



OFICINA ESPAÑOLA DE  
PATENTES Y MARCAS

ESPAÑA

① Número de publicación: **2 346 503**

② Número de solicitud: 200803127

⑤ Int. Cl.:  
**C12Q 1/68** (2006.01)

⑫

PATENTE DE INVENCION

B1

⑫ Fecha de presentación: **03.11.2008**

⑬ Fecha de publicación de la solicitud: **15.10.2010**

Fecha de la concesión: **21.07.2011**

⑮ Fecha de anuncio de la concesión: **03.08.2011**

⑯ Fecha de publicación del folleto de la patente:  
**03.08.2011**

⑰ Titular/es: **FINA BIOTECH, S.L.U.**  
**Camino de las Huertas, 2 - Edificio I**  
**28223 Pozuelo de Alarcón, Madrid, ES**

⑱ Inventor/es: **Capellá Munar, Gabriel;**  
**Azuara García, Daniel y**  
**Esteller Badosa, Manel**

⑳ Agente: **Carpintero López, Mario**

㉑ Título: **Método de diagnóstico de cáncer colorectal.**

㉒ Resumen:

Método de diagnóstico de cáncer colorectal.

El objeto de la presente invención se refiere a un método *in vitro* para diagnosticar cáncer colorectal basado en la determinación, en una muestra biológica obtenida de un sujeto, del estado de metilación del promotor de al menos uno de los genes APC, RARB2 y p14 y, opcionalmente, MGMT y p16. Asimismo, es objeto de la presente invención un kit para llevar a cabo el método de la invención.

ES 2 346 503 B1

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

## DESCRIPCIÓN

Método de diagnóstico de cáncer colorrectal.

5 **Campo de la invención**

La presente invención tiene su campo de aplicación dentro del sector sanitario, en el campo de la Biología Molecular. En concreto, esta invención está dirigida a un método de diagnóstico precoz de cáncer colorrectal y a un kit para su desarrollo.

10 **Antecedentes de la invención**

El cáncer colorrectal (CCR) es la tercera forma más común del cáncer y la segunda causa principal de muerte relacionada con el cáncer en el mundo occidental. Su evolución natural (se cree que se produce una secuencia de adenoma-carcinoma en la mayoría de los pacientes) y accesibilidad mediante métodos no quirúrgicos lo hacen adecuado para la detección y prevención precoz.

La detección precoz mejora enormemente las posibilidades de cura. La colonoscopia es una prueba extremadamente específica y sensible que puede considerarse como el método de referencia para el diagnóstico precoz de CCR [44,45] y se recomienda habitualmente que se realice en intervalos de 10 años para la detección, comenzando normalmente a la edad de 50 años [1]. Sin embargo, es una prueba invasiva que requiere una buena preparación intestinal y voluntad del paciente. También está asociada con un pequeño riesgo de complicaciones significativas, lo que reduce su uso generalizado.

Se considera generalmente que la prueba de sangre oculta en heces (*Fecal occult blood testing*, FOBT) es la mejor prueba de detección no invasiva para CCR, ya que reduce la mortalidad relacionada con el cáncer cuando se usa de manera programada [2]. Sin embargo, su sensibilidad es bastante baja (15% para adenomas y 35% para carcinomas), lo que implica que una parte sustancial de neoplasias colorrectales pasan desapercibidas [1]. Además, presenta una baja especificidad, dando lugar a muchos falsos positivos. Además, algunas pruebas requieren que los pacientes cambien su dieta, lo que reduce potencialmente su empleo [46-47].

En este contexto, las pruebas de ADN en muestras no invasivas aparecen como un enfoque viable que puede complementar y probablemente superar otras pruebas de detección para CCR [3-5] [23-26], aunque hasta el momento, su aplicación clínica rutinaria es todavía tema de discusión [6-7, 27].

El ADN parece ser estable en las heces, y aunque estén presentes inhibidores de PCR, las etapas de purificación han permitido de manera sistemática realizar análisis basados en PCR en una alta proporción de muestras [28-30]. Esta proporción es mayor cuando se diagnostican lesiones, especialmente carcinomas colorrectales. Las muestras de heces en sujetos con CCR pueden contener más células exfoliadas y/o ADN amplificable [31].

La mayoría de los estudios publicados hasta ahora usando el ADN de heces han detectado mutaciones en genes o marcadores individuales (p. ej., *K-ras*, *p53*, *APC* o *BAT26*) [16,26,32-33] con sensibilidad y especificidad aceptables, aunque variables. Otros han postulado el uso de un panel de ensayo de mutación de múltiples dianas que, en un gran entorno de detección, demostró una sensibilidad del 51,6% para carcinomas y del 32,5% para adenomas con displasia de grado alto [29]. Estos resultados prometedores están asociados con una reducción moderada de la especificidad (95%), debido a la detección de mutaciones en cólonos endoscópicamente normales.

La metilación de los residuos de citosina de secuencias ricas en dinucleótidos citosina-guanina (islas CpG), situadas dentro de las regiones promotoras de genes, normalmente está asociada con el silenciamiento génico y se considera como un mecanismo de inactivación de genes del cáncer.

Los genomas de las células preneoplásicas, cancerosas y envejecidas comparten tres cambios importantes en los niveles de metilación, como eventos tempranos en el desarrollo de algunos tumores. Primero, la hipometilación de la heterocromatina que conduce a una inestabilidad genómica e incrementa los eventos de recombinación mitótica; segundo, hipermetilación de genes individuales y, finalmente hipermetilación de las islas CpG de genes constitutivos y genes supresores de tumores. Los dos niveles de metilación pueden presentarse en forma individual o simultánea. En general, la hipermetilación está involucrada con el silenciamiento de genes y la hipometilación con la sobre-expresión de ciertas proteínas involucradas en los procesos de invasión y metástasis.

La hipermetilación de los promotores de muchos genes, tales como *p16<sup>INK4a</sup>*, *p14<sup>ARF</sup>*, *APC*, *MGMT*, *LKB1*, *hMLH1*, *RASSF1A*, *CRBP1*, *RARB2* [8-10], es un acontecimiento habitual y temprano en la tumorigénesis colorrectal.

En los últimos años, los cambios en la metilación de los residuos de citosina de secuencias ricas en CpG (islas CpG) se han reconocido cada vez más como aberraciones moleculares muy habituales con supuesta utilidad clínica [34]. En el cáncer colorrectal, los marcadores metilados son interesantes para la detección porque se producen con alta frecuencia en la neoplasia de fase temprana [35]. Se ha propuesto la detección de la metilación de islas CpG en ADN humano aislado de heces [11-12,36] o de suero [37-39] como una estrategia novedosa para el diagnóstico precoz de la neoplasia colorrectal. Así, se ha evaluado el estado de metilación de la región promotora de genes tales como *p16*,

## ES 2 346 503 B1

MGMT, MLH1, SFRP2, HIC1 y vimentina en el ADN de heces, bien solos o bien usando un panel combinado [11-15,25,40, 48-53]. La metilación de SFRP2 es, hasta ahora, el marcador individual más sensible (sensibilidad del 77-90%). Sin embargo, tanto los marcadores metilados individuales como los combinados han estado obstaculizados por una proporción relativamente alta de falsos positivos.

5 La evaluación de la hipermetilación de promotores de genes en el ADN de heces podría proporcionar un enfoque valioso para la detección no invasiva de lesiones colorrectales tempranas [11-15], Sin embargo, la falta de especificidad demostrada hasta ahora dificulta su posible utilidad clínica. El ADN resultante de la exfoliación del epitelio colónico en la materia fecal es difícilmente amplificable debido a la gran cantidad de inhibidores de PCR que se encuentra en las heces.

10 En base a las necesidades y dificultades actuales para establecer un diagnóstico precoz no invasivo del cáncer colorrectal con sensibilidad y especificidad suficiente, los autores de la invención han desarrollado un panel de biomarcadores de metilación en heces adecuados para su uso rutinario en la práctica clínica.

15 Así, tras un importante trabajo de investigación, han encontrado un panel de 5 marcadores metilados (*RARB2*, *MGMT*, *p16<sup>NK4a</sup>*, *APC* y *p14<sup>ARF</sup>*) que conjuntamente representan la mayoría de los tumores.

20 Tras hallar estos cinco marcadores, los autores de la invención, han desarrollado un nuevo método de diagnóstico precoz de cáncer colorrectal basado en el análisis de las curvas de disociación mediante detección por PCR a tiempo real (*RT PCR Melting curve*, MC) del estado de metilación de los promotores de los 5 genes: *RARB2*, *p16<sup>NK4a</sup>*, *MGMT*, *p14<sup>ARF</sup>* y *APC* en el ADN de heces, demostrando una alta sensibilidad en la detección precoz de tumores de CCR y una excelente especificidad (ningún falso positivo en colonoscopias normales).

25 Este nuevo método permite la detección no invasiva de alteraciones neoplásicas premalignas y malignas del colon con alta sensibilidad y excelente especificidad, permitiendo su uso rutinario en la práctica clínica.

### Breve descripción de las figuras

30 La figura 1 muestra las diferentes temperaturas de disociación según los marcadores y según el estado de metilación de la muestra (M: metilado; U: no metilado).

En la figura 2 se muestra la prevalencia de la metilación en los diferentes marcadores analizados en el estudio en el ADN fecal (a) y en el tejido (b) en el conjunto de validación.

### Objeto de la invención

35 El objeto de la presente invención se refiere a un método *in vitro* para diagnosticar cáncer colorrectal basado en la determinación, en una muestra biológica obtenida de un sujeto, del estado de metilación del promotor de al menos uno de los genes APC, RARB2 y p14 y, opcionalmente, MGMT y p16.

Asimismo, es objeto de la presente invención un kit para llevar a cabo el método de la invención.

### Descripción de la invención

45 Un aspecto principal de la invención contempla un método *in vitro* para diagnosticar cáncer colorrectal que comprende a) obtener una muestra biológica de un sujeto; y b) determinar en la muestra biológica el estado de metilación del promotor de al menos uno de los siguientes genes: APC, RARB2 y p14, donde la metilación de los promotores de dichos genes es indicativo de dicha enfermedad.

50 En la presente invención, el término sujeto se refiere a un ser humano.

En una realización particular, el método comprende determinar adicionalmente el estado de metilación del promotor de un gen seleccionado entre p16 y MGMT y su combinación.

55 El gen **APC** (adenomatous polyposis coli) (también denominado GS; DP2; DP3; BTPS2; DP2.5), localizado en 5q21-q22, n° acceso NCBI M74088.1, codifica una proteína supresora de tumores que actúa como antagonista de la vía de señalización Wnt. Está además implicada en otros procesos como la migración y adhesión celular, activación transcripcional y apoptosis. Su inactivación se considera una alteración presente en la inmensa mayoría de los tumores colorrectales.

60 El gen **RARB** (Retinoic acid receptor Beta) (también denominado HAP, NR1B2, RRB2), localizado en 3p24, n° acceso NCBI Y00291.1 codificada una proteína miembro de la superfamilia de receptores hormonales tiroide/esteroide de reguladores transcripcionales nucleares. El gen se expresa a partir de dos promotores distintos, los cuales presentan islas CpG distintas. RARB1 se expresa principalmente durante la embriogénesis, mientras que RARB2 se expresa en tejidos adultos y está hipermetilado en células cancerígenas.

## ES 2 346 503 B1

5 EL gen **p16** (cyclin-dependent kinase inhibitor 2A) (CDKN2A), nº acceso L27211.1, es un gen supresor de tumores. Por ello, mutaciones en este gen incrementan el riesgo de desarrollo de una amplia variedad de tipos de cáncer, principalmente melanoma. El gen p16 tiene un marco de lectura alternativo (ARF) que codifica la proteína **p14<sup>arf</sup>**, implicada en estabilizar p53, y regulada positivamente por E2F. Ambos genes están implicados en la regulación del ciclo celular.

El gen **MGMT** (O-6-methylguanine-DNA methyltransferase), localizado en 10q26, nº acceso NCBI M29971.1. Este gen codifica una proteína cuya función es reparar lesiones del ADN, básicamente en el ámbito de la guanina.

10 En una realización preferida, el método de diagnóstico está basado en la determinación simultánea del estado de metilación de los promotores de los genes APC, RARB2, p16, MGMT y p14.

La muestra biológica a analizar, aislada previamente del sujeto, puede ser una muestra de sangre o de heces. De forma preferida, se emplean heces.

15 Para la determinación del estado de metilación de los promotores de los genes marcadores, se extrae el ADN de la muestra aislada.

20 En una realización particular, tras una extracción del ADN fecal, siguiendo un protocolo específico (17), se procede al análisis del estado de metilación de los marcadores indicados.

La determinación del estado de metilación de los promotores de los 5 genes se puede llevar a cabo mediante diferentes técnicas.

25 La PCR específica para metilación (MSP) es una técnica basada en PCR ampliamente usada que selecciona como diana el estado de metilación de un número limitado de residuos de CpG con una alta sensibilidad. Sin embargo, en línea con los resultados notificados anteriormente [41-43], se observan falsos positivos tanto en colonoscopiamente normales como en pacientes con Enfermedad Inflamatoria Intestinal (EII). La conversión incompleta tras el tratamiento con bisulfito de las CpG en muestras no metiladas, así como el sesgo de los alelos amplificados y la elevada sensibilidad analítica de la técnica, son las causas de la aparición de falsos positivos en los resultados.

30 En base a estas limitaciones, de forma preferida, en la presente invención la determinación de la metilación se lleva a cabo mediante el análisis de la curva de disociación (*Melting curve*, MC). El análisis de la MC de regiones promotoras detecta simultáneamente todos los residuos de CpG dentro una región amplificada.

35 Debido al contenido en citosina-guanina (CG) tras el tratamiento con bisulfito sódico de la muestra, las que estén metiladas presentarán una mayor temperatura de disociación (las bases CG se unen con 3 enlaces de puente de hidrógeno mientras que las bases adenosina-timina (AT) se unen con 2). De este modo para cada marcador se puede establecer unas temperaturas indicadoras de si la muestra se encuentra o no metilada.

40 Usando la tecnología MC, la evaluación del panel de marcadores de metilación en el ADN de heces identifica crecimientos premalignos y malignos con alta sensibilidad y excelente especificidad.

45 En otro aspecto principal de la invención se contempla un kit de diagnóstico de cáncer colorectal, para llevar a cabo el método de diagnóstico objeto de la invención. El kit comprende un set de cebadores (Tabla 1) adecuado para la determinación en una muestra biológica del estado de metilación del promotor de al menos uno de los genes APC, RARB2 y p14. Adicionalmente, el kit puede incluir cebadores para la determinación del estado de metilación del promotor de al menos uno de los genes p16 y MGMT.

50 De forma preferida, el Kit comprende un set de cebadores adecuado para la determinación simultánea del estado de metilación de los promotores de los genes APC, RARB2, p14, MGMT y p16.

### Ejemplos

#### 55 Materiales y métodos

##### *Pacientes y recogida de muestras fecales y tisulares*

##### *Análisis de tejidos tumorales*

60 Se usó un conjunto de biopsias de 250 tumores colorrectales primarios y muestras normales por parejas para evaluar la prevalencia de la metilación de promotores en 7 genes distintos (véase a continuación).

65 *Conjunto inicial.* Se obtuvieron de manera consecutiva muestras fecales recogidas tras el tratamiento laxante de 12 pacientes con carcinomas colorrectales primarios recientemente diagnosticados y 20 con adenomas antes de la colonoscopia de pacientes ingresados en el Hospital de la Santa Creu i Sant Pau para someterse a una colonoscopia con la sospecha clínica de cáncer. Se obtuvieron biopsias por parejas de las lesiones identificadas durante la colonoscopia y se almacenaron como muestras frescas congeladas.

## ES 2 346 503 B1

*Conjunto de validación.* Se recogieron heces de 28 pacientes con CCR esporádico, 23 pacientes con adenomas, 17 con enfermedad inflamatoria del intestino (EII) localizada en el colon (colitis ulcerosa y colitis de Crohn) y 20 sujetos macroscópicamente normales sometidos a cirugía o endoscopia en el Hospital Universitario de Bellvitge. Se recogieron muestras fecales de pacientes con CCR tras el tratamiento laxante antes de la cirugía colónica y durante la colonoscopia (enema) de los demás pacientes. Las heces se almacenaron a -80°C hasta que se trataron. Todos los pacientes dieron su consentimiento informado por escrito para participar y para que sus muestras biológicas fueran analizadas.

### Aislamiento de ADN y modificación con bisulfito

Todas las muestras tisulares y fecales se codificaron antes del almacenamiento, no teniendo el personal del laboratorio conocimiento del diagnóstico clínico de los pacientes. Se extrajo ADN del material tisular o celular obtenido tras la centrifugación del lavado intestinal o heces sólidas, tal como se describió anteriormente [16-17]. Se modificó químicamente 1 µg de ADN para convertir toda la citosina no metilada en uracilo mediante el kit EZ DNA methylation-gold (Zymo Research, Orange, CA) y se eluyó en 30 µL de tampón de elución. Se usó ADN de linfocitos normales tratados *in vitro* con metiltransferasa *Sssl* (New England Biolabs Inc., Beverly, MA) como control positivo de los alelos metilados, mientras que se usó ADN de linfocitos normales como control para los alelos no metilados.

### Análisis de metilación de ADN

#### PCR específica para metilación (MSP)

Se estudió la metilación de promotores en *RARB2*, *p16<sup>INK4a</sup>*, *MGMT*, *p14<sup>ARF</sup>*, *APC*, *hMLH1* y *LKB1* mediante MSP, un método que distingue los alelos no metilados de los metilados de un gen dado [18]. Tras el tratamiento con bisulfito del ADN, que convierte las citosinas no metiladas, pero no las metiladas, en uracilo, se amplifica el ADN mediante PCR usando cebadores específicos para secuencias metiladas y no metiladas. Los cebadores y las condiciones de PCR para el análisis de MSP se han descrito anteriormente para *RARB2*, *p16<sup>INK4a</sup>*, *MGMT*, *p14<sup>ARF</sup>*, *APC*, *hMLH1* y *LKB* [8-9, 19-21],

#### Curvas de disociación mediante detección por PCR a tiempo real (RT PCR melting curves)

Se detectó la presencia de ADN metilado en base a la temperatura de disociación mediante RT PCR. Analizamos los estados de metilación de 5 genes (*RARB2*, *p16<sup>INK4a</sup>*, *MGMT*, *p14<sup>ARF</sup>* y *APC*) (figura 1). Se realizó una PCR en todos los casos para obtener un fragmento de cada una de las islas CpG que iban a analizarse (véase las condiciones en la tabla 1) usando un Light Cycler<sup>®</sup>2.0 (Roche Applied Science) y el Fast Start DNA Master Sybr Green I mix (Roche Applied Science) con detección en tiempo real, tal como se describe [22].

TABLA 1

*Secuencia de los cebadores, tamaño de los productos, temperatura de anillamiento y CpGs internos para los ensayos de MC*

Gen	Secuencia 5'-3' del cebador	Tamaño del producto (pb)	Temperatura de anillamiento (°C)	CpGs internos
RARB2	SEQ ID NO 1	273	60	18
p16 <sup>INK4a</sup>	SEQ ID NO 2	254	62	28
MGMT	SEQ ID NO 3	216	60	22
p14 <sup>ARF</sup>	SEQ ID NO 4	224	64	26
APC	SEQ ID NO 5	192	62	16

Tras el tratamiento con bisulfito, una secuencia metilada conserva los pares CG mientras que una secuencia no metilada presenta cambios a pares TG. Este cambio en el contenido de CG da como resultado una variación de la temperatura de disociación de un fragmento de ADN particular. Basándose en las temperaturas de disociación respecto a unos controles, cuyo estado de metilación era previamente conocido, fue posible asignar un estado de metilación a las muestras sometidas a prueba. El ensayo de análisis de la curva de fusión-metilación solamente empleó un conjunto

de cebadores que no incluyeron CpG susceptibles de metilación en su secuencia, lo que aumentó la fiabilidad de la reacción. Este conjunto de cebadores (tabla 1) amplificó tanto la secuencia metilada como la no metilada después del tratamiento con bisulfito. La diferencia se hizo evidente en las curvas de disociación, ya que el producto metilado presenta una temperatura de disociación superior a la del producto no metilado.

5

## Resultados

### Metilación en tumores de CCR mediante MSP

10

La prevalencia de la hipermetilación de promotores en biopsias tumorales fue tal como sigue: *RARB2* (54%, 135 de 250), *p16<sup>INK4a</sup>* (35%; 88 de 250), *MGMT* (35%, 88 de 250), *p14<sup>ARF</sup>* (30%, 75 de 50), *APC* (20%, 50 de 250), *hMLH1* (15%, 38 de 250) y *LKB1* (5%, 13 de 250). Se obtuvieron resultados informativos para todos los tumores cuando se combinaron todos los marcadores analizados. En 100 casos, se analizó mucosa normal por parejas, observando un bajo porcentaje de metilación: *RARB2* (4%), *MGMT* (4%), *p16<sup>INK4a</sup>* (2%), *hMLH1* (2%), *p14<sup>ARF</sup>* (1%), *APC* (0%) y *LKB1* (0%). Finalmente, no se detectó metilación en el ADN extraído de linfocitos de sangre periférica (PBL, Peripheral Blood Lymphocytes) de donantes sanos.

15

### Conjunto de entrenamiento

#### Metilación en ADN fecal y tisular mediante MSP

Teniendo en cuenta los anteriores resultados, se seleccionaron los cinco marcadores más frecuentes para el análisis de ADN de heces (*RARB*, *p16*, *MGMT*, *p14* y *APC*). Encontramos que el 88% (28 de 32) de los tumores primarios (10 de 12 carcinomas y 18 de 20 adenomas) eran positivos para al menos un marcador de metilación (tabla 2). La mayoría de carcinomas (9 de 10) y una proporción inferior de adenomas (7 de 18) albergaron tres o más marcadores metilados. Se encontró hipermetilación de promotores en 25 de 32 (78%) casos para *RARB2*, 18 de 32 (56%) para *MGMT*, 18 de 32 (56%) casos para *p16<sup>INK4a</sup>*, 13 de 32 (40%) para *APC* y 10 de 32 (31%) para *p14<sup>ARF</sup>*. Solamente aumentó la hipermetilación de promotores de *p14<sup>ARF</sup>* y *APC* en carcinomas, en comparación con adenomas.

25

Se detectó metilación aberrante de ADN de heces en 1 o más marcadores en 9 de 12 (75%) carcinomas y en 12 de 20 adenomas (60%). Esta proporción varió entre los marcadores: 92% (12 de 13) para *APC*, 50% (9 de 18) para *p16<sup>INK4a</sup>*, 24% (6 de 25) para *RARB2*, 10% (1 de 10) para *p14<sup>ARF</sup>* y 11% (2 de 18) para *MGMT*. No se detectó metilación aberrante de promotores en el ADN recogido de los 4 tumores que no presentan metilación aberrante de genes. La sensibilidad de los marcadores de metilación para la detección de células tumorales era del 75% para carcinomas y del 60% para adenomas (tabla 2).

30

35

TABLA 2

Prevalencia de marcadores metilados en ADN de heces y biopsia por parejas en el conjunto inicial de muestras (resultados MSP)

40

	ADN de heces			Tejido		
	n	≥1 gen metilado	≥2 genes metilados	n	≥1 gen metilado	≥2 genes metilados
Adenomas	20	12(60%)	5(25%)	20	18(90%)	14(70%)
Carcinomas	12	9 (75%)	2(17%)	12	10(83%)	10(83%)

45

50

### Conjunto de validación

#### Metilación en ADN fecal y tisular mediante curvas de fusión

En primer lugar, se analizó ADN de biopsia y heces obtenido de voluntarios sanos y pacientes con EII mediante MSP. Una prevalencia anormalmente alta de metilación aberrante en los pacientes con EII, así como la identificación de una elevada proporción de casos positivos en donantes sanos, llevó a explorar el análisis de curvas de disociación como una alternativa a MSP. Usando este enfoque, se detectó al menos un marcador de metilación en el 79% de las biopsias de carcinomas (22 de 28) y el 70% de las de adenomas (16 de 23) (tabla 3).

55

60

65

## ES 2 346 503 B1

TABLA 3

*Prevalencia de marcadores metilados en ADN de heces y biopsia por parejas en el conjunto de validación (resultados MC)*

	ADN de heces			Tejido		
	n	≥1 gen metilado	≥2 genes metilados	n	≥1 gen metilado	≥2 genes metilados
Normal	20	0	0	20	0	0
EII	17	2(12%)	0	17	3(18%)	0
Adenomas	23	9(42%)	2(9%)	23	16(70%)	7(30%)
Carcinomas	28	18(64%)	7(25%)	28	22(79%)	9(32%)

La prevalencia para cada marcador, considerando adenomas y carcinomas conjuntamente, fue tal como sigue: 28 de 45 (62%) para *RARB2*, 10 de 51 (20%) para *p14<sup>ARF</sup>*, 7 de 36 (19%) para *APC*, 7 de 35 (20%) para *MGMT* y 3 de 48 (6%) para *p16<sup>INK4a</sup>*. Tres de 12 biopsias (25%) obtenidas de pacientes con EII fueron positivas para *RARB2* (figura 2b). Ninguna de las biopsias normales fue positiva para ninguno de los marcadores analizados (tabla 4).

En relación al ADN de heces, se detectó metilación aberrante en el 64% de los carcinomas (18 de 28) y en el 42% de los adenomas (9 de 23) (tabla 3), siendo la distribución de marcadores positivos tal como sigue: 34% (11 de 32) para *MGMT*, 30% (12 de 40) para *RARB2*, 25% (8 de 32) para *p16<sup>INK4a</sup>*, 20% (6 de 30) para *APC* y 3% (1 de 30) para *p14<sup>ARF</sup>*. De nuevo, en 2 de 15 (13%) pacientes con EII, se detectó hipermetilación de promotores de *RARB2* (figura 2a). No se detectó ningún marcador metilado cuando la colonoscopia era normal (tabla 4).

TABLA 4

*Prevalencia de los 5 marcadores metilados en ADN de heces y biopsia por parejas en el conjunto de validación (resultados MC)*

	MUESTRA	p14	p16	RARB2	APC	MGMT
NORMAL	HECES	0%	0%	0%	0%	0%
	TEJIDO	0%	0%	0%	0%	0%
INFLAMATORIA	HECES	0%	0%	2/15(13%)	0%	0%
	TEJIDO	0%	0%	3/12(25%)	0%	0%
AD+T	HECES	1/30(3%)	8/32(25%)	12/40(30%)	6/30(20%)	11/32(34%)
	TEJIDO PATOL	10/51(20%)	3/48(6%)	28/45(62%)	7/36(19%)	7/35(20)

La amplificación para cada marcador en individuos sanos fue tal como sigue: 15 de 16 (94%) para *MGMT*, 13 de 16 (81%) para *RARB2*, 15 de 20 (75%) para *APC*, 12 de 20 (60%) para *p16<sup>INK4a</sup>* y 8 de 20 (40%) para *p14<sup>ARF</sup>* (tabla 5).

TABLA 5

*Amplificación de los 5 marcadores en individuos sanos*

	MUESTRA	p14	p16	RARB2	APC	MGMT
NORMAL	HECES	8/20 (40%)	12/20(60%)	13/16(81%)	15/20(75%)	15/16(94%)
	N=20 TEJIDO	20/20 (100%)	20/20(100%)	15/16(94%)	15/15(100%)	15/16(94%)
INFLAMATORIA	HECES	13/17(76%)	11/15(73%)	15/17(88%)	7/11(64%)	12/15(80%)
	N=18 TEJIDO	15/18(100%)	13/14(93%)	12/13(92%)	12/13(92%)	9/10(90%)
ADENOMA	HECES	13/23(57%)	14/23(61%)	18/18(100%)	14/19(74%)	16/17(94%)
	N=23 TEJIDO N	22/23(96%)	23/23(100%)	21/21(100%)	13/14(92%)	18/18(100%)
TUMOR	HECES	17/30(57%)	18/30(60%)	22/23(96%)	16/21(76%)	16/21(76%)
	N=30 TEJIDO T	29/30(97%)	29/30(97%)	26/27(96%)	22/25(88%)	21/21(100%)

## Bibliografía

- 1 **Winawer S, Fletcher R, Rex D, et al.** Colorectal cancer screening and surveillance: clinical guidelines and rationale-Update based on new evidence. *Gastroenterology* 2003; **124**:544-60.
- 5 2 **Mandel JS, Church TR, Bond JH, et al.** The effect of fecal occult-blood screening on the incidence of colorectal cancer. *The New England journal of medicine* 2000; **343**:1603-7.
- 10 3 **Dong SM, Traverso G, Johnson C, et al.** Detecting colorectal cancer in stool with the use of multiple genetic targets. *J Natl Cancer Inst* 2001; **93**:858-65.
- 4 **Ahlquist DA.** Stool-based DNA tests for colorectal cancer: clinical potential and early results. *Rev Gastroenterol Disord* 2002; **2 Suppl 1**:S20-6.
- 15 5 **Traverso G, Shuber A, Levin B, et al.** Detection of APC mutations in fecal DNA from patients with colorectal tumors. *N Engl J Med* 2002; **346**:311-20.
- 6 **Brenner DE, Rennert G.** Fecal DNA biomarkers for the detection of colorectal neoplasia: attractive, but is it feasible? *J Natl Cancer Inst* 2005; **97**:1107-9.
- 20 7 **Capella G.** Is fecal DNA testing superior to fecal occult-blood testing for colorectal cancer screening? *Nat Clin Pract Oncol* 2005; **2**:234-5.
- 8 **Esteller M, Fraga MF, Guo M, et al.** DNA methylation patterns in hereditary human cancers mimic sporadic tumorigenesis. *Human molecular genetics* 2001; **10**:3001-7.
- 25 9 **Esteller M, Corn PG, Baylin SB, et al.** A gene hypermethylation profile of human cancer. *Cancer research* 2001; **61**:3225-9.
- 30 10 **Esteller M, Guo M, Moreno V, et al.** Hypermethylation-associated inactivation of the Cellular Retinol-Binding-Protein 1 Gene in Human Cancer. *Cancer research* 2002; **62**:5902-5.
- 11 **Belshaw NJ, Elliott GO, Williams EA, et al.** Use of DNA from human stools to detect aberrant CpG island methylation of genes implicated in colorectal cancer. *Cancer Epidemiol Biomarkers Prev* 2004; **13**:1495-501.
- 35 12 **Leung WK, To KF, Man EP, et al.** Detection of epigenetic changes in fecal DNA as a molecular screening test for colorectal cancer: a feasibility study. *Clinical chemistry* 2004; **50**:2179-82.
- 13 **Muller HM, Oberwalder M, Fiegl H, et al.** Methylation changes in faecal DNA: a marker for colorectal cancer screening? *Lancet* 2004; **363**:1283-5.
- 40 14 **Petko Z, Ghiassi M, Shuber A, et al.** Aberrantly methylated CDKN2A, MGMT, and MLH1 in colon polyps and in fecal DNA from patients with colorectal polyps. *Clin Cancer Res* 2005; **311**:1203-9.
- 45 15 **Lenhard K, Bommer GT, Asutay S, et al.** Analysis of promoter methylation in stool: novel method for the detection of colorectal cancer. *Clin Gastroenterol Hepatol* 2005; **3**:142-9.
- 16 **Puig P, Urgell E, Capella G, et al.** A highly sensitive method for K-ras mutation detection is useful in diagnosis of gastrointestinal cancer. *International journal of cancer* 2000; **85**:73-7.
- 50 17 **Puig P, Urgell E, Capella G, et al.** Improved detection of K-ras codon 12 mutations in fecal exfoliated cells. *Laboratory investigation; a journal of technical methods and pathology* 1999; **79**:617-8.
- 18 **Hermán JG, Graff JR, Myohanen S, et al.** Methylation-specific PCR: a novel PCR assay for methylation status of CpG islands. *Proceedings of the National Academy of Sciences of the United States of America* 1996; **93**:9821-6.
- 55 19 **Hermán JG, Umar A, Polyak K, et al.** Incidence and functional consequences of hMLH1 promoter hypermethylation in colorectal carcinoma. *Proceedings of the National Academy of Sciences of the United States of America* 1998; **95**:6870-5.
- 60 20 **Esteller M, Sparks A, Toyota M, et al.** Analysis of adenomatous polyposis coli promoter hypermethylation in human cancer. *Cancer research* 2000; **60**:4366-71.
- 21 **Esteller M, Avizienyte E, Corn PG, et al.** Epigenetic inactivation of LKB1 in primary tumors associated with the Peutz-Jeghers syndrome. *Oncogene* 2000; **19**:164-8.
- 65 22 **Frigola J, Song J, Stirzaker C, et al.** Epigenetic remodeling in colorectal cancer results in coordinate gene suppression across an entire chromosome band. *Nature genetics* 2006; **38**:540-9.

## ES 2 346 503 B1

- 23 **Osborn NK, Ahlquist DA.** Stool screening for colorectal cancer: molecular approaches. *Gastroenterology* 2005; **128**:192-206.
- 24 **Song K, Fendrick AM, Ladabaum U.** Fecal DNA testing compared with conventional colorectal cancer screening methods: a decision analysis. *Gastroenterology* 2004; **126**:1270-9.
- 25 **Ahlquist DA, Shuber AP.** Stool screening for colorectal cancer: evolution from occult blood to molecular markers. *Clínica chimica acta; international journal of clinical chemistry* 2002; **315**:157-68.
- 26 **Traverso G, Shuber A, Olsson L, et al.** Detection of proximal colorectal cancers through analysis of faecal DNA. *Lancet* 2002; **359**:403-4.
- 27 **Brenner DE, Rennert G.** Fecal DNA biomarkers for the detection of colorectal neoplasia: attractive, but is it feasible? *Journal of the National Cancer Institute* 2005; **97**:1107-9.
- 28 **Ahlquist DA, Skoletsky JE, Boynton KA, et al.** Colorectal cancer screening by detection of altered human DNA in stool: feasibility of a multitarget assay panel. *Gastroenterology* 2000; **119**:1219-27.
- 29 **Imperiale TF, Ransohoff DF, Itzkowitz SH, et al.** Fecal DNA versus fecal occult blood for colorectal-cancer screening in an average-risk population. *The New England journal of medicine* 2004; **351**:2704-14.
- 30 **Whitney D, Skoletsky J, Moore K, et al.** Enhanced retrieval of DNA from human fecal samples results in improved performance of colorectal cancer screening test. *J Mol Diagn* 2004; **6**:386-95.
- 31 **Loktionov A, O'Neill IK, Silvester KR, et al.** Quantitation of DNA from exfoliated colonocytes isolated from human stool surface as a novel noninvasive screening test for colorectal cancer. *Clin Cancer Res* 1998; **4**:337-42.
- 32 **Sidransky D, Tokino T, Hamilton SR, et al.** Identification of ras oncogene mutations in the stool of patients with curable colorectal tumors. *Science (New York, NY)* 1992; **256**:102-5.
- 33 **Eguchi S, Kohara N, Komuta K, et al.** Mutations of the p53 gene in the stool of patients with resectable colorectal cancer. *Cancer* 1996; **77**:1707-10.
- 34 **Esteller M.** Epigenetics in cancer. *The New England journal of medicine* 2008; **358**:1148-59.
- 35 **Zou H, Harrington JJ, Shire AM, et al.** Highly methylated genes in colorectal neoplasia: implications for screening. *Cancer Epidemiol Biomarkers Prev* 2007; **16**:2686-96.
- 36 **Zitt M, Zitt M, Muller HM.** DNA methylation in colorectal cancer-impact on screening and therapy monitoring modalities? *Disease markers* 2007; **23**:51-71.
- 37 **Leung WK, To KF, Man EP, et al.** Quantitative detection of promoter hypermethylation in multiple genes in the serum of patients with colorectal cancer. *Am J Gastroenterol* 2005; **100**:2274-9.
- 38 **Nakayama G, Hibi K, Kodera Y, et al.** P16 methylation in serum as a potential marker for the malignancy of colorectal carcinoma. *Anticancer Res* 2007; **27**:3367-70.
- 39 **Zou HZ, Yu BM, Wang ZW, et al.** Detection of aberrant p16 methylation in the serum of colorectal cancer patients. *Clin Cancer Res* 2002; **8**:188-91.
- 40 **Leung WK, To KF, Man EP, et al.** Detection of hypermethylated DNA or cyclooxygenase-2 messenger RNA in fecal samples of patients with colorectal cancer or polyps. *The American journal of gastroenterology* 2007; **102**:1070-6.
- 41 **Cottrell SE, Laird PW.** Sensitive detection of DNA methylation. *Annals of the New York Academy of Sciences* 2003; **983**:120-30.
- 42 **Mikeska T, Bock C, El-Maarri O, et al.** Optimization of quantitative MGMT promoter methylation analysis using pyrosequencing and combined bisulfite restriction analysis. *J Mol Diagn* 2007; **9**:368-81.
- 43 **Kristensen LS, Mikeska T, Krypuy M, et al.** Sensitive Melting Analysis after Real Time- Methylation Specific PCR (SMART-MSP): high-throughput and probe-free quantitative DNA methylation detection. *Nucleic acids research* 2008; **36**:e42.
- 44 **Lieberman DA, Weiss DG, Bond JH, et al.** Use of colonoscopy to screen asymptomatic adults for colorectal cancer. Veterans Affairs Cooperative Study Group 380. *The New England journal of medicine* 2000; **343**:162-8.

## ES 2 346 503 B1

45 **Imperiale TF, Wagner DR, Lin CY, et al.** Risk of advanced proximal neoplasms in asymptomatic adults according to the distal colorectal findings. *The New England journal of medicine* 2000; **343**:169-74.

5 46 **Ore L, Hagoel L, Lavi I, et al.** Screening with faecal occult blood test (FOBT) for colorectal cancer: assessment of two methods that attempt to improve compliance. *Eur J Cancer Prev* 2001; **10**:251-6.

47 **Shields HM, Weiner MS, Henry DR, et al.** Factors that influence the decision to do an adequate evaluation of a patient with a positive stool for occult blood. *The American journal of gastroenterology* 2001; **96**:196-203.

10 48 **Markovitz Sanford, D** (UNIV CASE WESTERN RESERVE) Methods and compositions for detecting cancers. EP1551437, July 13, 2005. App. 20030757461, June 5, 2003.

15 49 **Hoon Dave S B et al.** (WAYNE JOHN CANCER INST). DNA Markers for management of Cancer. WO2004086949, October 14, 2004.

50 50. **Lofton-Day Cathy et al.** (EPIGENOMICS AG; LOFTON-DAY CATHY). Methods and nucleic acids for the analysis of colon cell proliferative disorders. WO2005001140, January 6, 2005.

20 51. **Todd Alison Velylan et al.** (Johnson & Johnson Res Pty LTD). Method for detection of alkylated cytosine in DNA. EP1644519, April 12, 2006. Appl. 20040737521, July 5, 2004.

52. **Lofton-Day Cathy et al.** (EPIGENOMICS AG; LOFTON-DAY CATHY; EBERT MATHIAS). Methods and nucleic acids for the detection of metastasis of colon cell proliferative disorders. WO 2006002344, January 5, 2006.

25 53. **Shuber Anthony P.** Methods for detecting hypermethylated nucleic acid in heterogeneous biological samples. US6818404, May 8, 2003. Appl. US20020123071, April 11, 2002.

30

35

40

45

50

55

60

65

REIVINDICACIONES

1. Método *in vitro* para diagnosticar cáncer colorectal que comprende:

5

- a. obtener una muestra biológica de un sujeto; y
- b. determinar en la muestra biológica el estado de metilación del promotor de al menos uno de los siguientes genes: APC, RARB2 y p14.

10

2. Método, según la reivindicación 1, **caracterizado** porque el paso b) comprende determinar adicionalmente en la muestra biológica el estado de metilación del promotor de al menos un gen seleccionado entre p16 y MGMT.

15

3. Método, según la reivindicación 1, **caracterizado** porque el paso b) comprende determinar en la muestra biológica el estado de metilación de los promotores de los genes APC, RARB2, p16, MGMT y p14.

20

4. Método, según cualquiera de las reivindicaciones anteriores, **caracterizado** porque la muestra biológica es una muestra de heces.

25

5. Método, según la reivindicación anterior, **caracterizado** porque la determinación de la metilación se lleva a cabo en ADN fecal.

30

6. Método, según cualquiera de las reivindicaciones anteriores, **caracterizado** porque la determinación de la metilación se lleva a cabo mediante el análisis de la curva de disociación.

35

7. Kit de diagnóstico de cáncer colorectal, para llevar a cabo el método de las reivindicaciones 1-6, **caracterizado** porque comprende un set de cebadores adecuado para la determinación en una muestra biológica del estado de metilación del promotor de al menos uno de los genes APC, RARB2 y p14.

40

8. Kit, según la reivindicación anterior, **caracterizado** porque comprende adicionalmente cebadores para la determinación del estado de metilación del promotor de al menos uno de los genes p16 y MGMT.

45

9. Kit, según la reivindicación anterior, **caracterizado** porque comprende un set de cebadores adecuado para la determinación del estado de metilación de los promotores de los genes APC, RARB2, p14, MGMT y p16.

50

55

60

65

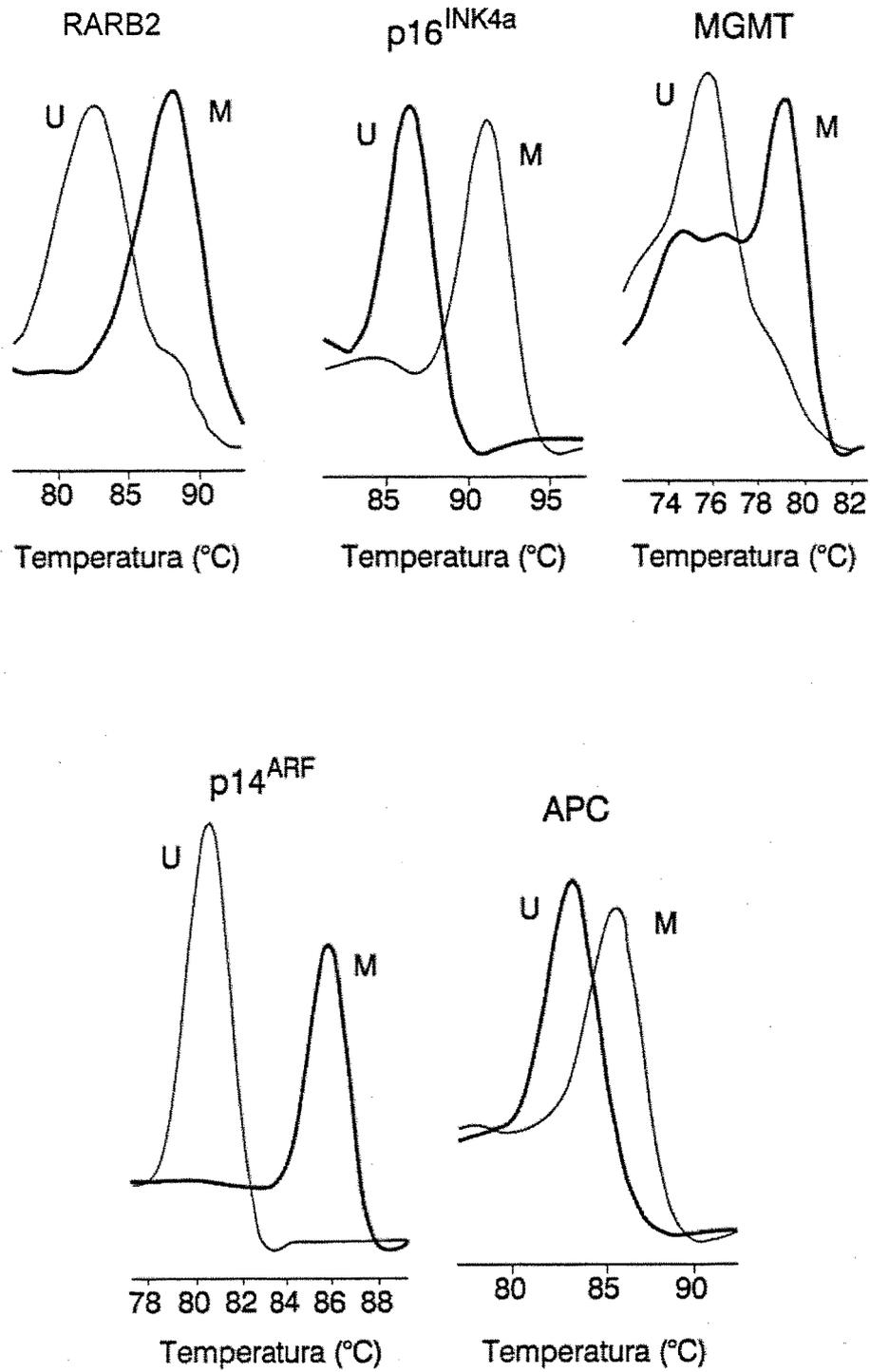


FIG. 1

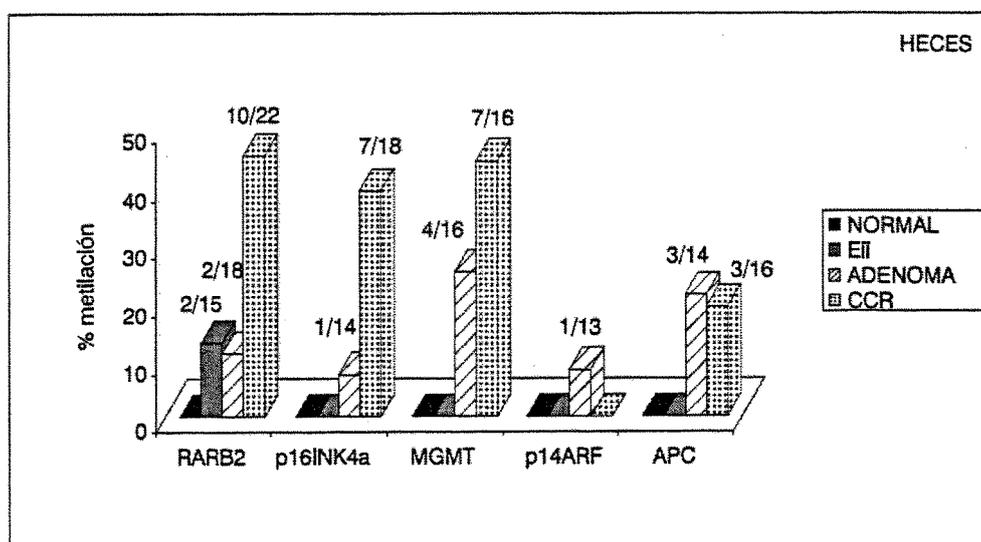


FIG. 2a

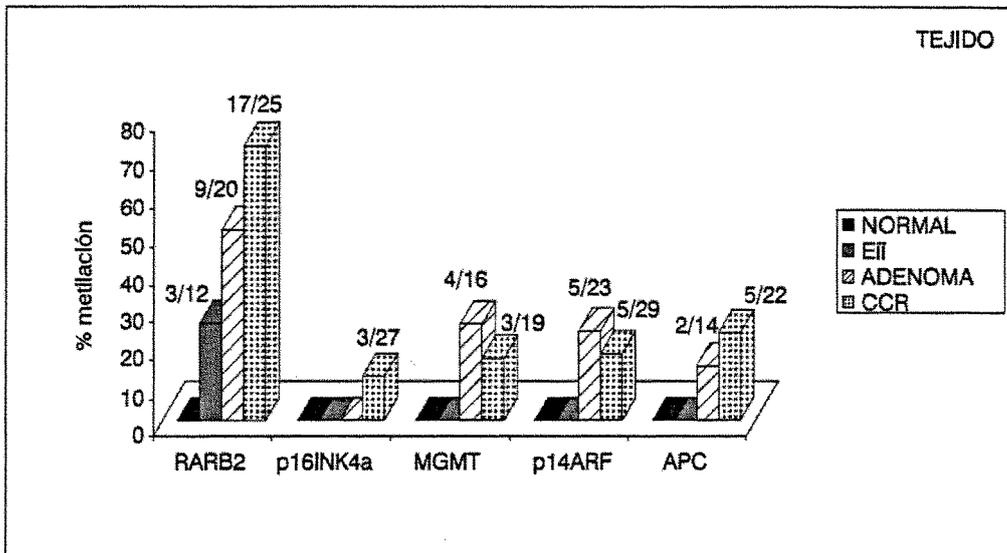


FIG. 2b

# ES 2 346 503 B1

## LISTA DE SECUENCIAS

<110> FINA BIOTECH S.L.U.

5	<120> MÉTODO DE DIAGNÓSTICO DE CÁNCER COLORECTAL	
	<130> 270/08	
10	<160> 5	
	<210> 1	
	<211> 40	
15	<212> DNA	
	<213> Artificial	
	<223> Cebador 5'-3' RARB2	
20	<400> 1	
	tttaaagtgt gggtggggg cccaacaacc ctacaaaaac	40
25	<210> 2	
	<211> 41	
	<212> DNA	
30	<213> Artificial	
	<223> Cebador 5'-3' p16	
35	<400> 2	
	gttggttatt agagggtggg gctacaaacc ctctaccac c	41
40	<210> 3	
	<211> 38	
	<212> DNA	
	<213> Artificial	
45	<223> Cebador 5'-3' MGMT	
	<400> 3	
50	ggatatgttg ggatagtaa ataaataaaa atcaaac	38
	<210> 4	
55	<211> 44	
	<212> DNA	
	<213> Artificial	
60	<223> Cebador 5'-3' p14	
	<400> 4	
65	gtttatfff ggtgttaaag ggctaactcc tcaataacat caac	44
	<210> 5	

# ES 2 346 503 B1

<211> 38

<212> DNA

<213> Artificial

5

<223> Cebador 5'-3' APC

<400> 5

10

ggtaggggtt aggtaggttg ctacaccaat acaaccac

38

15

20

25

30

35

40

45

50

55

60

65



OFICINA ESPAÑOLA DE  
PATENTES Y MARCAS

ESPAÑA

① ES 2 346 503

② Nº de solicitud: 200803127

③ Fecha de presentación de la solicitud: **03.11.2008**

④ Fecha de prioridad:

## INFORME SOBRE EL ESTADO DE LA TÉCNICA

⑤ Int. Cl.: **C12Q 1/68** (2006.01)

### DOCUMENTOS RELEVANTES

Categoría	⑥ Documentos citados	Reivindicaciones afectadas
X	GRADY, W.M. et al., "Genomic and epigenetic instability in colorectal cancer pathogenesis.", GASTROENTEROLOGY, 2008 Oct, Vol. 135, No. 4, páginas 1079-1099, ISSN: 0016-5085, Epub: 04.09.2008, ver páginas 1091-1094 ('Epigenetic alterations and Epigenetic instability'); Conclusiones.	1-9
X	AHMED, F.E., "Colorectal cancer epigenetics: the role of environmental factors and the search for molecular biomarkers.", JOURNAL OF ENVIRONMENTAL SCIENCE AND HEALTH PART C ENVIRONMENTAL CARCINOGENESIS & ECOTOXICOLOGY REVIEWS, 2007 Abr-Jun, Vol. 25, No. 2, páginas 101-54, ISSN 1059-0501, ver páginas 105-116 ('Epigenetic modifications in colorectal cancer').	1-9
X	XU, X.L. et al., "Methylation profile of the promoter CpG islands of 31 genes that may contribute to colorectal carcinogenesis.", WORLD JOURNAL OF GASTROENTEROLOGY, 2004, Vol. 10, No. 23, páginas 3441-3454, ISSN: 1007-9327, ver Materiales y Métodos, Tabla 3; Resultados, Figuras 1 y 2.	1-9
X	BELSHAW, N.J. et al., "Use of DNA from human stools to detect aberrant CpG island methylation of genes implicated in colorectal cancer.", CANCER EPIDEMIOLOGY, BIOMARKERS & PREVENTION, 2004, Vol. 13, páginas 1495-501, ISSN: 1055-9965, Resultados, Figura 1, Tablas 3 y 4.	1-9
X	LIND, G.E. et al., "A CpG island hypermethylation profile of primary colorectal carcinomas and colon cancer cell lines.", MOLECULAR CANCER, 2004, Vol. 3, No. 28, páginas 1-11, ISSN: 1476-4598, ver Resultados.	1-9

#### Categoría de los documentos citados

X: de particular relevancia

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

A: refleja el estado de la técnica

O: referido a divulgación no escrita

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

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

#### El presente informe ha sido realizado

para todas las reivindicaciones

para las reivindicaciones nº:

Fecha de realización del informe

30.09.2010

Examinador

J.L. Vizán Arroyo

Página

1/7



OFICINA ESPAÑOLA DE  
PATENTES Y MARCAS

ESPAÑA

① ES 2 346 503

② Nº de solicitud: 200803127

③ Fecha de presentación de la solicitud: 03.11.2008

④ Fecha de prioridad:

## INFORME SOBRE EL ESTADO DE LA TÉCNICA

⑤ Int. Cl.: C12Q 1/68 (2006.01)

### DOCUMENTOS RELEVANTES

Categoría	⑥ Documentos citados	Reivindicaciones afectadas
X	ESTELLER, M. et al., "Analysis of adenomatous polyposis coli promoter hypermethylation in human cancer.", CANCER RESEARCH, 2000, Vol. 60, No. 16, páginas 4366-4371, ISSN: 0008-5472, ver Materiales y Métodos; Resultados.	1,4-7
X	ESTELLER, M. et al., "p14ARF silencing by promoter hypermethylation mediates abnormal intracellular localization of MDM2.", CANCER RESEARCH, 2001, Vol. 61, No. 7, páginas 2816-2821, ISSN: 0008-5472, ver Materiales y Métodos; Resultados.	1,4-7
X	YOUSSEF, E.M. et al., "Methylation and regulation of expression of different retinoic acid receptor beta isoforms in human colon cancer.", CANCER BIOLOGY & THERAPY, 2004, Vol. 3, No. 1, páginas 82-86, ISSN 1538-4047, ver Resultados; Discusión.	1,4-7
A	US 20070298431 A1 (MAI) 27.12.2007, todo el documento.	1-9
A	WO 2006119434 A2 (UNIV. SOUTHERN CALIFORNIA) 09.11.2006, todo el documento.	1-9

#### Categoría de los documentos citados

X: de particular relevancia

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

A: refleja el estado de la técnica

O: referido a divulgación no escrita

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

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

#### El presente informe ha sido realizado

para todas las reivindicaciones

para las reivindicaciones nº:

Fecha de realización del informe

30.09.2010

Examinador

J.L. Vizán Arroyo

Página

2/7

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, BIOSIS, EMBASE, MEDLINE

Fecha de Realización de la Opinión Escrita: 30.09.2010

**Declaración**

<b>Novedad (Art. 6.1 LP 11/1986)</b>	Reivindicaciones	3, (4-8) (parcialmente), 9	<b>SÍ</b>
	Reivindicaciones	1, 2, (4-8) (parcialmente)	<b>NO</b>
<b>Actividad inventiva (Art. 8.1 LP 11/1986)</b>	Reivindicaciones		<b>SÍ</b>
	Reivindicaciones	3, (4-8) (parcialmente), 9	<b>NO</b>

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

**Base de la Opinión:**

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

**1. Documentos considerados:**

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

Documento	Número Publicación o Identificación	Fecha Publicación
D01	Grady, W.M. et al., Gastroenterology, (2008), 135(4): 1079-99. Epub: 04.09.2008	04-09-2008
D02	Ahmed, F.E., J. Environ. Sci. Health C. Environ. Carcinog. Ecotoxicol. Rev., (2007), 25(2): 101-54	2007
D03	Xu, X.L. et al., World J. Gastroenterol., (2004), 10(23): 3441-54.	2004
D04	Belshaw, N.J. et al., Cancer Epidemiol. Biomarkers Prev. (2004), 13: 1495-501.	2004
D05	Lind, G.E. et al., Mol. Cancer, (2004), 3(28): E1-E11.	2004
D06	Esteller, M. et al., Cancer Res., (2000), 60(16): 4366-71.	2000
D07	Esteller, M. et al., Cancer Res., (2001), 61(7): 2816-21.	2001
D08	Youssef, E.M. et al., Cancer Biol. Ther., (2004), 3(1): 82-6.	2004
D09	US 2007/0298431 A1	27-12-2007
D10	WO 2006/119434 A2	09-11-2006

Observaciones sobre documentos:

En D1-D10 se analizan las inestabilidades genómicas y epigenéticas relacionadas con la patogénesis del cáncer colorectal.

**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**

1. NOVEDAD (Art. 4.1. y Art. 6.1. de la Ley de Patentes).

1.1. Reivindicación independiente 1.

1.1.1. La presente solicitud divulga un método in vitro para diagnosticar cáncer colorectal caracterizado por determinar en una muestra biológica el estado de metilación del promotor de al menos uno de los siguientes genes: APC (adenomatous polyposis coli), RARB2 (Retinoic acid receptor, Beta) y p14ARF (marco de lectura alternativo (ARF) del gen p16 (CDKN2A) (cyclin-dependent kinase inhibitor 2A)).

1.1.2. En los documentos D1-D8 se analizan las inestabilidades genómicas y epigenéticas relacionadas con la patogénesis del cáncer colorectal, especialmente, la metilación aberrante del ADN. En particular, se divulgan diferentes genes que presentan un perfil de metilación aberrante de las islas CpG de sus respectivos promotores en cáncer colorectal. Entre los genes seleccionados en dichos documentos se incluye al menos uno de los genes implicados en el método de la invención (APC, RARB2 o p14ARF) (c.f. D1: 'Epigenetic Alterations and Epigenetic Instability', Tabla 4. D2: 'Epigenetic modifications in colorectal cancer', Tabla 2. D3: Resultados, Figuras 1 y 2. D4: Resultados, Discusión. D5: Resultados, Tablas 1 y 2. D6: Resultados. D7: Resultados. D8: Resultados). Además, en D4 se divulga la utilización del ADN fecal como muestra biológica en métodos de diagnóstico del cáncer colorectal mediante la determinación del estado de metilación de biomarcadores (c.f. D4: Resultados, Figuras 1, Tabla 4). Es decir, tanto los genes APC, RARB2 o p14ARF como la metilación aberrante de las secuencias de sus promotores, alteración epigenética relacionada con la patogénesis del cáncer colorectal, y el uso de ADN fecal como muestra biológica en procedimientos de diagnóstico de cáncer colorectal son elementos técnicos conocidos a la fecha de presentación de la solicitud. Por consiguiente, el método objeto de la reivindicación 1 no es nuevo sobre la base de los documentos D1-D8.

Según lo expuesto anteriormente, el objeto de las reivindicaciones dependientes 4-7 (parcialmente) también se considera que no es nuevo.

1.2. Reivindicación independiente 1 en combinación con la reivindicación dependiente 2.

Hoja adicional

1.2.1. El objeto protegido por la reivindicación 1 en combinación con la reivindicación 2 es un método in vitro para diagnosticar cáncer colorectal caracterizado por determinar en una muestra biológica el estado de metilación del promotor de al menos uno de los genes: APC, RARB2 y p14ARF, y adicionalmente el estado de metilación del promotor de al menos uno de los siguientes genes: p16 (CDKN2A) (cyclin-dependent kinase inhibitor 2A) y MGMT (O-6-methylguanine-DNA methyltransferase).

1.2.2. En los documentos D1-D5 se divulgan diferentes biomarcadores genéticos de cáncer colorectal caracterizados porque experimentan una metilación aberrante del ADN en las islas CpG de sus promotores. Entre dichos biomarcadores se incluyen los genes p16 (CDKN2A) y MGMT, junto con los indicados anteriormente (APC, RARB2 o p14ARF).

Por consiguiente, el método objeto de la reivindicación 1 en combinación con la reivindicación dependiente 2 no es nuevo sobre la base de los documentos D1-D5.

Según lo expuesto anteriormente, el objeto de las reivindicaciones dependientes 4-7 (parcialmente), 8 también se considera que no es nuevo.

1.3. La presente invención no satisface el criterio establecido en el Art. 4.1. de la Ley de Patentes porque el objeto de la misma, definido en las reivindicaciones 1, 2, (4-7) (parcialmente) y 8, no es nuevo de acuerdo con el Art. 6.1. de la Ley de Patentes.

2. ACTIVIDAD INVENTIVA (Art. 4.1. y Art. 8.1. de la Ley de Patentes).

2.1. Reivindicación independiente 1 en combinación con la reivindicación dependiente 3.

2.1.1. Los documentos D1-D5 constituyen el estado de la técnica más próximo. En todos ellos se divulgan diferentes selecciones de genes afectados de metilación aberrante en sus promotores en cáncer colorectal (cf. D1: 'Epigenetic Alterations and Epigenetic Instability', Tabla 4. D2: 'Epigenetic modifications in colorectal cancer', Tabla 2. D3: Resultados, Figuras 1 y 2. D4: Resultados, Discusión. D5: Resultados, Tablas 1 y 2.).

2.1.2. El problema técnico a resolver por el objeto de la reivindicación independiente 1 en combinación con la reivindicación dependiente 3 puede ser considerado, por consiguiente, como la provisión de un nuevo el método de diagnóstico del cáncer colorectal.

2.1.3. La solución propuesta es el método de diagnóstico in vitro del cáncer colorectal de la reivindicación 1 en combinación con la reivindicación dependiente 3 caracterizado por determinar en una muestra biológica el estado de metilación del promotor de los siguientes genes: APC, RARB2, p14ARF, p16 y MGMT.

En el estado de la técnica se han descrito diferentes procedimientos de diagnóstico del cáncer colorectal basados en la determinación del grado de metilación de las islas CpG del promotor de genes relacionados con la patología. Estos procedimientos se diferencian básicamente en el conjunto de genes escogido sobre el que se valora dicho grado de metilación. Así, en D4 se describe un método para detectar la metilación aberrante de las islas CpG de los genes ESR1, MGMT, HPPQ, p16, APC y MLH1 a partir de ADN fecal y en D5 uno en el que los genes analizados son MLH1, MGMT, p16, p14, APC y E-cadherin (c.f. D4: Tabla 4. D5: Tabla 2). Por otro lado, en los documentos D1-D3 se divulgan diferentes conjuntos de biomarcadores moleculares de cáncer colorectal constituidos por 33, 29 y 31 genes respectivamente (c.f. D1: Tabla 4. D2: Tabla 2. D3: Figura 1).

Por consiguiente, el alcance inventivo del método de diagnóstico de la reivindicación 1 en combinación con la reivindicación dependiente 3 radica básicamente en la selección de los genes analizados en cada caso.

Considerando el hecho de que en la solicitud no se indica la supuesta ventaja técnica derivada de la selección particular de los cinco genes implicados en el método de la invención frente a los genes seleccionados en los métodos descritos en D4-D5 con relación al diagnóstico del cáncer colorectal y, además, que los cinco genes analizados en el método de la invención han sido previamente caracterizados en D1-D3 como posibles biomarcadores de dicha patología, se considera que la solución propuesta por el objeto de la reivindicación independiente 1 en combinación con la reivindicación dependiente 3 es una alternativa no inventiva con relación a las soluciones existentes previamente en el estado de la técnica que no requeriría de la aplicación de conocimientos técnicos inventivos por parte del experto en la materia.

Por consiguiente, el objeto de la reivindicación independiente 1 en combinación con la reivindicación dependiente 3 no es inventivo. Según lo expuesto anteriormente, el objeto de las reivindicaciones dependientes 4-7 (parcialmente), 9 también se considera que no es inventivo.

Hoja adicional

2.2. La presente invención no satisface el criterio establecido en el Art. 4.1. de la Ley de Patentes porque el objeto de la invención, definido en las reivindicaciones 1, 3, 4-7 (parcialmente) y 9, no implica actividad inventiva de acuerdo con el Art. 8.1. de la Ley de Patentes.