, 162 nucleótidos aguas arriba y 282 nucleótidos aguas abajo del amplicón de LINC00473 analizado en este estudio. Los tres CpG incluidos en este tipo de ensayos de micromatrices (cg06545143, cg08886973, cg21306006) están ubicados en la región promotora TSS1500 de LINC00473, que es la región del promotor entre 200 y 1500 nucleótidos aguas arriba de su sitio de inicio de transcripción (TSS). Todas las posiciones cromosómicas indicadas anteriormente son de acuerdo con la versión GRCh37/hg19 del UCSC Genome Browser de la Universidad de California (<https://genome.ucsc.edu/index.html>). La Tabla 4 muestra los CpG de LINC00473 que se detectan en los análisis de metilación mediante PCR en tiempo real.

Tabla 4

Estado de metilación	Cebador	Posición cromosómica
Metilado o no metilado	Directo	chr6: 166402474
		chr6: 166402463

		chr6: 166402457
	Inverso	chr6: 166402379 chr6: 166402375 chr6: 166402364

Ejemplo 1.9. Análisis de metilación del ADN de la región promotora LINC00473 en biopsia líquida mediante PCR digital en gotas (ddPCR).

5 Los niveles de metilación de la región promotora de LINC00473 se determinaron mediante PCR digital en gotitas (ddPCR) en un sistema QX200 (Bio-Rad). Primero, se realizó una reacción de preamplificación múltiplex usando ~2 ng de ADN convertido con bisulfito (bis-DNA), 25 µl de SsoAdvanced™ PreAmp Supermix (Bio-Rad), 0,5 µl de un ensayo Bio-Rad personalizado que contiene los cebadores directos e inversos y la sonda para metilación (Bio-Rad) (Tabla 5), y 0,5 µl de un ensayo Bio-Rad personalizado que contiene los cebadores directos e inversos y la sonda para desmetilación (Tabla 5), en un volumen total de 50 µl. El volumen final se completó con agua. Las reacciones se
10 realizaron en tubos de PCR de 0,2 ml (Axygen) en un sistema de PCR ProFlex (Applied Biosystems): 3 min a 95 °C, 10 ciclos de 95 °C durante 15 s y 56,2 °C durante 4 min; y una etapa final de retención de 4 °C.

A continuación, se realizó una reacción de mezcla múltiple que contenía 2 µl del producto de preamplificación obtenido previamente, 11 µl de ddPCR Supermix para sondas (sin dUTP) (Bio-Rad), 2,2 µl de un ensayo Bio-Rad personalizado que contenía los cebadores directos e inversos y la sonda para la metilación (Tabla 5), y 2,2 µl de un ensayo Bio-Rad personalizado que contiene los cebadores directos e inversos y la sonda para la desmetilación (Bio-Rad) (Tabla 5), en un volumen total de 22 µl. El volumen final se completó con agua. Luego, se transfirieron 20 µl de cada reacción de
15 mezcla y 70 µl de aceite de generación de gotas (Bio-Rad), respectivamente, a los pozos de muestra y aceite de un cartucho DG8™ (BIO-RAD) y se cargaron en el generador de gotas QX200™ (Bio-Rad). Las gotas se generaron en el pocillo del cartucho, se transfirieron a una placa de 96 pocillos ddPCR (Bio-Rad) y se cargaron en un ciclador térmico C1000 Touch (Bio-Rad): 10 min a 95 °C, 40 ciclos de 95 °C durante 15 s y 56.2 °C durante 30 s; 98 °C durante 10 min y una etapa de retención final de 4 °C. El incremento de la rampa de temperatura fue de 2.5 °C/s para todas las etapas. Luego, se leyó la placa de 96 pocillos en un lector de gotas QX200™ (Bio-Rad). Se incluyó agua como control sin
20 plantilla en cada ejecución para verificar la ausencia de contaminación durante las reacciones. En cada análisis se utilizaron la línea celular de cáncer colorrectal HCT-116 y leucocitos normales (NL) como controles positivos para la metilación y la desmetilación, respectivamente. Todos los controles se incluyeron en cada placa con y sin la etapa de preamplificación. Todas las muestras y controles se analizaron por triplicado. El análisis de los datos se realizó con el software QuantaSoft (Bio-Rad).
25

El nivel de metilación del ADN de cada muestra se expresó como porcentaje de metilación (%) de acuerdo con el siguiente cálculo:

$$30 \quad (\%) \text{ de metilación} = [M / (U + M)] \times 100$$

En esta fórmula, M (Metilación) representa las copias/µl de la molécula de ADN diana para la sonda de metilación (sonda FAM), y U (Desmetilación) indica las copias/µl de la molécula de ADN diana para la sonda de desmetilación (sonda HEX). Con este cálculo los niveles de metilación pueden estar entre rangos de 0 % a 100 % de metilación. La
35 Tabla 5 muestra las secuencias de cebadores y sondas para análisis de metilación de LINC00473 mediante ddPCR. Con base en estas secuencias, se obtuvieron de Bio-Rad dos ensayos personalizados de Bio-Rad que contenían los cebadores y la sonda para la metilación y la desmetilación, respectivamente, de acuerdo con las recomendaciones del fabricante: Relación cebador a sonda: 1.8, concentración del cebador en la reacción final 450 nM y concentración de la sonda en la reacción final 250 nM.

Tabla 5

Estado de metilación	Secuencia de cebador y sonda (5'-3')	Tamaño del cebador/sonda (nt)	Tamaño del amplicón (pb)
Metilado	F: SEQ ID NO: 4	20	114 (*)
	R: SEQ ID NO: 5	20	
	P: FAM-SEQ ID NO: 8	20	
sin metilar	F: SEQ ID NO: 6	23	116(#)

	R: SEQ ID NO: 7	23	
	P: HEX- SEQ ID NO: 9	27	
F: Directo; R: Inverso; P: Sonda; nt: nucleótidos; pb: pares de bases. FAM: fluoresceína; HEX: hexaclorofluoresceína (*) Posición: chr6: 166402364-166402477; (#) Posición: chr6:166402363-166402478.			

Los cebadores directos e inversos y la sonda utilizada para el análisis de metilación de LINC00473 mediante ddPCR permiten detectar el estado de metilación de 9 CpG (Tabla 6) ubicados en la región promotora de LINC00473. Uno de los CpG (chr6: 166402416), que se corresponde con el CpG denominado cg08886973 de acuerdo con los ensayos Infinium Human Methylation 450K e Infinium MethylationEPIC (Illumina), está contenido en la secuencia amplificada (amplicón) y se detecta con la sonda metilada y no metilada indicada en la Tabla 5. Todas las posiciones CpG de LINC00473 que se detectan en los análisis de metilación mediante ddPCR se representan en la Tabla 6. Todas las posiciones cromosómicas indicadas en la Tabla 6 están de acuerdo con la versión GRCh37/hg19 del UCSC Genome Browser de la Universidad de California (<https://genome.ucsc.edu/index.html>).

Tabla 6

Estado de metilación	Cebador	Posición cromosómica
Metilado y no metilado	Directo	chr6: 166402474
		chr6: 166402463
		chr6: 166402457
	Sonda	chr6: 166402416
		chr6: 166402411
		chr6: 166402400
	Inverso	chr6: 166402379
		chr6: 166402375
		chr6: 166402364

Ejemplo 1.10. Análisis estadístico.

Se utilizó por primera vez la prueba de Kolmogorov-Smirnov para evaluar la normalidad de la distribución de los datos. Posteriormente se utilizó la prueba no paramétrica U de Mann-Whitney para la comparación de los datos. Para evaluar la precisión diagnóstica de la metilación de LINC00473 para detectar cáncer colorrectal, se realizó una curva de característica operativa del receptor (ROC). El índice de Youden (J), que permite obtener el punto de corte de metilación que proporciona mayor combinación de sensibilidad y especificidad, se calculó de acuerdo con la fórmula: $J = \text{Sensibilidad} + \text{Especificidad} - 1$ (Fluss et al., 2005). Para medir la efectividad de la prueba diagnóstica se calculó el valor predictivo positivo (VPP) y negativo (VPN): $VPP = \text{verdadero positivo} / (\text{verdadero positivo} + \text{falso positivo})$; $VPN = \text{verdadero negativo} / (\text{verdadero negativo} + \text{falso negativo})$ (Hajian-Tilaki, 2013). Para evaluar el análisis de supervivencia se realizó el método de Kaplan-Meier y se utilizó la prueba de rango logarítmico (Mantel-Cox) para examinar las diferencias entre el grupo metilado y no metilado. Para el análisis estadístico y la representación gráfica se utilizó el software SPSS o GraphPad Prism 7.0. Todos los valores de p expresados se calcularon con pruebas de dos colas y se consideraron significativos cuando $p < 0.05$.

Ejemplo 2. Resultados.

Ejemplo 2.1. Muestras de tejido.

Ejemplo 2.1.1. El análisis de metilación del promotor de LINC00473 en tejidos tumorales permite detectar pacientes con cáncer colorrectal.

Los niveles de metilación del ADN de la región promotora LINC00473 de muestras de tejido colorrectal (273 pacientes con cáncer colorrectal en estadio I, II, III y IV; y 38 controles no tumorales) se obtuvieron después del análisis mediante Infinium HumanMethylation450K BeadChip (matriz 450K) de la base de datos pública internacional The Cancer Genome Atlas (TCGA) (Cohorte 1). En este análisis, los datos de metilación de la matriz 450K se expresan como

valores beta (β) promedio, que se definen de 0.0 a 1.0. Centramos nuestro análisis en el CpG de la región promotora LINC00473 identificada en la matriz de 450K como cg08886973. Este análisis mostró niveles de metilación significativamente ($p < 0.0001$) más altos en pacientes con cáncer colorrectal (0.51 ± 0.011) que en controles sin tumores (0.11 ± 0.006) (Figura 1A). Se obtuvieron resultados similares cuando analizamos el estado de metilación del promotor LINC00473 en la Cohorte 2 mediante pirosecuenciación con bisulfito (180 pacientes con cáncer colorrectal: $33.93 \% \pm 1.51 \%$; 93 controles no tumorales: $5.84 \% \pm 0.78 \%$; $p < 0.0001$) (Figura 1B). En este caso, los valores de metilación obtenidos de la pirosecuenciación se expresaron en porcentaje de metilación (%), que se define del 0 % al 100 %. En conjunto, estos datos indican que los niveles de metilación de la región promotora de LINC00473 analizados en tejidos colorrectales son capaces de diferenciar entre individuos sin tumores y pacientes con cáncer colorrectal.

El análisis de los niveles de metilación de LINC00473 en las muestras de tejido colorrectal de la Cohorte 1 mediante la curva característica operativa del receptor (ROC) mostró una precisión diagnóstica muy alta para diferenciar pacientes con cáncer colorrectal (I, II, III y IV) de los controles no tumorales con un área bajo la curva (AUC) de 0.94 ($p < 0.0001$; IC 95 %: 0.91-0.97) (Figura 2A). Se obtuvieron resultados similares de la Cohorte 2 (AUC=0.90; $p < 0.0001$; IC 95 %: 0.86-0.94) (Figura 2B). Estos resultados indican que el análisis del estado de metilación de la región promotora LINC00473 en muestras de tejido colorrectal tiene una gran precisión diagnóstica para identificar pacientes con cáncer colorrectal.

Es importante destacar que cuando estratificamos a los pacientes con cáncer colorrectal de acuerdo con su estadio en la Cohorte 1 (I: n=41; II: n=106; III: n=58; IV: n=35) y la Cohorte 2 (I: n=10; II: n=84; III: n=56; IV: n=28) (Figura 3), los resultados también mostraron niveles de metilación significativamente ($p < 0.0001$) más altos en cada etapa de pacientes con cáncer colorrectal en comparación con controles no tumorales (Cohorte 1, n=38; Cohorte 2, n= 93).

Ejemplo 2.1.2. El análisis de metilación del promotor de LINC00473 en tejidos colorrectales permite la identificación de adenomas y adenomas colorrectales avanzados.

Los niveles de metilación del ADN de la región promotora LINC00473 en tejidos colorrectales de 12 controles no tumorales, 12 adenomas y 12 pacientes con cáncer colorrectal (cohorte 3) se analizaron mediante pirosecuenciación con bisulfito y se expresaron como % de metilación. Estos resultados mostraron niveles de metilación significativamente ($p = 0.0036$) más altos en adenomas ($28.21 \% \pm$ %) que en controles sanos ($7.28 \% \pm 0.81 \%$) (Figura 4). Como era de esperar, los pacientes con cáncer colorrectal ($32.83 \% \pm 5.19 \%$) también mostraron diferencias significativas ($P = 0.002$) en los niveles de metilación con respecto a los controles no tumorales. Es importante destacar que los niveles de metilación de LINC00473 en adenomas fueron similares a los de los pacientes con cáncer colorrectal ($P = 0.3186$). Estos datos indican que los niveles de metilación de la región promotora de LINC00473 analizada en tejidos colorrectales son capaces de diferenciar entre individuos no tumorales y pacientes con adenomas, lo que sugiere que el estado de metilación del promotor LINC00473 puede ser útil para la detección temprana del cáncer colorrectal.

El análisis de los niveles de metilación de LINC00473 en las muestras de tejido colorrectal de muestras no tumorales y de adenomas de la Cohorte 3 mediante la curva característica operativa del receptor (ROC) mostró una precisión diagnóstica muy alta para diferenciar los adenomas de los controles no tumorales con un área bajo la curva (AUC) de 0.84 ($p = 0.0047$; IC 95 %: 0.66-1.00) (Figura 5). Estos resultados indican que el análisis del estado de metilación de la región promotora LINC00473 en muestras de tejido colorrectal tiene una gran precisión diagnóstica para identificar pacientes con adenomas colorrectales, que tienen riesgo de desarrollar cáncer colorrectal.

Además, para evaluar el estado de metilación de los adenomas colorrectales y los adenomas colorrectales avanzados, analizamos los niveles de metilación del ADN de la región promotora LINC00473 mediante pirosecuenciación con bisulfito en una nueva cohorte independiente de muestras de tejido con 10 controles no tumorales y 50 adenomas, que incluyó 20 adenomas colorrectales avanzados confirmados. Este análisis mostró niveles de metilación significativamente ($p < 0.0001$) más altos en los adenomas ($20.96 \% \pm 15.33 \%$) que en los controles sanos ($5.70 \% \pm 0.82 \%$). Específicamente, este análisis mostró niveles de metilación significativamente ($p < 0.0003$) más altos en adenomas colorrectales avanzados ($26.35 \% \pm 19.66 \%$) que en los controles ($5.70 \% \pm 0.82 \%$) (Figura 11). De hecho, el análisis de la curva característica operativa del receptor (ROC) también mostró una precisión diagnóstica muy alta para diferenciar los adenomas colorrectales avanzados de los controles no tumorales con un AUC de 0.88 ($p < 0.0008$; IC del 95 %: 0.75-1.00) (Figura 12). Estos resultados confirman que los niveles de metilación de la región promotora de LINC00473 son útiles para la detección de adenomas, específicamente para la detección de adenomas colorrectales avanzados.

Ejemplo 2.2. Biopsia líquida

Ejemplo 2.2.1. El análisis de metilación del promotor de LINC00473 en biopsia líquida detecta pacientes con cáncer colorrectal.

Los niveles de metilación del ADN (%) de la región promotora LINC00473 en plasma de 28 controles y 26 pacientes con cáncer colorrectal se analizaron mediante PCR en tiempo real mostrando niveles de metilación significativamente ($p < 0.0001$) más altos en pacientes con cáncer colorrectal ($25.87 \% \pm 32.73 \%$) que en los controles sanos ($0.003 \% \pm 0.009 \%$) (Figura 6). Se detectaron niveles de metilación más altos de LINC00473 en 21 de 26 (81 %) pacientes con

cáncer colorrectal con respecto a individuos sanos. Estos datos indican que los niveles de metilación de la región promotora de LINC00473 analizados en biopsia líquida son capaces de diferenciar entre individuos sanos y pacientes con cáncer colorrectal.

5 El análisis de los niveles de metilación de LINC00473 en plasma mediante la curva característica operativa del receptor (ROC) mostró una precisión diagnóstica muy alta para diferenciar pacientes con cáncer colorrectal de controles sanos con un área bajo la curva (AUC) de 0.87 ($p < 0.000$; IC 95 %: 0.76-0.99) (Figura 7). Con base en el análisis de la curva ROC y utilizando el valor del índice de Youden, se obtuvo un punto de corte de metilación para LINC00473 en plasma de 0.30 %, permitiendo la detección de cáncer colorrectal con una sensibilidad del 81 % (IC 95 %: 61 %-93 %) y una especificidad del 100 % (IC 95 %: 88-100) (Tabla 7). Utilizando este límite de nivel de metilación, se obtuvo un valor predictivo positivo (VPP) del 100 % y un valor predictivo negativo (VPN) del 85 % para la detección del cáncer colorrectal. Estos resultados indican que el análisis no invasivo en biopsia líquida del estado de metilación de la región promotora LINC00473 tiene una gran precisión diagnóstica para identificar pacientes con cáncer colorrectal. La Tabla 7 muestra las características del análisis de metilación de la región promotora LINC00473 como prueba de diagnóstico para la detección de cáncer colorrectal.

15

Tabla 7

Parámetros	Porcentaje (%)
Sensibilidad	81
Especificidad	100
PPV	100
VPN	85

VPP: valor predictivo positivo; VPN: Valor predictivo negativo

Además, también se evaluaron los niveles de metilación del ADN (%) de la región promotora LINC00473 en plasma de pacientes con cáncer colorrectal utilizando la metodología de PCR digital en gotas (ddPCR). Para ello, utilizamos 5 controles y 5 pacientes con cáncer colorrectal. Estos análisis mostraron niveles de metilación significativamente ($p = 0.005$) más altos en pacientes con cáncer colorrectal ($41.19 \% \pm 28.79 \%$) que en controles sanos ($0.0 \% \pm 0.0 \%$) (Figura 13). Se detectaron niveles de metilación más altos de LINC00473 en 5 de 5 (100 %) pacientes con cáncer colorrectal con respecto a individuos sanos, lo que indica que los niveles de metilación de la región promotora de LINC00473 analizada en biopsia líquida mediante ddPCR también son capaces de diferenciar entre individuos sanos y pacientes con cáncer colorrectal. Además, el análisis de la curva característica operativa del receptor (ROC) mostró que los niveles de metilación de LINC00473 en plasma obtenidos mediante ddPCR tenían una precisión diagnóstica muy alta para diferenciar a los pacientes con cáncer colorrectal de los controles sanos con un área bajo la curva (AUC) de 1.0 ($p < 0.0062$; IC 95 %: 1.0-1.0) (Figura 14). Estos resultados indican que el análisis no invasivo en biopsia líquida del estado de metilación de la región promotora LINC00473 mediante ddPCR tiene una gran precisión diagnóstica para identificar pacientes con cáncer colorrectal.

30 **Ejemplo 2.2.2. Los niveles de metilación del ADN de la región promotora de LINC00473 en la biopsia líquida predicen el resultado de los pacientes con cáncer colorrectal.**

Se estudió el impacto clínico sobre la supervivencia de los niveles de metilación del promotor LINC00473 en muestras de plasma de 25 pacientes con cáncer colorrectal de la Tabla 2 con datos clínicos disponibles. Los pacientes con cáncer colorrectal se clasificaron con respecto al nivel medio de metilación del grupo (nivel de metilación del 10 %) como presentando i) Alto nivel de metilación en LINC00473 (H: nivel de metilación $> 10 \%$) o ii) Bajo nivel de metilación en LINC00473 (L: nivel de metilación $< 10 \%$). De acuerdo con esta clasificación de los pacientes, el análisis de Kaplan-Meier mostró que la presencia de altos niveles de metilación en LINC00473 se asoció significativamente con una supervivencia general (SG) más corta [cociente de riesgo (HR) = 3.37, intervalo de confianza (IC) del 95 % = 1.19-9.93, $P = 0.0256$] (Figura 8). Estos resultados muestran que el estado de metilación de LINC00473 en biopsia líquida es capaz de predecir el resultado clínico de pacientes con cáncer colorrectal, lo que sugiere que el análisis de la metilación de LINC00473 en plasma podría ser útil como biomarcador de pronóstico en el momento del diagnóstico de cáncer colorrectal.

40

Ejemplo 2.2.3. El análisis de metilación del promotor de LINC00473 en biopsia líquida detecta pacientes con adenoma colorrectal avanzado.

5 Los niveles de metilación del ADN (%) de la región promotora LINC00473 en plasma de 5 controles sanos y 12 pacientes con adenoma colorrectal avanzado se analizaron mediante PCR en tiempo real que muestra niveles de metilación significativamente ($p=0.0262$) más altos en pacientes con adenoma colorrectal avanzado ($0.0676\% \pm 0.1195\%$) que en los controles sanos ($0.0001\% \pm 0.0002\%$) (Figura 9). Estos datos indican que los niveles de metilación de la región promotora de LINC00473 analizados en biopsia líquida son capaces de diferenciar entre individuos sanos y pacientes con adenoma colorrectal avanzado.

10 El análisis de los niveles de metilación de LINC00473 en plasma mediante la curva característica operativa del receptor (ROC) mostró una precisión diagnóstica muy alta para diferenciar pacientes con adenoma colorrectal avanzado de controles sanos con un área bajo la curva (AUC) de 0.85 ($p=0.00269$; IC 95 %: 0.65-1.0) (Figura 10). De acuerdo con el análisis de la curva ROC, se obtuvo un límite de metilación para LINC00473 en plasma de 0.000115, lo que permite la detección de adenoma avanzado con una sensibilidad del 92 % y una especificidad del 80 % (Tabla 8). Utilizando este límite de nivel de metilación, se obtuvo un VPP del 92 % y un VPN del 80 % para la detección del adenoma colorrectal avanzado. Estos resultados indican que el análisis no invasivo en biopsia líquida del estado de metilación de la región promotora LINC00473 tiene una gran precisión diagnóstica para identificar pacientes con adenomas colorrectales avanzados. La Tabla 8 muestra las características del análisis de metilación de la región promotora LINC00473 como prueba diagnóstica para la detección de adenoma colorrectal avanzado.

Tabla 8

Parámetros	Porcentaje (%)
Sensibilidad	92
Especificidad	80
PPV	92
VPN	80

VPP: valor predictivo positivo; VPN: valor predictivo negativo

20 Además, los niveles de metilación del ADN (%) de la región promotora LINC00473 en plasma también se evaluaron mediante PCR digital en gotitas en 5 controles sanos y 10 pacientes con adenoma colorrectal avanzado. Estos resultados mostraron niveles de metilación significativamente ($p=0.038$) más altos en pacientes con adenoma colorrectal avanzado ($0.94\% \pm 0.99\%$) que en controles sanos ($0.0\% \pm 0.0\%$) (Figura 15), lo que indica que los niveles de metilación de la región promotora de LINC00473 analizado en biopsia líquida mediante ddPCR también es capaz de diferenciar entre individuos sanos y pacientes con adenoma colorrectal avanzado.

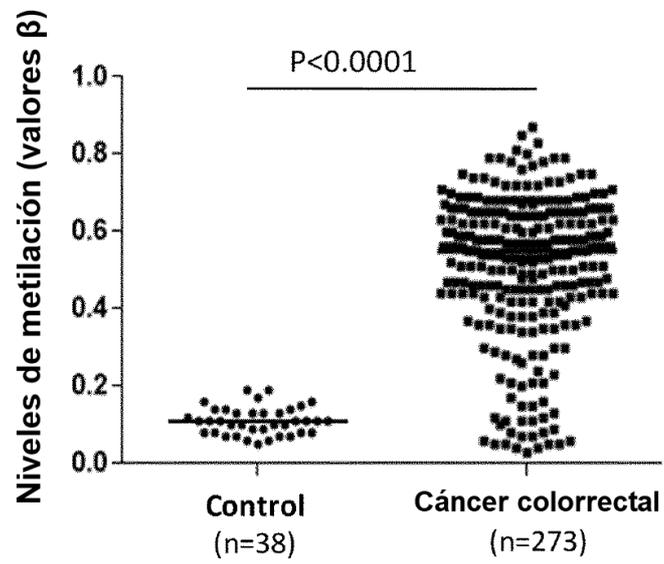
25

REIVINDICACIONES

- 5 1. Método in vitro para el diagnóstico de cáncer colorrectal y/o un estadio precanceroso del mismo, que comprende determinar el estado de metilación de al menos el gen LINC00473 en una biopsia líquida obtenida del paciente, donde se detecta un mayor nivel de metilación del gen LINC00473, en comparación con un nivel de referencia de metilación del gen LINC00473 medido en sujetos de control sanos, es una indicación de que el sujeto padece cáncer colorrectal y/o un estadio precanceroso del mismo.
- 10 2. Método in vitro para el pronóstico del cáncer colorrectal, o para predecir el resultado clínico de pacientes con cáncer colorrectal, que comprende determinar el estado de metilación de al menos el gen LINC00473 en una biopsia líquida obtenida del paciente, en el que se detecta un mayor nivel de metilación del gen LINC00473, en comparación con un nivel de referencia de metilación del gen LINC00473 medido en pacientes de control, es una indicación de que el paciente tiene un mal pronóstico o mal resultado clínico.
- 15 3. Método in vitro, de acuerdo con cualquiera de las reivindicaciones anteriores, donde la biopsia líquida es una muestra de plasma, sangre o suero.
4. Método in vitro, de acuerdo con cualquiera de las reivindicaciones anteriores, donde el estadio precanceroso es adenoma colorrectal, preferiblemente adenoma colorrectal avanzado.
5. Método in vitro, de acuerdo con cualquiera de las reivindicaciones anteriores, donde se determina el estado de metilación del gen LINC00473 en al menos un CpG de la región promotora.
- 20 6. Método in vitro, de acuerdo con cualquiera de las reivindicaciones anteriores, donde el estado de metilación del gen LINC00473 se determina en al menos un CpG de la región promotora situada entre las posiciones cromosómicas Chr6:166402081 y Chr6:166402638.
- 25 7. Método in vitro, de acuerdo con cualquiera de las reivindicaciones anteriores, donde el estado de metilación del gen LINC00473 se determina en al menos un CpG de la región promotora situada en una posición cromosómica seleccionada del grupo que comprende: Chr6: 166402638, y/o Chr6: 166402474, y/o Chr6: 166402463, y/o Chr6: 166402457, y/o Chr6: 166402416, y/o Chr6: 166402379, y/o Chr6: 166402375, y/o Chr6: 166402364, y/o Chr6: 166402081, preferiblemente un CpG seleccionado del grupo que comprende: cg06545143, y/o cg08886973 y/o cg21306006.
- 30 8. Método in vitro, de acuerdo con cualquiera de las reivindicaciones anteriores, donde el diagnóstico del cáncer colorrectal y/o de un estadio precanceroso del mismo se confirma mediante una técnica de imagen, preferiblemente colonoscopia.
9. Uso in vitro de al menos el estado de metilación del gen LINC00473 para el diagnóstico y/o pronóstico y/o para predecir el resultado clínico del cáncer colorrectal y/o un estadio precanceroso del mismo.
10. Uso in vitro de un kit que comprende reactivos para la determinación de al menos el estado de metilación del gen LINC00473 para el diagnóstico y/o pronóstico y/o para predecir el resultado clínico del cáncer colorrectal y/o un estadio precanceroso del mismo.
- 35 11. Uso in vitro, de acuerdo con cualquiera de las reivindicaciones 9 ó 10, donde el estadio precanceroso es adenoma colorrectal, preferiblemente adenoma colorrectal avanzado.
12. Uso in vitro, de acuerdo con cualquiera de las reivindicaciones 9 a 11, donde el estado de metilación del gen LINC00473 se determina en al menos un CpG de la región promotora.
- 40 13. Uso in vitro, de acuerdo con cualquiera de las reivindicaciones 9 a 12, donde el estado de metilación del gen LINC00473 se determina en al menos un CpG de la región promotora situada entre las posiciones cromosómicas Chr6: 166402081 y Chr6: 166402638.
- 45 14. Uso in vitro, de acuerdo con cualquiera de las reivindicaciones 9 a 13, donde el estado de metilación del gen LINC00473 se determina en al menos un CpG de la región promotora situada en una posición cromosómica seleccionada del grupo que comprende: Chr6: 166402638, y/o Chr6: 166402474, y/o Chr6: 166402463, y/o Chr6: 166402457, y/o Chr6: 166402416, y/o Chr6: 166402379, y/o Chr6: 166402375, y/o Chr6: 166402364, y/o Chr6: 166402081, preferiblemente un CpG seleccionado del grupo que comprende: cg06545143, y/o cg08886973 y/o cg21306006.
- 50 15. Uso in vitro, de acuerdo con cualquiera de las reivindicaciones 9 a 14, donde el diagnóstico del cáncer colorrectal y/o de un estadio precanceroso del mismo se confirma mediante una técnica de imagen, preferiblemente colonoscopia.

Figura 1

A)



B)

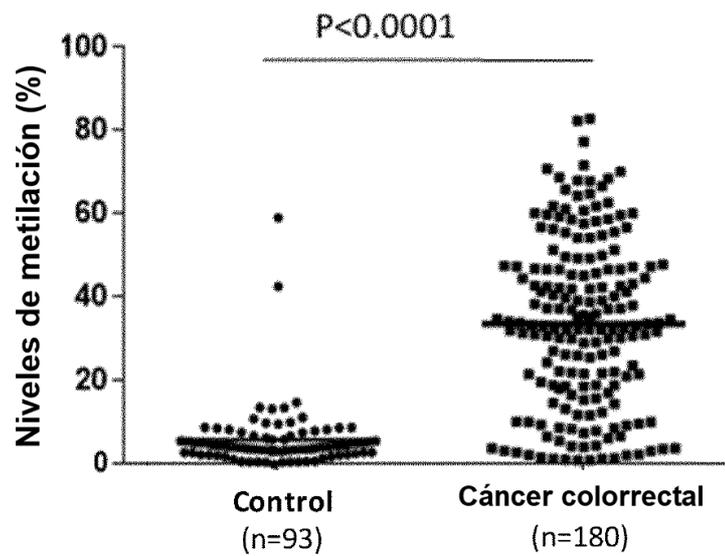
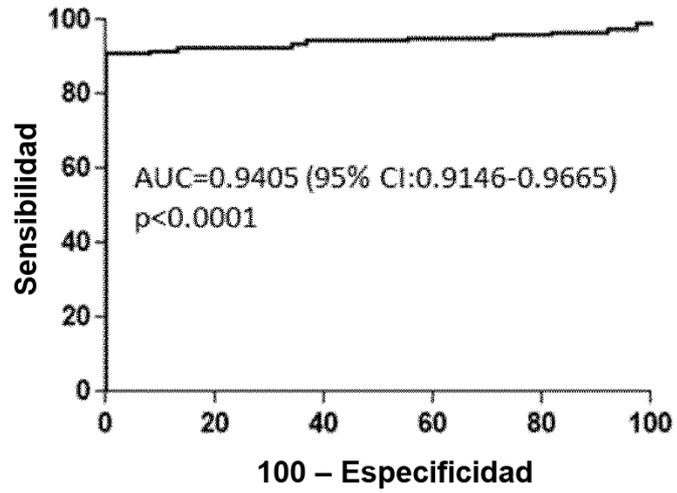


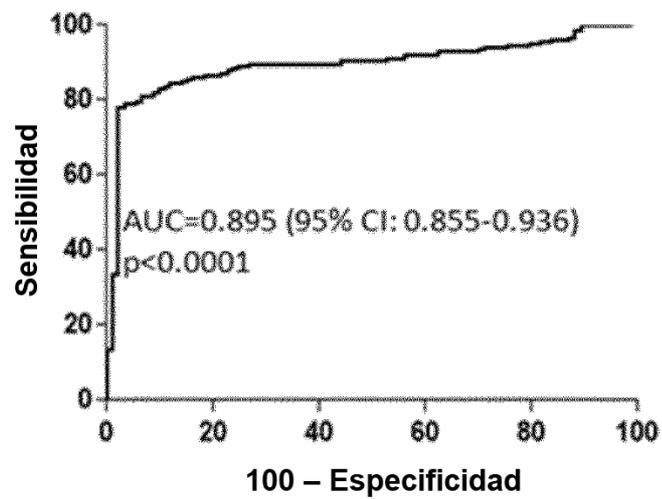
Figura 2

A)



(Control = 38; Cáncer colorrectal 273)

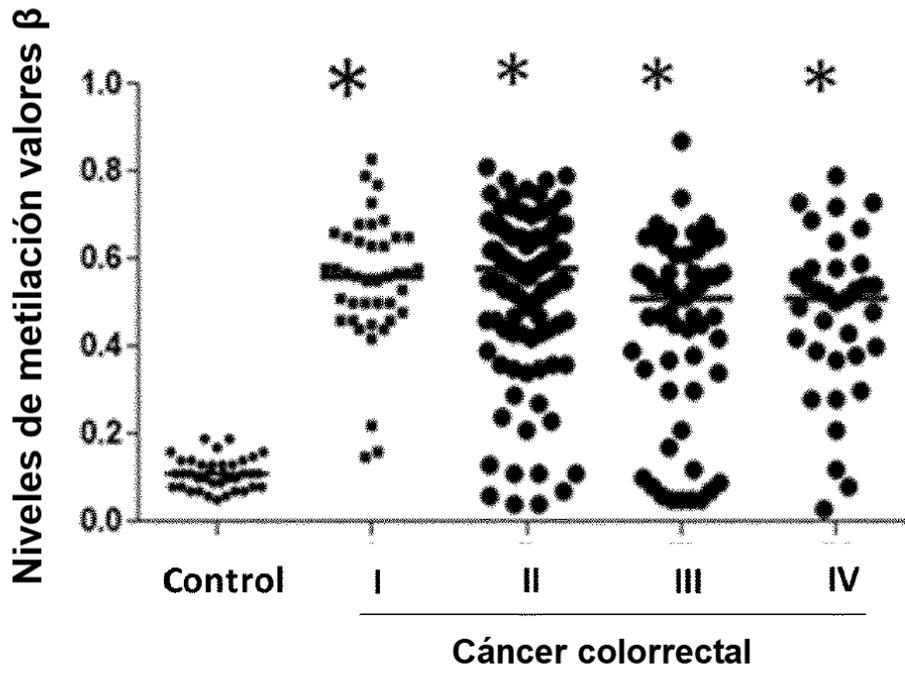
B)



(Control = 93; Cáncer colorrectal 180)

Figura 3

A)



B)

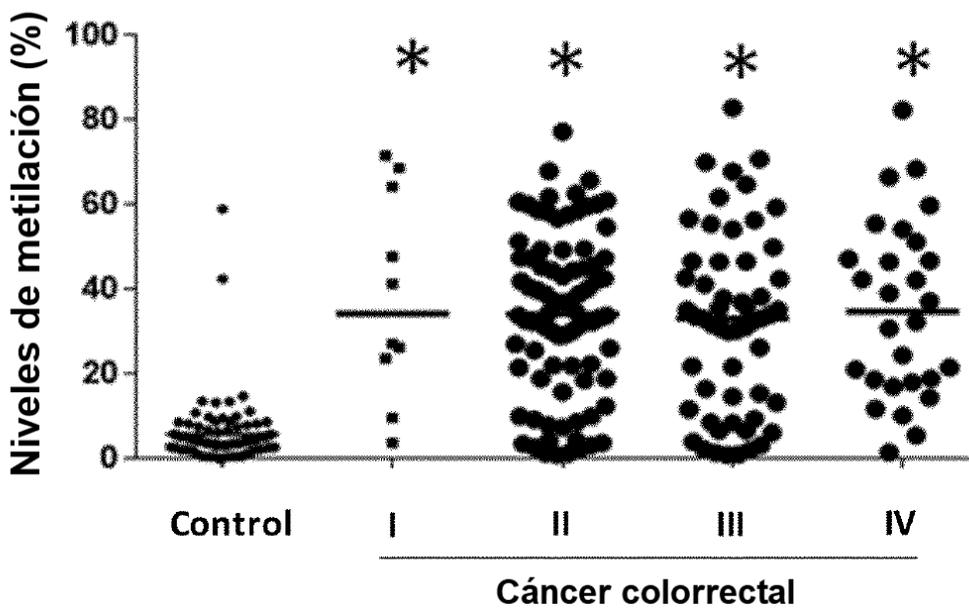


Figura 4

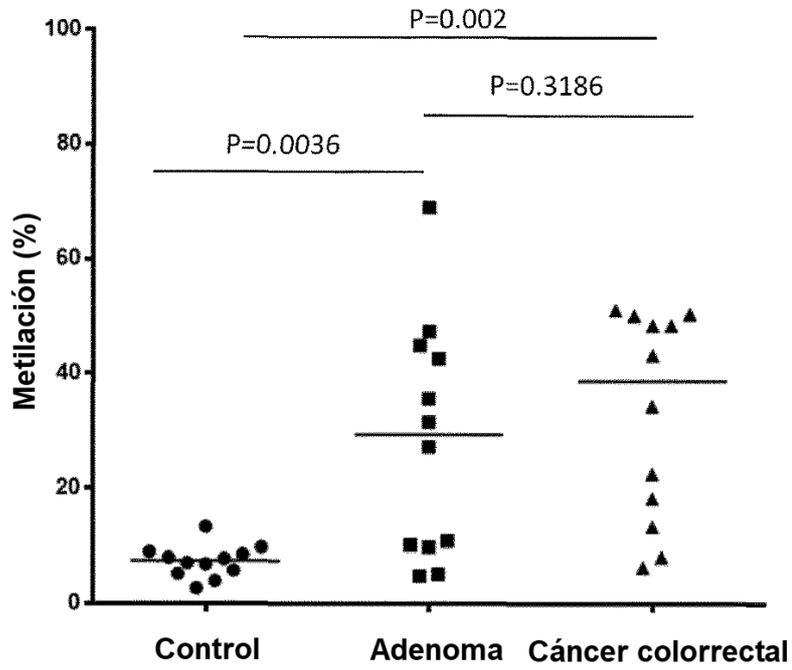


Figura 5

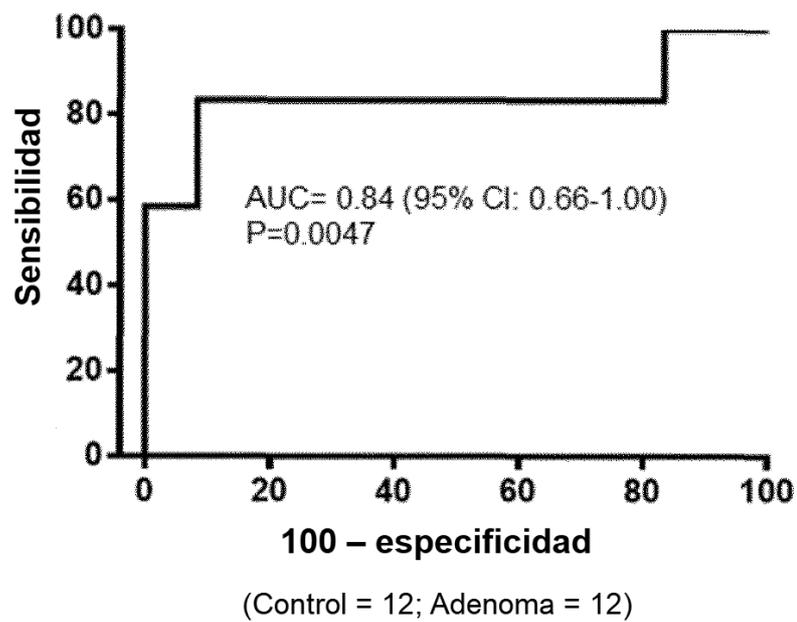


Figura 6

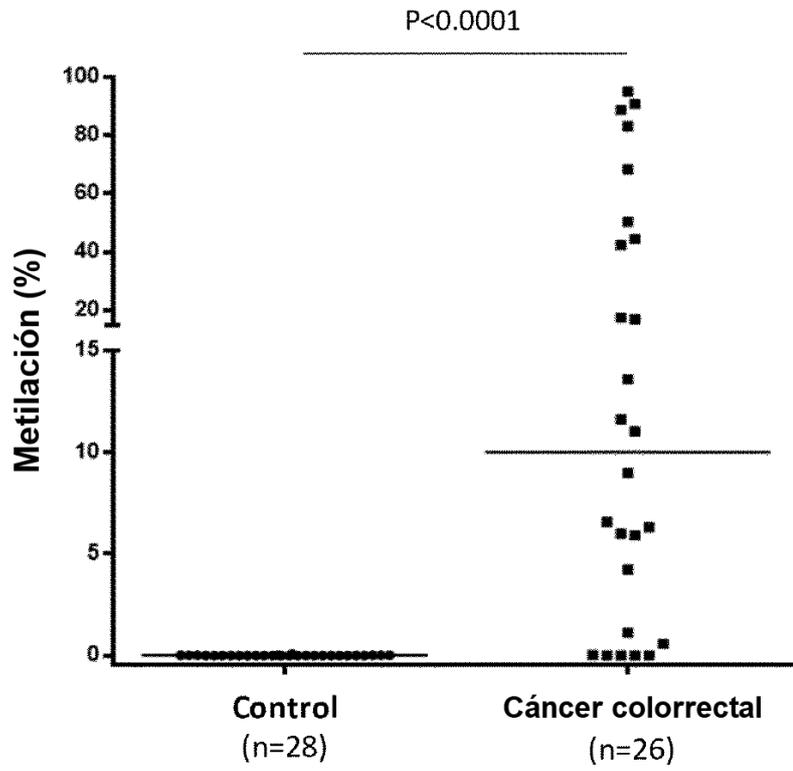


Figura 7

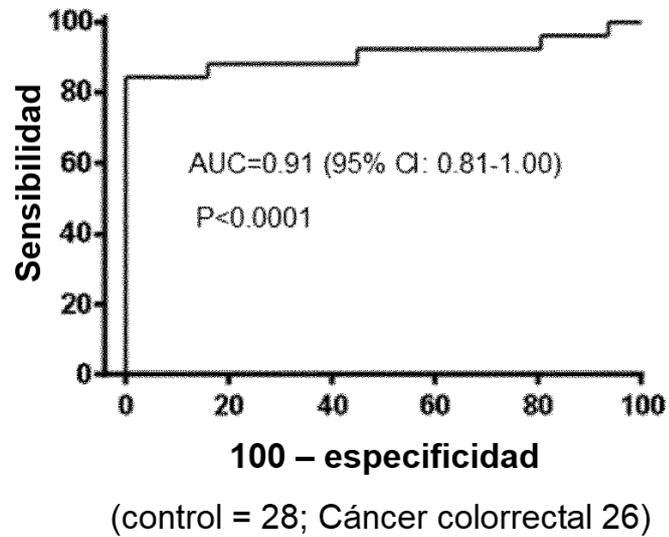


Figura 8

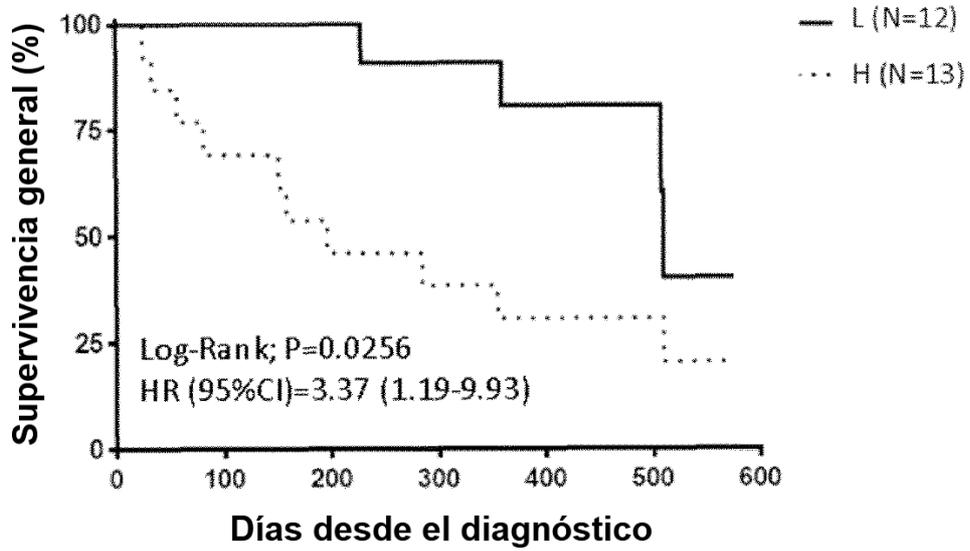


Figura 9

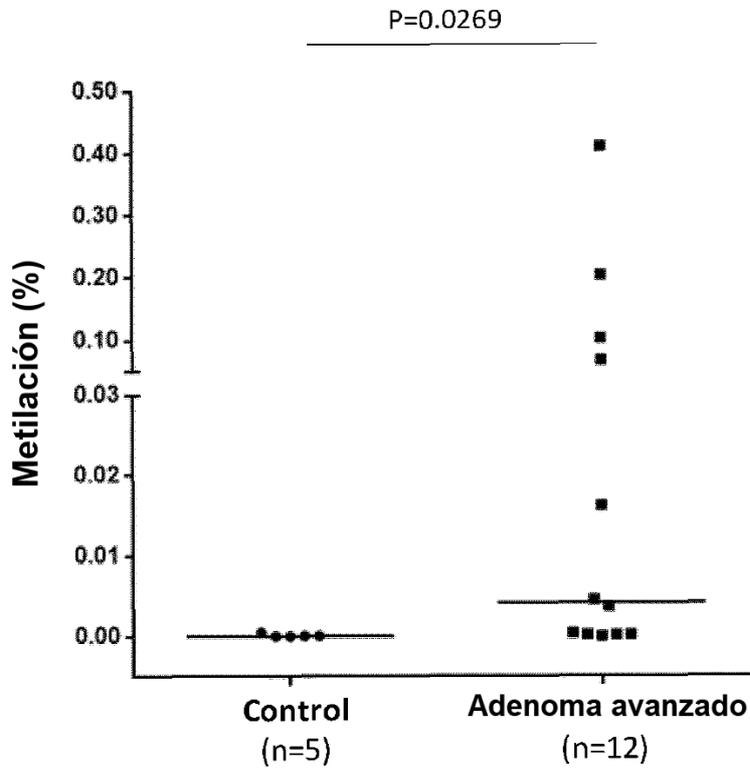


Figura 10

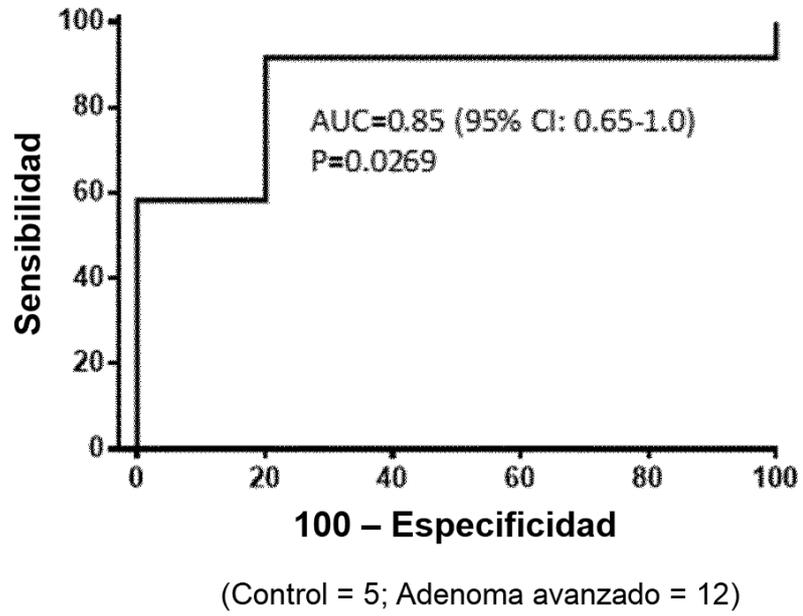


Figura 11

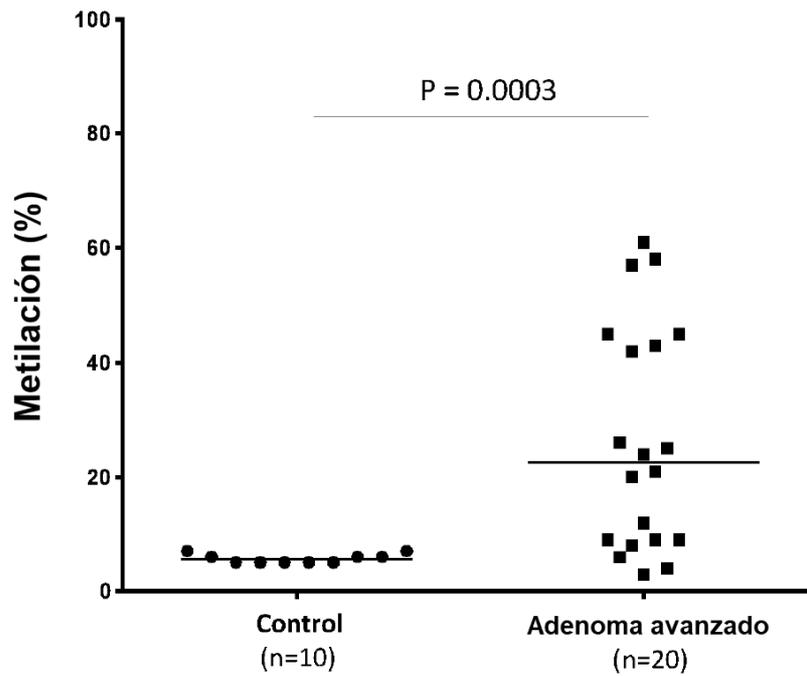
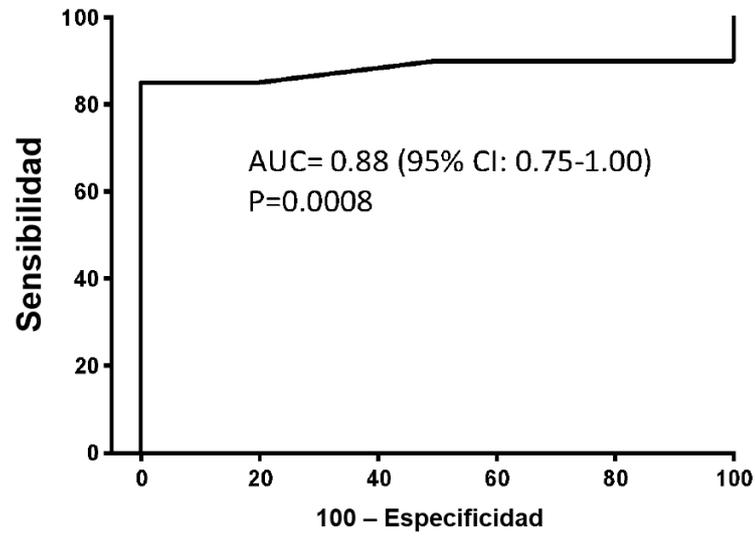


Figura 12



(Control = 10; Adenoma avanzado = 20)

Figura 13

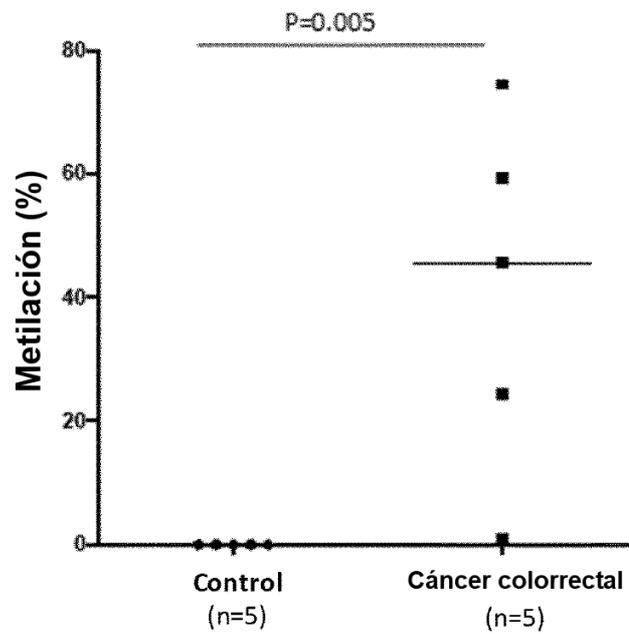


Figura 14

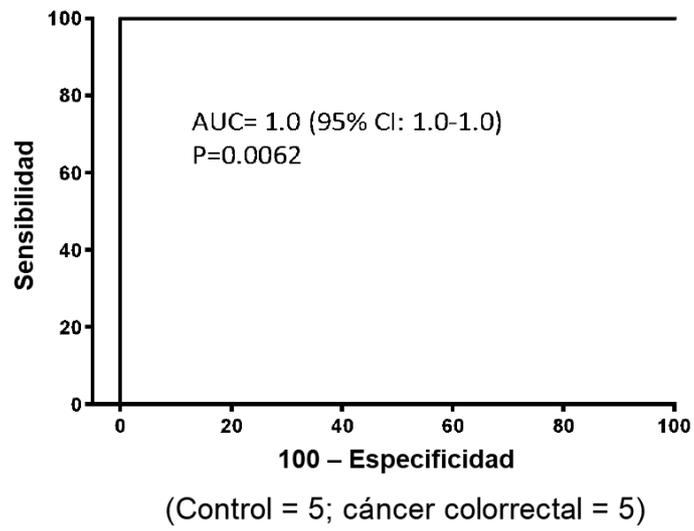


Figure 15

