

19



OFICINA ESPAÑOLA DE  
PATENTES Y MARCAS

ESPAÑA



11 Número de publicación: **2 633 111**

51 Int. Cl.:

**G01N 33/574** (2006.01)

**C12Q 1/68** (2006.01)

12

TRADUCCIÓN DE PATENTE EUROPEA

T3

86 Fecha de presentación y número de la solicitud internacional: **25.03.2011 PCT/US2011/029959**

87 Fecha y número de publicación internacional: **29.09.2011 WO11119934**

96 Fecha de presentación y número de la solicitud europea: **25.03.2011 E 11760295 (3)**

97 Fecha y número de publicación de la concesión europea: **03.05.2017 EP 2553463**

54 Título: **Métodos y materiales para detectar neoplasia colorrectal**

30 Prioridad:

**26.03.2010 US 318077 P**

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

**19.09.2017**

73 Titular/es:

**ZOU, HONGZHI (25.0%)  
1066 Pleasant View Road 210  
Middleton, Wisconsin 53562, US;  
AHLQUIST, DAVID (25.0%);  
HARRINGTON, JONATHAN J. (25.0%) y  
MAYO FOUNDATION FOR MEDICAL EDUCATION  
AND RESEARCH (25.0%)**

72 Inventor/es:

**ZOU, HONGZHI;  
AHLQUIST, DAVID y  
HARRINGTON, JONATHAN J.**

74 Agente/Representante:

**ELZABURU, S.L.P**

ES 2 633 111 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**

Métodos y materiales para detectar neoplasia colorrectal

**Referencia cruzada a la solicitud relacionada**

5 La presente solicitud reivindica prioridad a la Solicitud de Patente Provisional pendiente de EEUU No. 61/318077, presentada el 26 de marzo de 2010.

**Campo de la invención**

10 La presente invención proporciona un método relacionado con la detección de marcadores específicos de neoplasia colorrectal en la muestra de heces de un sujeto. En particular, la presente invención proporciona un método para identificar mamíferos que tienen una neoplasia colorrectal detectando la presencia de marcadores epiteliales exfoliados (p. ej., ADN humano, alteraciones de genes asociadas a tumores, proteínas asociadas a tumores) y marcadores de sangre (p. ej., hemoglobina, proteínas del suero) en una muestra de heces obtenida del mamífero.

**Antecedentes de la invención**

15 El cáncer colorrectal permanece como causa principal de muerte entre los tipos de cáncer (véase, p. ej., Jemal A, et al., CA Cancer J Clin. 2007, 57:43-66; incorporado en la presente memoria por referencia en su totalidad). Aunque el cribado reduce la mortalidad por cáncer colorrectal (véase, p. ej., Mandel JS, et al., N Engl J Med. 1993, 328:1365-71; Hardcastle JD, et al., Lancet. 1996, 348:1472-7; Kronborg O, et al., Scand J Gastroenterol. 2004, 39: 846-51; Winawer SJ, et al., J Natl Cancer Inst. 1993, 85:1311-8; Singh H, et al., JAMA. 2006, 295:2366-73), las reducciones observadas han sido leves (véase, p. ej., Singh H, et al., JAMA. 2006;295, 2366-73; Heresbach D, et al., Eur J Gastroenterol Hepatol. 2006, 18:427-33) y más de la mitad de los adultos en Estados Unidos no han recibido cribado (véase, p. ej., Meissner HI, Cancer Epidemiol Biomarkers Prev. 2006, 15:389-94). Se necesitan herramientas más precisas, fáciles de usar y ampliamente distribuibles para mejorar la eficacia, la aceptabilidad y el acceso al cribado.

**Compendio**

25 El ADN largo fecal se origina o de la exfoliación de células displásicas o de la hemorragia luminal o la exudación de leucocitos. Informes anteriores han supuesto que el ADN largo y la sangre oculta en heces eran el resultado del sangrado, y como tal, supusieron que los ensayos de ADN largo fecal podrían ser una alternativa de ensayo de sangre oculta fecal (véase, p. ej., Kok JB, Clin Chem. 2003; 49:2112-2113). Sin embargo, los experimentos llevados a cabo durante la preparación de las realizaciones para la presente invención demostraron que el ADN largo era un marcador medible continuamente en heces y que la sangre oculta era detectable sólo intermitentemente (véase, p. ej., Osborn NK, et al., Gastroenterology 2005; 128:192-206, Ahlquist DA, Cancer 1989; 63:1826-1830) indicando así que el ADN largo y la sangre oculta eran de diferentes fuentes y, como tales, eran marcadores complementarios para la detección de CRC. Los experimentos demostraron además que el ADN largo y la sangre oculta en heces proporcionan un enfoque sensible para la detección del cáncer colorrectal.

35 Por consiguiente, la presente invención proporciona un método para detectar la presencia de una neoplasia colorrectal en un mamífero. El método implica detectar la presencia o ausencia de marcadores epiteliales exfoliados específicos para una neoplasia colorrectal en una muestra de heces obtenida de un mamífero y detectar la presencia o ausencia de uno o más marcadores de sangre oculta fecal (p. ej., específico para una neoplasia colorrectal) en la muestra de heces. La detección de la presencia de marcadores epiteliales exfoliados en la muestra de heces en combinación con la presencia de uno o más marcadores de sangre oculta fecal en la muestra de heces es indicativa de una neoplasia colorrectal en el mamífero.

40 En algunas realizaciones, el mamífero es un ser humano. En algunas realizaciones, la neoplasia colorrectal es premaligna. En algunas realizaciones, la neoplasia colorrectal es maligna.

Los marcadores de ácidos nucleicos específicos de neoplasia colorrectal incluyen un gen que tiene una mutación puntual y un gen que tiene metilación anormal.

45 En algunas realizaciones, un gen que tiene una mutación puntual incluye a K-ras. En algunas realizaciones, un gen que tiene metilación anormal incluye a bmp-3 y NDRG4.

El método no se limita a marcadores particulares de sangre oculta fecal específicos para una neoplasia colorrectal. En algunas realizaciones, los marcadores de sangre oculta fecal específicos para una neoplasia colorrectal incluyen hemoglobina.

50 La presente solicitud describe kits para detectar la presencia de una neoplasia colorrectal en un mamífero. Dichos kits pueden incluir reactivos útiles, suficientes o necesarios para detectar y/o caracterizar uno o más marcadores epiteliales exfoliados específicos para una neoplasia colorrectal y reactivos útiles, suficientes o necesarios para detectar y/o caracterizar uno o más marcadores de sangre oculta fecal específicos para una neoplasia colorrectal. Los kits pueden contener los reactivos necesarios para realizar en tiempo real la Alu PCR. Los kits pueden contener los reactivos necesarios para realizar el ensayo de hemoporfirina HemoQuant. Los kits pueden contener los

ingredientes y reactivos necesarios para obtener y almacenar una muestra de heces de un sujeto.

La presente solicitud describe métodos para la monitorización del tratamiento del cáncer colorrectal. Por ejemplo, los métodos se pueden realizar inmediatamente antes, durante y/o después de un tratamiento para monitorizar el éxito del tratamiento. Los métodos se pueden realizar a intervalos en pacientes libres de enfermedad para asegurar o

5 monitorizar el éxito del tratamiento.

La presente solicitud describe métodos para obtener el perfil de riesgo de un sujeto para desarrollar cáncer colorrectal. Tales métodos pueden implicar obtener una muestra de heces de un sujeto (p. ej., un ser humano en riesgo para desarrollar cáncer colorrectal, un ser humano sometido a un examen físico de rutina), para detectar la presencia o ausencia de uno o más marcadores epiteliales exfoliados específicos para una neoplasia colorrectal en o asociado con la muestra de heces, detectar la presencia o ausencia de uno o más marcadores de sangre oculta fecal (p. ej., específicos para una neoplasia colorrectal) en o asociados con la muestra de heces y generar un perfil de riesgo para desarrollar cáncer colorrectal basado en la presencia o ausencia detectada de marcadores epiteliales exfoliados y marcadores de sangre oculta fecal. Por ejemplo, un perfil de riesgo generado puede cambiar dependiendo de los marcadores epiteliales exfoliados específicos y los marcadores de sangre oculta fecal detectados como presentes o ausentes. El método no se limita a una manera particular de generar el perfil de riesgo. Se puede utilizar un procesador (p. ej., un ordenador) para generar tal perfil de riesgo. El procesador utiliza un algoritmo específico (p. ej., un software) para interpretar la presencia y ausencia de marcadores epiteliales exfoliados específicos y marcadores de sangre oculta fecal como se determina con el método de la presente invención. La presencia y ausencia de marcadores epiteliales exfoliados específicos y marcadores de sangre oculta fecal como se determina con el método de la presente invención se puede introducir en tal algoritmo y el perfil de riesgo se refiere basado en una comparación de dicha entrada con normas establecidas (p. ej., norma establecida para la afección precancerosa, norma establecida para diversos niveles de riesgo para desarrollar cáncer colorrectal, norma establecida para sujetos diagnosticados con diversos estadios de cáncer colorrectal). El perfil de riesgo puede indicar el riesgo de un sujeto para desarrollar cáncer colorrectal o el riesgo de un sujeto para volver a desarrollar cáncer colorrectal. El perfil de riesgo puede indicar que un sujeto tiene, por ejemplo, una probabilidad muy baja, baja, moderada, alta y muy alta de desarrollar o volver a desarrollar cáncer colorrectal. El perfil de riesgo puede indicar el riesgo basado en una población media a un nivel deseado de especificidad (p. ej., 90%). Un proveedor de servicios médicos (p. ej., un oncólogo) puede utilizar dicho perfil de riesgo para determinar un plan de tratamiento o intervención (p. ej., colonoscopia, esperar a ver qué pasa, derivar a un oncólogo, derivar a un cirujano, etc.).

### 30 Breve descripción de los dibujos

La Figura 1 muestra los niveles de ADN largo y sangre oculta en heces de pacientes con CRC o adenomas avanzados y de individuos normales representados en escala logarítmica. Cada círculo representa una muestra de heces.

La Figura 2 muestra la correlación del ADN largo con los niveles de sangre oculta en las muestras de heces que se representan en un gráfico de diagrama de dispersión. Se dibuja una tendencia negra para mostrar que el ADN largo fecal no está correlacionado con niveles de sangre oculta ( $R^2 = 0,0001$ ). Ya que el cero no se puede trazar en escala logarítmica, se representa aquí el nivel de ADN largo más 1 y el nivel de sangre oculta más 0,1.

La Figura 3 muestra las curvas operativas del receptor para el ADN largo en heces y los niveles de sangre oculta en pacientes con cáncer colorrectal o adenomas avanzados frente a controles normales. Para los cánceres frente a los controles normales, los valores de AUC fueron 0,82, 0,78 y 0,90 para el ADN largo fecal, la sangre oculta y el ensayo de combinación, respectivamente; para los adenomas avanzados frente a los controles normales, los valores de AUC fueron 0,72, 0,50 y 0,72 para el ADN fecal, la sangre oculta y el ensayo de combinación, respectivamente. A, B y C representan las curvas operativas del receptor para el ADN largo fecal, la sangre oculta y el ensayo de combinación, respectivamente.

### 45 Definiciones

Para facilitar la comprensión de la presente invención, se definen a continuación un número de términos y frases

Como se emplea en esta memoria, el término "cáncer colorrectal" se quiere decir que incluye la definición médica bien aceptada que define el cáncer colorrectal como un estado de salud caracterizado por cáncer de las células del tracto intestinal por debajo del intestino delgado (p. ej., el intestino grueso (colon), que incluye el ciego, colon ascendente, colon transversal, colon descendente, y colon sigmoide y recto). Además, como se emplea en esta memoria, el término "cáncer colorrectal" se quiere decir que incluye además estados de salud que se caracterizan por cáncer de las células del duodeno y del intestino delgado (yeyuno e íleon).

Como se emplea en esta memoria, el término "metástasis" se quiere decir que se refiere al procedimiento en el que las células cancerosas originarias de un órgano o parte del cuerpo se trasladan a otra parte del cuerpo y continúan replicándose. Las células metastatizadas forman posteriormente tumores que pueden metastatizar más. Por lo tanto, la metástasis se refiere a la extensión del cáncer desde la parte del cuerpo donde aparecen originalmente a otras partes del cuerpo. Como se emplea en esta memoria, el término "células de cáncer colorrectal metastatizadas" se quiere decir que se refiere a células de cáncer colorrectal que han metastatizado; células de cáncer colorrectal

localizadas en una parte del cuerpo aparte del duodeno, intestino delgado (yeyuno e íleon), intestino grueso (colon), que incluye el ciego, colon ascendente, colon transverso, colon descendente, y colon sigmoide y recto.

Como se emplea en esta memoria, "se sospecha que un individuo es susceptible al cáncer colorrectal metastatizado" se quiere decir que se refiere a un individuo que está en un riesgo por encima de la media de desarrollar cáncer colorrectal metastatizado. Ejemplos de individuos con un riesgo particular de desarrollar cáncer colorrectal metastatizado son aquellos cuyos antecedentes familiares indican una incidencia por encima de la media de cáncer colorrectal entre los miembros de la familia y/o aquellos que ya han desarrollado cáncer colorrectal y han sido tratados eficazmente y que por lo tanto afrontan un riesgo de recaída y recurrencia. Otros factores que pueden contribuir a un riesgo por encima de la media de desarrollar cáncer colorrectal metastatizado que conduciría de este modo a la clasificación de un individuo como sospechoso de ser susceptible al cáncer colorrectal metastatizado, se pueden basar en unos antecedentes y características genéticas, médicas y/o de comportamiento específicos de un individuo.

El término "neoplasia" como se emplea en esta memoria se refiere a cualquier crecimiento nuevo y anormal de tejido. Así, una neoplasia puede ser una neoplasia premaligna o una neoplasia maligna. El término "marcador específico de neoplasia" se refiere a cualquier material biológico que se pueda utilizar para indicar la presencia de una neoplasia. Ejemplos de materiales biológicos incluyen, sin limitación, ácidos nucleicos, polipéptidos, carbohidratos, ácidos grasos, componentes celulares (p. ej., membranas celulares y mitocondrias) y células enteras. El término "marcador específico de neoplasia colorrectal" se refiere a cualquier material biológico que se pueda utilizar para indicar la presencia de una neoplasia colorrectal (p. ej., una neoplasia colorrectal premaligna, una neoplasia colorrectal maligna). Ejemplos de marcadores específicos de neoplasia colorrectal incluyen, pero no se limitan a, marcadores epiteliales exfoliados (p. ej., bmp-3, bmp-4, SFRP2, vimentina, septin9, ALX4, EYA4, TFPI2, NDRG4, FOXE1, DNA largo, BAT-26, K-ras, APC, gen del antígeno del melanoma, p53, BRAF y PIK3CA) y marcadores de sangre oculta fecal (p. ej., hemoglobina, alfa-defensina, calprotectina,  $\alpha$ 1-antitripsina, albúmina, MCM2, transferrina, lactoferrina y lisozima).

Como se emplea en esta memoria, el término "adenoma" se refiere a un tumor benigno de origen glandular. Aunque estos crecimientos son benignos, con el tiempo pueden avanzar hasta convertirse en malignos. Como se emplea en esta memoria, el término "adenoma colorrectal" se refiere a un tumor colorrectal benigno en el que las células forman estructuras glandulares reconocibles o en las que las células se derivan claramente del epitelio glandular.

Como se emplea en esta memoria, el término "amplicón" se refiere a un ácido nucleico generado utilizando pares de cebadores. El amplicón es típicamente ADN de una sola cadena (p. ej., el resultado de la amplificación asimétrica), sin embargo, puede ser ARN o ADNbc.

El término "que amplifica" o "amplificación" en el contexto de ácidos nucleicos se refiere a la producción de copias múltiples de un polinucleótido, o una parte del polinucleótido, típicamente partiendo de una pequeña cantidad de polinucleótido (p.ej, una sola molécula de polinucleótido), donde los productos de amplificación o amplicones son generalmente detectables. La amplificación de polinucleótidos abarca una variedad de procedimientos químicos y enzimáticos. La generación de múltiples copias de ADN a partir de una o pocas copias de una molécula de ADN objetivo o molde durante una reacción en cadena de la polimerasa (PCR, en inglés polymerase chain reaction) o una reacción en cadena de la ligasa (LCR, en inglés a ligase chain reaction; véase, p. ej., la patente de EE.UU. No. 5,494,810) son formas de amplificación. Tipos adicionales de amplificación incluyen, pero no se limitan a, PCR específica de alelo (véase, p. ej., la patente de EE.UU. No. 5,639,611), PCR de ensamblaje (véase, p. ej., la patente de EE.UU. No. 5,965,408), amplificación dependiente de helicasa (véase, p. ej., la patente de EE.UU. No. 7,662,594), PCR de inicio en caliente (véase, p. ej., las patentes de EE.UU. Nos. 5,773,258 y 5,338,671), PCR específica de intersecuencia, PCR inversa (véase, p. ej., Triglia, et al. (1988) Nucleic Acids Res., 16: 8186), PCR mediada por ligación (véase, p. ej., Guilfoyle, R. et al., Nucleic Acids Research, 25:1854-1858 (1997); patente de EE.UU. No. 5,508,169), PCR específica de metilación (véase, p. ej., Herman, et al., (1996) PNAS 93(13) 9821-9826), PCR Minicebador, amplificación de sondas dependientes de ligandos múltiples (véase, p. ej., Schouten, et al., (2002) Nucleic Acids Research 30(12): e57), PCR múltiple (véase, p. ej., Chamberlain et al., (1988) Nucleic Acids Research 16(23) 11141-11156; Ballabio, et al., (1990) Human Genetics 84(6) 571-573; Hayden, et al., (2008) BMC Genetics 9:80), PCR anidada, PCR de superposición-extensión (véase, p. ej., Higuchi, et al., (1988) Nucleic Acids Research 16(15) 7351-7376), PCR en tiempo real (véase, p. ej., Higuchi et al., (1992) Biotechnology 10:413-417; Higuchi, et al., (1993) Biotechnology 11:1026-1030), PCR de transcripción inversa (véase, p. ej., Bustin, S.A. (2000) J. Molecular Endocrinology 25:169-193), PCR en fase sólida, PCR termal de entrelazado asimétrico y PCR con rampa decreciente de temperaturas (véase, p. ej., Don, et al., Nucleic Acids Research (1991) 19(14) 4008; Roux, K. (1994) Biotechniques 16(5) 812-814; Hecker et al., (1996) Biotechniques 20(3) 478-485). La amplificación de polinucleótidos también se puede lograr utilizando la PCR digital (véase, p. ej., Kalinina, et al., Nucleic Acids Research. 25; 1999-2004, (1997); Vogelstein y Kinzler, Proc Natl Acad Sci EE.UU. 96; 9236-41, (1999); publicación de la patente internacional No. WO05023091A2; publicación de la solicitud de la patente de EE.UU. No. 20070202525).

Como se emplea en esta memoria, los términos "complementario" o "complementariedad" se utilizan en referencia a polinucleótidos (es decir, una secuencia de nucleótidos) relacionados con las reglas de emparejamiento de bases. Por ejemplo, la secuencia "5'-A-G-T-3'", es complementaria a la secuencia "3'-T-C-A-5'". La complementariedad

puede ser "parcial", en la que sólo algunas de las bases de los ácidos nucleicos se emparejan de acuerdo con las reglas de emparejamiento de bases. O, puede ser complementariedad "completa" o "total" entre los ácidos nucleicos. El grado de complementariedad entre las cadenas de ácido nucleico tiene efectos significativos sobre la eficacia y la resistencia de la hibridación entre cadenas de ácido nucleico. Esto es de particular importancia en las reacciones de amplificación, así como en los métodos de detección que dependen de la unión entre ácidos nucleicos.

Como se emplea en esta memoria, el término "cebador" se refiere a un oligonucleótido, ya sea de origen natural como en una digestión de restricción purificada o producido sintéticamente, que es capaz de actuar como punto de inicio de la síntesis cuando se coloca en condiciones en las que se induce la síntesis de un producto de extensión del cebador que es complementario a una cadena de ácido nucleico (p.ej., en presencia de nucleótidos y un agente inductor tal como un biocatalizador (p.ej., una ADN polimerasa o similar) y a una temperatura y pH adecuados). El cebador es típicamente de una sola cadena para una máxima eficiencia en la amplificación, pero puede ser alternativamente de doble cadena. Si es de doble cadena, el cebador generalmente se trata primero para separar sus cadenas antes de ser utilizado para preparar los productos de extensión. En algunas realizaciones, el cebador es un oligodesoxirribonucleótido. El cebador es suficientemente largo para cebar la síntesis de productos de extensión en presencia del agente inductor. Las longitudes exactas de los cebadores dependerán de muchos factores, que incluyen temperatura, fuente de cebador y el uso del método. En ciertas realizaciones, el cebador es un cebador de captura.

Como se emplea en esta memoria, el término "molécula de ácido nucleico" se refiere a cualquier molécula que contiene ácido nucleico, que incluye pero no se limita a, ADN o ARN. El término abarca secuencias que incluyen cualquiera de los análogos de base conocidos de ADN y ARN que incluyen, pero no se limitan a, 4 acetilcitosina, 8-hidroxi-N6-metiladenosina, aziridinilcitosina, pseudosocitosina, 5-(carboxihidroxilmetil) uracilo, 5-fluorouracilo, 5-bromouracilo, 5-carboximetilaminometil-2-tiouracilo, 5-carboximetil-aminometiluracilo, dihidrouracilo, inosina, N6-isopenteniladenina, 1-metiladenina, 1-metilpseudo-uracilo, 1-metilguanina, 1-metilinosina, 2,2-dimetil-guanina, 2-metiladenina, 2-metilguanina, 3-metilcitosina, 5-metilcitosina, N6-metiladenina, 7-metilguanina, 5-metilaminometiluracilo, 5-metoxi-amino-metil-2-tiouracilo, beta-D-manosilqueosina, 5'-metoxicarbonilmetiluracilo, 5-metoxiuracilo, 2-metil-N-isopenteniladenina, éster metílico del ácido uracil-5-oxiacético, ácido uracil-5-oxiacético, oxibutoxosina, pseudouracilo, queosina, 2-tiocitosina, 5-metil-2-tiouracilo, 2-tiouracilo, 4-tiouracilo, 5-metiluracilo, éster metílico del ácido N-uracil-5-oxiacético, ácido uracil 5-oxiacético, pseudouracilo, queosina, 2-tiocitosina y 2,6-diaminopurina.

Como se emplea en esta memoria, el término "nucleobase" es sinónimo de otros términos en uso en la técnica que incluyen "nucleótido", "desoxinucleótido", "residuo de nucleótido", "residuo de desoxinucleótido", "nucleótido trifosfato (NTP)" o desoxinucleótido trifosfato dNTP).

Un "oligonucleótido" se refiere a un ácido nucleico que incluye al menos dos unidades de monómero de ácido nucleico (p.ej, nucleótidos), típicamente más de tres unidades de monómero, y más típicamente mayor que diez unidades de monómero. El tamaño exacto de un oligonucleótido depende generalmente de diversos factores, que incluyen la función o uso final del oligonucleótido. Además para ilustrar, los oligonucleótidos tienen típicamente menos de 200 residuos largos (p. ej., entre 15 y 100), sin embargo, como se emplea en esta memoria, el término también pretende abarcar cadenas de polinucleótidos más largas. Los oligonucleótidos a menudo se denominan por su longitud. Por ejemplo, un oligonucleótido de 24 residuos se denomina "24-mer". Típicamente, los monómeros nucleósidos están unidos por enlaces fosfodiéster o sus análogos, que incluyen fosforitoato, fosfordiitoato, fosforoselenato, fosforodiselenato, fosforaniltoato, fosforanilidato, fosforamidato y similares, que incluyen contraiones asociados, p. ej.,  $H^+$ ,  $NH_4^+$ ,  $Na^+$ , y similares, si tales contraiones están presentes. Además, los oligonucleótidos son típicamente de una sola cadena. Los oligonucleótidos se preparan opcionalmente por cualquier método adecuado, que incluye, pero no se limita a, el aislamiento de una secuencia existente o natural, la replicación o amplificación del ADN, la transcripción inversa, la clonación y la digestión de restricción de secuencias apropiadas, o la síntesis química directa mediante un método tal como el método del fosfotriéster de Narang et al. (1979) *Meth Enzymol.* 68:90-99; el método del fosfodiéster de Brown et al. (1979) *Meth Enzymol.* 68:109-151; el método de la dietilfosforamidita de Beaucage et al. (1981) *Tetrahedron Lett.* 22:1859-1862; el método del triéster de Matteucci et al. (1981) *J Am Chem Soc.* 103:3185-3191; métodos de síntesis automatizados; o el método de soporte sólido de la patente de EE.UU. No. 4,458,066, titulada "PROCESS FOR PREPARING POLYNUCLEOTIDES", expedida el 3 de julio de 1984 a Caruthers et al., u otros métodos conocidos por los expertos en la técnica.

Una "secuencia" de un biopolímero se refiere al orden y la identidad de unidades monoméricas (p. ej., nucleótidos, etc.) en el biopolímero. La secuencia (p. ej., la secuencia de bases) de un ácido nucleico se lee típicamente en la dirección 5' a 3'.

### Descripción detallada de la invención

Una manera eficaz de detectar el cáncer colorrectal (CRC, del inglés colorectal cancer) en los primeros estadios es el cribado de la población. La colonoscopia y los ensayos de sangre oculta fecal (FOBT, del inglés fecal occult blood testing) son herramientas comúnmente utilizadas para el cribado de CRC, pero las tasas adherentes de ambos enfoques son bajas debido a la invasividad y el coste de la colonoscopia y la baja sensibilidad de FOBT (véase, p.

ej., Osborn NK, et al., *Gastroenterology* 2005; 128:192-206; Levin B, et al., *CA Cancer J Clin* 2008; 58:130-160). Por ejemplo, el ADN largo fecal cuantificado en tiempo real con Alu PCR es un enfoque simple para la detección de CRC, pero su sensibilidad es menos óptima cuando se ensaya solo (véase, p. ej., Zou H, et al., *Cancer Epidemiol Biomarcadores Prev* 2006; 15:1115-1119).

5 El ADN largo fecal se origina o de la exfoliación de células displásicas o de la hemorragia luminal o la exudación de leucocitos. Informes anteriores han supuesto que el ADN largo y la sangre oculta en heces resultaron de la pérdida de sangre, y como tal, supusieron que los ensayos de ADN largo fecal podrían ser una alternativa de ensayo de sangre oculta fecal (véase, p. ej., Kok JB, *Clin Chem*. 2003; 49:2112-2111). Sin embargo, los experimentos llevados a cabo durante la preparación de las realizaciones para la presente invención demostraron que el ADN largo era un  
10 marcador medible continuamente en heces y la sangre oculta era detectable sólo intermitentemente (véase, p. ej., Osborn NK, et al., *Gastroenterology* 2005; 128:192-206, Ahlquist DA, *Cancer* 1989; 63:1826-1830) indicando así que el ADN largo y la sangre oculta eran de diferentes fuentes y, como tales, eran marcadores complementarios para la detección de CRC. Los experimentos demostraron además que el ADN largo y la sangre oculta en heces proporcionan un enfoque sensible para la detección del cáncer colorrectal.

15 Idealmente, los enfoques para el cribado del cáncer colorrectal deben ser precisos, fáciles de usar y económicos. Tanto el ADN largo fecal como las pruebas de sangre oculta son enfoques no invasivos simples, pero sus sensibilidades para la detección de CRC son menos óptimas cuando se ensayan solos (véase, p. ej., Zou H, et al., *Cancer Epidemiol Biomarkers Prev* 2006; 15:1115-1119; Mandel JS, et al., *N Engl J Med* 1993; 328:1365-1371; Kronborg O, et al., *Lancet* 1996; 348:1467-1471; Hardcastle JD, et al., *Lancet* 1996; 348:1472-1477; Ahlquist DA, et al., *JAMA* 1993; 269:1262-1267; Imperiale TF, et al., *N Engl J Med* 2004; 351:2704-2714; Ahlquist DA, *Ann Intern Med* 2008; 149: 441-450; Ahlquist DA, *Gastroenterology* 2000; 119:1219-1227). Zou et al. (2009), *Gastroenterology* 136: A-625, describen un estudio que apunta a cuantificar y correlacionar el ADN humano y la hemoglobina en  
20 muestras de heces de pacientes con cáncer colorrectal y considerar un simple ensayo de heces para el cribado del cáncer. Zou et al. (2009), *Gastroenterology* 136:459-470, describen un ensayo de la curva de fusión digital (DMC, del inglés digital melt curve) para cuantificar mutaciones de baja abundancia en muestras de heces para detectar cáncer colorrectal. Como experimentos llevados a cabo durante la preparación de las realizaciones para la presente invención demostraron que el ADN largo basado en heces y la sangre oculta fecal son marcadores complementarios procedentes de diferentes fuentes, la presente invención, en algunas realizaciones, proporciona un ensayo  
25 cuantitativo que combina marcadores epiteliales exfoliados y marcadores de sangre oculta fecal (p. ej., la hemoglobina), produciendo un enfoque económico para la detección sensible de CRC.

Por consiguiente, la presente invención proporciona un método relacionado con la detección de marcadores específicos de cáncer colorrectal en la muestra de heces de un sujeto. En particular, la presente invención proporciona un método para identificar mamíferos que tienen un cáncer colorrectal detectando la presencia de marcadores epiteliales exfoliados y marcadores de sangre oculta fecal (p. ej., hemoglobina) en una muestra de  
35 heces obtenida del mamífero.

Un marcador, como se emplea en esta memoria, incluye, por ejemplo, cualquier molécula proteínica (o gen correspondiente) cuya producción o falta de producción es característica de una célula de cáncer colorrectal. El análisis estadístico variará dependiendo del conjunto particular de marcadores empleados en un análisis dado. Por ejemplo, cuando una combinación particular de marcadores es altamente específica para el cáncer colorrectal, la  
40 significación estadística de un resultado positivo será alta. Sin embargo, puede ser que dicha especificidad se logre a costa de la sensibilidad (p. ej., puede aparecer un resultado negativo incluso en presencia de cáncer colorrectal). Por la misma razón, una combinación diferente puede ser muy sensible (p. ej., pocos falsos negativos, pero tiene una especificidad inferior).

Se pueden utilizar combinaciones particulares de marcadores que muestren una función óptima con diferentes grupos étnicos o sexo, diferentes distribuciones geográficas, diferentes estadios de la enfermedad, diferentes grados de especificidad o diferentes grados de sensibilidad. Se pueden desarrollar también combinaciones particulares que son particularmente sensibles al efecto de los regímenes terapéuticos sobre la progresión de la enfermedad. Los sujetos pueden ser monitoreados después de una terapia y/o curso de acción para determinar la efectividad de esa  
45 terapia y/o curso de acción específicos.

Como se observa, los experimentos llevados a cabo durante el curso del desarrollo de las realizaciones para la presente invención determinaron un método y sistema mejorados para detectar cáncer colorrectal a través de la detección y evaluación tanto de la presencia como de la ausencia de marcadores epiteliales exfoliados (p. ej., ADN humano, alteraciones genéticas asociadas a tumores, proteínas asociadas a tumores) y marcadores de sangre oculta fecal (p. ej., hemoglobina) en una muestra de heces obtenida del mamífero.  
50

Los marcadores epiteliales exfoliados específicos para detectar cáncer colorrectal incluyen ácido nucleico. Los marcadores de ácidos nucleicos específicos del cáncer colorrectal son ácidos nucleicos que tienen una mutación puntual, ácidos nucleicos que tienen una metilación anormal.  
55

El ácido nucleico que tiene una mutación puntual puede codificar un polipéptido o regular la expresión de un polipéptido (p. ej., promotores, potenciadores y silenciadores). Ejemplos de ácidos nucleicos que pueden contener

una mutación puntual indicativa de un cáncer colorrectal incluyen a K-ras.

El ácido nucleico que tiene metilación anormal se puede utilizar para indicar la presencia de cáncer colorrectal (véase, p. ej., Muller et al., Lancet 2004 363:1283-1285). Ejemplos de ácidos nucleicos que tienen metilación anormal indicativa de cáncer colorrectal incluyen a bmp-3 y NDRG4.

- 5 La presente invención no se limita a detectar marcadores particulares de sangre oculta fecal específicos para cáncer colorrectal. En unas realizaciones, los marcadores de sangre oculta fecal específicos para detectar neoplasia colorrectal incluyen hemoglobina.

10 Cualquier método de ensayo de sangre oculta fecal se puede utilizar para detectar marcadores de sangre oculta fecal específicos del cáncer colorrectal. Por ejemplo, se pueden utilizar anticuerpos específicos para un marcador polipéptido en un inmunoensayo (p. ej., ELISA, del inglés Enzyme-Linked ImmunoSorbent Assay) para detectar la presencia o ausencia del polipéptido en una muestra de heces que es indicativa de la presencia de cáncer colorrectal. Para evaluar con exactitud la pérdida de sangre en el tracto digestivo, es importante que los ensayos de sangre oculta fecal actúen sobre los analitos que son estables durante el tránsito entérico. Los datos disponibles indican que tanto el método del guayaco como la FOBT inmunoquímica son insensibles para la detección de la pérdida de sangre del colon proximal (véase, p. ej., Imperiale, et al., N Engl J Med 2004, 351:2704-2714; Ahlquist, et al., Ann Intern Med 2008, 149:441-450; Harewood, et al., Mayo Clin Proc 2002, 77:23-28; Allison, et al., J Natl Cancer Inst 2007, 99:1462-1470). Por el contrario, el ensayo de la hemoporfirina HemoQuant es sensible tanto para las fuentes proximales como distales de la pérdida de sangre oculta (véase, p. ej., Harewood, et al., Mayo Clin Proc 2002, 77:23-28; Ahlquist, et al., N Engl J Med 1985, 312:1422-1428; Harewood, et al., Dig Dis. 2000,18(2):75-82).  
15  
20 Por consiguiente, en algunas realizaciones, el ensayo de la hemoporfirina HemoQuant se utiliza para detectar y/o cuantificar el marcador de hemoglobina de sangre oculta fecal específica de cáncer colorrectal.

25 La presente invención no se limita a una combinación particular de marcadores epiteliales exfoliados y marcadores de sangre oculta fecal en la detección de cáncer colorrectal en un sujeto. En algunas realizaciones, se utilizan uno o más marcadores epiteliales exfoliados (p. ej., bmp-3, K-ras. En algunas realizaciones, se utilizan uno o más marcadores de sangre oculta fecal (p. ej., hemoglobina).

30 Se observa que se puede analizar una única muestra de heces para un marcador específico de neoplasia colorrectal o para múltiples marcadores específicos de neoplasia colorrectal. Por ejemplo, se puede analizar una muestra de heces utilizando ensayos que detectan una serie de diferentes marcadores específicos de neoplasia colorrectal. Además, se pueden recoger múltiples muestras de heces para un solo mamífero y se analizan como se describe en la presente memoria. De hecho, las patentes de EE.UU. Nos. 5,670,325, 5,741,650, 5,928,870, 5,952,178, y 6,020,137 por ejemplo, describen diversos métodos que se pueden utilizar para preparar y analizar muestras de heces. La muestra de heces se puede descomponer en una primera y segunda porciones, donde la primera porción se somete a análisis para marcadores epiteliales exfoliados y la segunda porción se somete a análisis para marcadores de sangre oculta fecal. La muestra de heces puede experimentar una o más etapas de preprocesamiento antes de ser descompuesta en porciones.  
35

40 La presente invención no se limita a una manera particular de detectar marcadores de ácidos nucleicos correspondientes a neoplasia colorrectal a partir de una muestra de heces. El ácido nucleico se puede amplificar. Generalmente, el ácido nucleico utilizado como molde para la amplificación se aísla de las células contenidas en la muestra biológica de acuerdo con metodologías estándar (véase, p. ej., Sambrook, J., et al., Fritsch, E.F., Maniatis, T. (ed.). MOLECULAR CLONING. Cold Spring Harbor Lab. Press, Cold Spring Harbor, N.Y. (1989)). El ácido nucleico puede ser ADN genómico o ARN celular total o fraccionado. Cuando se utiliza ARN, se puede desear convertir el ARN en un ADNc complementario. El ARN puede ser ARN celular total y se utiliza directamente como molde para la amplificación. Los pares de cebadores que hibridan selectivamente con los genes correspondientes a marcadores específicos se ponen en contacto con el ácido nucleico aislado bajo condiciones que permiten la hibridación selectiva. Una vez hibridado, el complejo cebador de ácido nucleico se pone en contacto con una o más enzimas que facilitan la síntesis de ácido nucleico dependiente del molde. Se llevan a cabo múltiples rondas de amplificación, también denominadas como "ciclos", hasta que se produce una cantidad suficiente de producto de amplificación. A continuación, se detecta el producto de amplificación. En algunas solicitudes, la detección se puede realizar por medios visuales. Alternativamente, la detección puede implicar la identificación indirecta del producto mediante quimioluminiscencia, gammagrafía radiactiva de radiomarcador incorporado o marcador fluorescente o incluso mediante un sistema que utiliza señales de impulsos eléctricos o térmicos. Generalmente, el procedimiento anterior se lleva a cabo al menos dos veces en una muestra dada utilizando al menos dos pares de cebadores específicos diferentes para dos marcadores específicos diferentes. Después de la detección, los resultados observados en un sujeto dado se pueden comparar con un grupo de referencia estadísticamente significativo de sujetos diagnosticados que no tienen cáncer colorrectal.  
45  
50  
55

60 El término cebador, como se define en la presente memoria, se quiere decir que abarque cualquier ácido nucleico que sea capaz de cebar la síntesis de un ácido nucleico naciente en un procedimiento dependiente de molde. Típicamente, los cebadores son oligonucleótidos de diez a veinte pares de bases de longitud, pero se pueden emplear secuencias más largas. Los cebadores se pueden proporcionar en forma de doble cadena o de una sola cadena, aunque se prefiere la forma de una sola cadena.

En la mayoría de los casos, será preferible sintetizar los oligonucleótidos deseados. Los cebadores adecuados se pueden sintetizar utilizando sintetizadores comerciales utilizando métodos bien conocidos por el experto ordinario en la técnica. Cuando se desean cebadores de doble cadena, la síntesis de cebadores complementarios se realiza por separado y los cebadores se mezclan bajo condiciones que permiten su hibridación.

- 5 La selección de cebadores se basa en una variedad de factores diferentes, que dependen del método de amplificación y del marcador específico implicado. Por ejemplo, la elección del cebador determinará la especificidad de la reacción de amplificación. El cebador necesita ser suficientemente largo para hibridar específicamente con el ácido nucleico marcador y permitir la síntesis de productos de amplificación en presencia del agente de polimerización y bajo condiciones de temperatura apropiadas. Las moléculas de cebador más cortas generalmente  
10 requieren temperaturas más frías para formar complejos híbridos suficientemente estables con el ácido nucleico marcador y pueden ser más susceptibles a hibridación y amplificación no específicas.

- Las secuencias de los cebadores no necesitan corresponderse exactamente a la secuencia marcadora específica. Los fragmentos de nucleótidos no complementarios pueden estar fijos al extremo 5' del cebador, siendo el resto de la secuencia cebadora complementaria al molde. Alternativamente, las bases no complementarias pueden  
15 intercalarse en el cebador, siempre que la secuencia cebadora tenga suficiente complementariedad, en particular en el extremo 3', con el molde para que se produzca la reasociación y permita la síntesis de una cadena de ADN complementaria.

- Los cebadores se pueden diseñar para hibridarse con regiones específicas de la secuencia del ácido nucleico marcador. Por ejemplo, se prefieren las regiones ricas en GC porque que forman complejos de hibridación más  
20 fuertes que las regiones ricas en AT. En otro ejemplo, los cebadores están diseñados, únicamente, para hibridarse con un par de secuencias de exones, con al menos un intrón entre ellas. Esto permite que se detecte la actividad de un gen marcador frente a su presencia minimizando la amplificación de fondo de las secuencias genómicas y distingue fácilmente la amplificación diana por tamaño.

- Los cebadores también pueden estar diseñados para amplificar un segmento particular de ácido nucleico marcador que codifica sitios de restricción. Un sitio de restricción en el producto final de amplificación permitiría la digestión en  
25 ese sitio particular por la enzima de restricción relevante para producir dos productos de un tamaño específico. En este aspecto se puede utilizar cualquier enzima de restricción. Este perfeccionamiento añadido al procedimiento de amplificación puede ser necesario cuando se amplifica una secuencia de ácido nucleico marcador con semejanza a la secuencia cercana a otros ácidos nucleicos. Alternativamente, se puede utilizar como una confirmación añadida de la especificidad del producto de amplificación.  
30

- Están disponibles un número de procedimientos dependientes del molde para amplificar las secuencias marcadoras presentes en una muestra de molde dada. Uno de los métodos de amplificación más conocidos es la reacción en  
35 cadena de la polimerasa (PCR) (véase, p. ej., las patentes de EE.UU. Nos. 4,683,195, 4,683,202, 4,800,159, y Innis et al., PCR Protocols, Academic Press, Inc., San Diego, Calif. (1990)). Brevemente, en la PCR, se preparan dos secuencias cebadoras que son complementarias a regiones de cadenas opuestamente complementarias de la secuencia marcadora. Se añade un exceso de desoxinucleósido trifosfato a una mezcla de reacción junto con una ADN polimerasa, p. ej., Taq polimerasa. Si la secuencia marcadora está presente en una muestra, los cebadores se unirán al marcador y la polimerasa inducirá a que los cebadores se extiendan a lo largo de la secuencia marcadora  
40 añadiendo nucleótidos. Mediante el aumento y la disminución de la temperatura de la mezcla de reacción, los cebadores extendidos se separarán del marcador para formar los productos de reacción, los cebadores en exceso se unirán al marcador y a los productos de reacción y se repetirá el proceso. En algunas realizaciones, se realiza un procedimiento de amplificación por PCR con transcriptasa inversa para cuantificar la cantidad de ARNm amplificado. Son bien conocidos los métodos de transcripción inversa de ARN en ADNc (véase, p. ej., Sambrook, J., et al., Fritsch, E.F., Maniatis, T. (ed.). MOLECULAR CLONING. Cold Spring Harbor Lab. Press, Cold Spring Harbor, N.Y. (1989)). Alternativamente, los métodos para la transcripción inversa utilizan ADN polimerasas termoestables (véase,  
45 p. ej., WO 90/07641).

- La presente invención no se limita a una técnica de PCR particular. Los ejemplos de PCR incluyen, pero no se limitan a, PCR estándar, PCR de alelo específico, PCR de ensamblaje, PCR asimétrica, PCR digital, amplificación  
50 dependiente de helicasa, PCR de inicio en caliente, PCR específica de intersecuencia, PCR inversa, PCR mediada por ligación, PCR específica de metilación, PCR minicebador, amplificación de sondas dependientes de ligandos múltiples, PCR anidada, PCR de superposición-extensión, PCR en tiempo real, PCR de transcripción inversa, PCR en fase sólida, PCR termal de entrelazado asimétrico y PCR con rampa decreciente de temperaturas.

- Otro método para la amplificación es la reacción en cadena de la ligasa ("LCR") (véase, p. ej., las patentes de EE.UU. Nos. 4,883,750 y 5,494,810; incorporado en la presente memoria por referencia en su totalidad). En la LCR,  
55 se preparan dos pares de sondas complementarias, y en presencia de la secuencia marcadora, cada par se unirá a las cadenas opuestamente complementarias del marcador de manera que queden contiguas. En presencia de una ligasa, los dos pares de sondas se enlazarán para formar una única unidad. Mediante una variación cíclica de la temperatura, como en la PCR, las unidades ligadas enlazadas se disocian del marcador y luego sirven como "secuencias diana" para la ligación de pares de sondas en exceso.

- Después de la amplificación, puede ser deseable separar el producto de amplificación del molde y el exceso de cebador para el objeto de determinar si se produjo una amplificación específica. Los productos de amplificación se pueden separar mediante electroforesis en agarosa, agarosa-acrilamida o gel de poli(acrilamida) utilizando métodos estándar (véase, p. ej., Sambrook, J., et al., Fritsch, E.F., Maniatis, T. (ed.). MOLECULAR CLONING. Cold Spring Harbor Lab. Press, Cold Spring Harbor, N.Y. (1989)).
- Alternativamente, se pueden emplear técnicas cromatográficas para efectuar la separación. Hay muchos tipos de cromatografía que se pueden utilizar en la presente invención: adsorción, partición, intercambio iónico y tamiz molecular, y muchas técnicas especializadas para utilizarlas que incluyen cromatografía en columna, papel, capa fina y de gases (véase, p. ej., Freifelder, D. *Physical Biochemistry Applications to Biochemistry and Molecular Biology*. 2nd ed. Wm. Freeman & Co., New York, N.Y. 1982).
- Los productos de amplificación deben visualizarse para confirmar la amplificación de las secuencias marcadoras. Un método de visualización típico implica la tinción de un gel con bromuro de etidio y la visualización bajo luz UV. Alternativamente, si los productos de amplificación están marcados integralmente con nucleótidos radio-marcados o fluorométricamente marcados, los productos de amplificación se pueden exponer entonces a película de rayos X o visualizarse bajo espectros estimulantes apropiados, tras la separación.
- La visualización se puede lograr indirectamente. Por ejemplo, tras la separación de productos de amplificación, se pone en contacto una sonda de ácido nucleico con la secuencia marcadora amplificada. La sonda se conjuga preferiblemente con un cromóforo pero puede ser radio-marcada. La sonda también se puede conjugar con un componente de unión, tal como un anticuerpo o biotina, donde el otro miembro del par de unión lleva un resto detectable.
- La detección puede ser por transferencia Southern e hibridación con una sonda marcada. Las técnicas implicadas en la transferencia Southern son bien conocidas por aquellos expertos en la técnica y se pueden encontrar en muchos libros estándar sobre protocolos moleculares (véase, p. ej., Sambrook, J., et al., Fritsch, E.F., Maniatis, T. (ed.). MOLECULAR CLONING. Cold Spring Harbor Lab. Press, Cold Spring Harbor, N.Y. (1989)). Brevemente, se separan los productos de amplificación por electroforesis en gel. El gel se pone entonces en contacto con una membrana, tal como nitrocelulosa, que permite la transferencia del ácido nucleico y la unión no covalente. Posteriormente, la membrana se incuba con una sonda conjugada con cromóforo que es capaz de hibridarse con un producto de amplificación diana. La detección es mediante la exposición de la membrana a película de rayos X o dispositivos de detección que emiten iones.
- Se pueden reunir juntos en un kit todos los materiales esenciales básicos y reactivos necesarios para detectar el cáncer colorrectal a través de la detección tanto de la presencia como de la ausencia de marcadores epiteliales exfoliados (p. ej., ADN humano, alteración de genes asociados a tumores, proteínas asociadas a tumores) y marcadores de sangre oculta fecal (p. ej., hemoglobina, proteínas del suero) en una muestra de heces obtenida del mamífero. Tales kits comprenden generalmente, por ejemplo, los reactivos útiles, suficientes o necesarios para detectar y/o caracterizar uno o más marcadores epiteliales exfoliados específicos para una neoplasia colorrectal (p. ej., bmp-3, NDRG4, K-ras y los reactivos útiles, suficientes o necesarios para detectar y/o caracterizar uno o más marcadores de sangre oculta fecal específicos para una neoplasia colorrectal (p. ej., hemoglobina). Los kits pueden contener las enzimas adecuadas para amplificar ácidos nucleicos que incluyen diversas polimerasas, desoxinucleótidos y tampones para proporcionar la mezcla de reacción necesaria para la amplificación. Los kits pueden contener los reactivos necesarios para realizar en tiempo real la Alu PCR. Los kits pueden contener los reactivos necesarios para realizar el ensayo de la hemoporfirina HemoQuant. Los kits de la presente invención pueden incluir un medio para contener los reactivos en un compartimento cerrado para la venta comercial tal como, p. ej., recipientes de plástico moldeados por soplado o inyección en los que se retiene el reactivo deseado. También se pueden proporcionar otros recipientes adecuados para llevar a cabo ciertas etapas de los métodos descritos.
- Los métodos descritos en la presente memoria son útiles en la monitorización del tratamiento del cáncer colorrectal. Por ejemplo, los métodos se pueden realizar inmediatamente antes, durante y/o después de un tratamiento para monitorizar el éxito del tratamiento. En algunas realizaciones, los métodos se realizan a intervalos en pacientes sin enfermedad para asegurar el éxito del tratamiento.
- La presente solicitud también proporciona una variedad de variantes relacionadas con el ordenador. Específicamente, la solicitud proporciona la programación de ordenadores para analizar y comparar un patrón de resultados de detección de marcadores específicos de neoplasia colorrectal (p. ej., marcadores epiteliales exfoliados y marcadores de sangre oculta fecal) en una muestra de heces obtenida de un sujeto con, por ejemplo, una biblioteca de tales patrones de marcadores conocidos que son indicativos de la presencia o ausencia de un cáncer colorrectal, o de un estadio particular o de cáncer colorrectal.
- La presente solicitud proporciona la programación de ordenadores para analizar y comparar un primer y un segundo patrón de resultados de detección de marcadores específicos de neoplasia colorrectal (p. ej., marcadores epiteliales exfoliados y marcadores de sangre oculta fecal) de una muestra de heces tomada al menos en dos momentos diferentes. El primer patrón puede ser indicativo de una afección precancerosa y/o afección de bajo riesgo para el cáncer colorrectal y/o la progresión desde una afección precancerosa a una afección cancerosa. La comparación

proporciona la monitorización de la progresión de la afección desde el primer momento hasta el segundo momento.

La solicitud proporciona la programación de ordenadores para analizar y comparar un patrón de resultados de detección de marcadores específicos de neoplasia colorrectal (p. ej., marcadores epiteliales exfoliados y marcadores de sangre oculta fecal) de una muestra de heces con una biblioteca de patrones de marcadores específicos de neoplasia colorrectal conocidos que son indicativos de la presencia o ausencia de un cáncer colorrectal, en donde la comparación proporciona, por ejemplo, un diagnóstico diferencial entre una neoplasia colorrectal benigna y una neoplasia colorrectal agresivamente maligna (p. ej., el patrón marcador proporciona la estadificación y/o clasificación de la afección cancerosa).

Los métodos y sistemas descritos en la presente memoria se pueden implementar de numerosas maneras. Los métodos pueden implicar el uso de una infraestructura de comunicaciones, por ejemplo internet. A continuación se tratan varias realizaciones de la invención. También se entiende que la presente invención se puede implementar en diversas formas de hardware, software, firmware, procesadores o una combinación de los mismos. Los métodos y sistemas descritos en la presente memoria se pueden implementar como una combinación del hardware y el software. El software se puede implementar como un programa de aplicación incorporado de forma tangible en un dispositivo de almacenamiento de programas o en diferentes partes del software implementadas en el entorno informático del usuario (p. ej., como una miniaplicación) y en el entorno informático del revisor, donde el revisor puede estar ubicado en un sitio remoto (p. ej., en las instalaciones de un proveedor de servicios).

Por ejemplo, durante o después de la entrada de datos por el usuario, partes del procesamiento de datos se pueden realizar en el entorno informático del usuario. Por ejemplo, se puede programar el entorno informático del usuario para proporcionar códigos de ensayo definidos para indicar la plataforma, vehículo/ensayo de diagnóstico o ambos; procesamiento de datos utilizando banderas definidas y/o generación de configuraciones de banderas, donde las respuestas se transmiten como respuestas procesadas o parcialmente procesadas al entorno informático del revisor en forma de código de ensayo y configuraciones de banderas para la ejecución posterior de uno o más algoritmos para proporcionar resultados y/o generar un informe en el entorno informático del revisor.

El programa de aplicación para ejecutar los algoritmos descritos en la presente memoria se puede cargar a y ejecutar por una máquina que comprende cualquier arquitectura adecuada. En general, la máquina implica una plataforma informática que tiene hardware como una o más unidades centrales de procesamiento (CPU, en inglés central processing units), una memoria de acceso aleatorio (RAM, en inglés random access memory), y una interfaz (interfaces) de entrada/salida de datos (I/O, en inglés input/output). La plataforma informática también incluye un sistema operativo y un código de microinstrucción. Los diversos procedimientos y funciones descritos en la presente memoria o pueden ser parte del código de microinstrucción o parte del programa de aplicación (o una combinación de los mismos) que se ejecuta a través del sistema operativo. Además, se pueden conectar otros diversos dispositivos periféricos a la plataforma informática, tal como un dispositivo adicional de almacenamiento de datos y un dispositivo de impresión.

Como sistema informático, el sistema incluye generalmente una unidad de procesamiento. La unidad de procesamiento funciona para recibir información, que generalmente incluye los datos de ensayo (p. ej., los productos genéticos específicos analizados) y los datos del resultado del ensayo (p. ej., el patrón de resultados de detección de marcadores específicos de neoplasia colorrectal (p. ej., marcadores epiteliales exfoliados y marcadores de sangre oculta fecal) de una muestra de heces). Esta información recibida se puede almacenar al menos temporalmente en una base de datos y los datos analizados en comparación con una biblioteca de patrones marcadores conocidos que son indicativos de la presencia o ausencia de una afección precancerosa o que se sabe que son indicativos de un estadio y/o grado de cáncer colorrectal.

Parte o todos de los datos de entrada y salida también se pueden enviar electrónicamente; ciertos datos de salida (p. ej., informes) se pueden enviar electrónicamente o vía telefónica (p. ej., por facsímil, p. ej., utilizando dispositivos tales como el fax). Los dispositivos receptores de salida ejemplares pueden incluir un elemento de visualización, una impresora, un dispositivo facsímil y similares. Las formas electrónicas de transmisión y/o visualización pueden incluir correo electrónico, televisión interactiva y similares. En algunas variantes, todos o una parte de los datos de entrada y/o todos o una parte de los datos de salida (p. ej., normalmente al menos la biblioteca del patrón de resultados de detección de marcadores específicos de neoplasia colorrectal (p. ej., marcadores epiteliales exfoliados y marcadores de sangre oculta fecal) se sabe que son indicativos de la presencia o ausencia de una afección precancerosa) se mantienen en un servidor para el acceso, p. ej., acceso confidencial. Se puede acceder a los resultados o se pueden enviar a los profesionales como se desee.

Un sistema para su uso en los métodos descritos en la presente memoria incluye generalmente al menos un procesador informático (p. ej., cuando el método se lleva a cabo en su totalidad en un único sitio) o al menos dos procesadores informáticos conectados en red (p. ej., cuando se detectan datos del marcador para una muestra de heces obtenida de un sujeto se deben introducir por un usuario (p. ej., un técnico o alguien que realice los ensayos de la actividad) y se transmite a un sitio remoto a un segundo procesador informático para el análisis (p. ej., cuando el patrón de resultados de detección de marcadores específicos de neoplasia colorrectal (p. ej., marcadores epiteliales exfoliados y marcadores de sangre oculta fecal) se compara con una biblioteca de patrones que se sabe que son indicativos de la presencia o ausencia de una afección precancerosa), donde los procesadores informáticos

primero y segundo están conectados por una red, p. ej., a través de una intranet o internet). El sistema también puede incluir un(os) componente(s) de usuario para la entrada; y un(os) componente(s) de revisor para la revisión de datos, y la generación de informes, que incluye la detección de una afección precancerosa, estadificación y/o clasificación de una neoplasia colorrectal, o la monitorización de la progresión de una afección precancerosa o una neoplasia colorrectal. Los componentes adicionales del sistema pueden incluir un(os) componente(s) de un servidor; y una o más bases de datos para almacenar datos (p. ej., como en una base de datos de elementos de informe, p. ej., una biblioteca de patrones de marcadores conocidos que son indicativos de la presencia o ausencia de una condición precancerosa y/o se sabe que son indicativos de un grado y/o un estadio de una neoplasia colorrectal, o una base de datos relacional (RDB, del inglés relational database) que puede incluir la entrada de datos por el usuario y salida de datos. Los procesadores informáticos pueden ser procesadores que se encuentran típicamente en ordenadores de sobremesa personales (p. ej., IBM, Dell, Macintosh), ordenadores portátiles, ordenadores centrales, miniordenadores u otros dispositivos de computación.

Los componentes de entrada pueden ser ordenadores personales independientes, completos que ofrecen una gama completa de potencia y características para ejecutar aplicaciones. El componente de usuario funciona normalmente bajo cualquier sistema operativo deseado e incluye un elemento de comunicación (p. ej., un módem u otro hardware para conectarse a una red), uno o más dispositivos de entrada (p. ej., un teclado, ratón, teclado numérico u otro dispositivo utilizado para transferir información o comandos), un elemento de almacenamiento (p. ej., un disco duro u otro medio de almacenamiento legible por ordenador, grabable por ordenador), y un elemento de visualización (p. ej., un monitor, televisión, LCD, LED u otro dispositivo de visualización que transmita información al usuario). El usuario introduce los comandos de entrada en el procesador informático a través de un dispositivo de entrada. Generalmente, la interfaz de usuario es una interfaz gráfica de usuario (GUI, en inglés graphical user interface) escrita para aplicaciones de navegador web.

El/los componente(s) del servidor puede(n) ser un ordenador personal, un miniordenador o un ordenador central y ofrece(n) gestión de datos, intercambio de información entre clientes, seguridad y administración de red. La aplicación y cualquier base de datos utilizada pueden estar en el mismo o en diferentes servidores.

Se contemplan otras configuraciones informáticas para el usuario y el/los servidor(es), que incluye(n) el procesamiento en una única máquina tal como un ordenador central, una colección de máquinas u otra configuración adecuada. En general, las máquinas del usuario y del servidor funcionan juntas para lograr el procesamiento.

Cuando se utiliza(n), la(s) base(s) de datos normalmente está(n) conectada(s) al componente del servidor de base de datos y puede ser cualquier dispositivo que contenga los datos. Por ejemplo, la base de datos puede ser cualquier dispositivo de almacenamiento óptico o magnético para un ordenador (p. ej., CDROM, disco duro interno, unidad de cinta). La base de datos puede estar ubicada de forma remota al componente del servidor (con acceso a través de una red, módem, etc.) o localmente al componente del servidor.

Cuando se utiliza en el sistema y los métodos, la base de datos puede ser una base de datos relacional que se organiza y se accede según relaciones entre elementos de datos. La base de datos relacional se compone generalmente de una pluralidad de tablas (entidades). Las filas de una tabla representan registros (colecciones de información sobre elementos separados) y las columnas representan campos (atributos particulares de un registro). En su concepción más simple, la base de datos relacional es una colección de entradas de datos que "se relacionan" entre sí a través de al menos un campo común.

Se pueden utilizar estaciones de trabajo adicionales equipadas con ordenadores e impresoras en el punto de servicio para introducir datos y, si se desea, generar informes adecuados. El/los ordenador(es) puede(n) tener un acceso directo (p. ej., en el escritorio) para iniciar la aplicación para facilitar el inicio de la entrada, la transmisión, el análisis, la recepción del informe, etc., según se desee

La presente solicitud proporciona métodos para obtener el perfil de riesgo de un sujeto para desarrollar cáncer colorrectal. Tales métodos pueden implicar obtener una muestra de heces de un sujeto (p. ej., un ser humano en riesgo para desarrollar cáncer colorrectal, un ser humano sometido a un examen físico de rutina), detectar la presencia o ausencia de uno o más marcadores epiteliales exfoliados específicos para una neoplasia colorrectal en o asociado con la muestra de heces, detectar la presencia o ausencia de uno o más marcadores de sangre oculta fecal (p. ej., específicos para una neoplasia colorrectal) en o asociados con la muestra de heces y generar un perfil de riesgo para desarrollar cáncer colorrectal basado en la presencia o ausencia detectada de marcadores epiteliales exfoliados y marcadores de sangre oculta fecal. Por ejemplo, un perfil de riesgo generado cambiará dependiendo de los marcadores epiteliales exfoliados específicos y los marcadores de sangre oculta fecal detectados como presentes o ausentes. Este método no se limita a una forma particular de generar el perfil de riesgo. Se puede utilizar un procesador (p. ej., un ordenador) para generar tal perfil de riesgo. El procesador puede utilizar un algoritmo (p. ej., un software) específico para interpretar la presencia y ausencia de marcadores epiteliales exfoliados específicos y marcadores de sangre oculta fecal como se determina con los métodos de la presente invención. La presencia y ausencia de marcadores epiteliales exfoliados específicos y marcadores de sangre oculta fecal se puede determinar con los métodos de la presente invención se introducen en tal algoritmo y se describe el perfil de riesgo basado en una comparación de dicha entrada con normas establecidas (p. ej., norma establecida

para la condición precancerosa, norma establecida para diversos niveles de riesgo para desarrollar cáncer colorrectal, norma establecida para sujetos diagnosticados con diversos estadios de cáncer colorrectal). En algunas variantes, el perfil de riesgo indica el riesgo de un sujeto para desarrollar cáncer colorrectal o el riesgo de un sujeto para volver a desarrollar cáncer colorrectal. En algunas variantes, el perfil de riesgo indica que un sujeto tiene, por ejemplo, una probabilidad muy baja, baja, moderada, alta y muy alta de desarrollar o volver a desarrollar cáncer colorrectal. En algunas variantes, el perfil de riesgo indica el riesgo basado en la media de población a un nivel de especificidad deseado (p. ej., 90%). En algunas variantes, un proveedor de atención médica (p. ej., un oncólogo) utilizará tal perfil de riesgo en la determinación de un ciclo de tratamiento o intervención (p. ej., colonoscopia, esperar a ver qué pasa, remisión a un oncólogo, remisión a un cirujano, etc.)

10 **Ejemplos**

La invención que ahora se describe en general se entenderá más fácilmente por referencia al siguiente ejemplo, que se incluye simplemente para los fines de la ilustración de ciertos aspectos y realizaciones de la presente invención, y no pretende limitar la invención.

Ejemplo 1

15 **Sujetos**

Se reclutaron un total de doscientos un sujetos, que incluyen 74 pacientes con CRC, 27 con adenoma avanzado (≥1 cm) y 100 individuos colonoscópicamente normales. Sus características demográficas y clínicas se describen en la Tabla 1.

Tabla 1. Características demográficas y clínicas de los sujetos

	Cáncer Colorrectal	Adenoma avanzado	Control normal
Número	74	27	100
Media de edad (Rango)	61 (40-87) años	67 (50-82) años	59(28-81) años
Sexo (Hombre/Mujer)	52/22	15/12	37/63
Localización (Derecho/Izquierdo)	29/45	17/10	
Estadio (I/II/III/IV)	13/16/27/18		
Grado (1/2/3/4) o Displasia (Baja/Alta)	0/4/55/5	20/5	

20

Recogida de heces

Las heces se recogieron más de 2 semanas después de cualquier procedimiento de diagnóstico colorrectal o preparación catártica y antes o de la resección endoscópica o quirúrgica de la neoplasia. Los pacientes recogieron heces enteras en un tampón conservante (0,5 mol/L de Tris, 10 mmol/L de NaCl, 150 mmol/L de EDTA, pH 9,0) como se describe (véase, p. ej. Olson J, et al., *Diagn Mol Pathol* 2005; 14:183-191; incorporado en la presente memoria por referencia en su totalidad) y enviado por correo a un laboratorio en 48 horas. Una vez que las heces llegaron al laboratorio, se pesaron y se homogeneizaron. Se utilizó una alícuota equivalente a 10g de heces para la extracción de ADN de heces y el resto se almacenó a 80°C en alícuotas.

25

Cuantificación de ADN largo con Alu-PCR en tiempo real

Se extrajo ADN crudo de heces con isopropanol, se precipitó con etanol y se eluyó en 7,5 ml de tampón 1xTE. El ADN humano en el ADN crudo de heces se cuantificó utilizando el método Alu-PCR en tiempo real (véase, p. ej., Zou H, et al., *Cancer Epidemiol Biomarkers Prev* 2006; 15:1115-1119; incorporado en la presente memoria por referencia en su totalidad). Se utilizaron los cebadores específicos para las secuencias Alu humanas, sentido: 5'-ACG CCT GTA ATC CCA GCA CTT-3'; y antisentido: 5'-TCG CCC AGG CTG GAG TGC A-3' para amplificar secuencias de aproximadamente 245 pb dentro de las repeticiones Alu (véase, p. ej., Zou H, et al., *Cancer Epidemiol Biomarkes Prev* 2006; 15:1115-1119; Zijlstra A, et al., *Cancer Res* 2002; 62:7083-7092; cada uno incorporado en la presente memoria por referencia en sus totalidades). El ADN crudo de heces se diluyó de 1 a 100 con agua libre de nucleasa para la amplificación por PCR. Un µL de ADN de heces diluido en agua se amplificó en un volumen total de 25 µL que contenía 1×iQ™ SYBR® Green Supermix (BioRad), 200 nM de cada cebador en las siguientes condiciones: 95°C durante 3 minutos, seguido por 30 ciclos de 95°C durante 30 segundos, 60°C durante 30 segundos y 72°C durante 40 segundos en tiempo real en un ICycler® (BioRad). Se creó una curva estándar para cada placa amplificando muestras de ADN genómico humano diluidas en serie 10

30

35

40

veces (Novagen, Madison, WI). Se hizo después la curva de fusión de cada reacción de PCR para confirmar que sólo se amplificó un producto para todas las muestras. La amplificación se llevó a cabo en placas de 96 pocillos. Cada placa consistía en muestras de ADN de heces y múltiples controles positivos y negativos. Se realizó cada ensayo por duplicado.

#### 5 Cuantificación de sangre oculta fecal con HemoQuant

Se cuantificó la sangre oculta fecal con el ensayo HemoQuant (véase, p. ej., Harewood GC, et al., Mayo Clin Proc 2002; 77:23-28; Ahlquist DA, et al., JAMA 1993; 269:1262-1267; Ahlquist DA, et al., N Engl J Med 1985; 312:1422-1428; Ahlquist DA, et al., Ann Intern Med 1984; 101:297-302; Schwartz S, et al., Clin Chem 1983, 29:2061-2067; Schwartz S, et al., Gastroenterology 1985; 89:19-26). Tampón (0,5 mol/L de Tris, 10 mmol/L de NaCl, 150 mmol/L de EDTA, pH 9,0) (véase, p. ej., Olson J, et al., Diagn Mol Pathol 2005; 14:183-191) Se utilizó una suspensión de heces conservada congelada equivalente a 8 mg de heces para realizar el ensayo HemoQuant con un sistema automatizado en un laboratorio clínico. El hemo no fluorescente en la muestra de heces se convirtió en porfirinas fluorescentes por eliminación del hierro con 2 ml de ácido oxálico caliente (60°C) y 0,2 ml de sulfato ferroso. Se extrajo después la mezcla de reacción con 3 ml de acetato de etilo: isobutil alcohol (11,1:1, v/v), seguido de lavado con 3 ml de disolución acuosa alcalina de acetato de potasio y se extrajo adicionalmente con 2,5 ml de ácido acético/ácido fosfórico. Las porfirinas extraídas, en su mayoría protoporfirina, se cuantifican basándose en la intensidad de emisión de fluorescencia a 652 nm utilizando 405 nm como longitud de onda de excitación en un lector de microplacas Infinite®200 (Tecan, Männedorf, Suiza). Cada placa consistía en muestras de heces, patrones y controles negativos y positivos. Se hicieron patrones con cantidades conocidas de hemoglobina de sangre humana.

#### 20 Análisis estadístico

Se utilizó un procedimiento logístico para calcular la correlación de los niveles de ADN largo y hemoglobina en heces. Se utilizó el ensayo de Wilcoxon Rank Sum para comparar los niveles de ADN largo o hemoglobina entre cada uno de los tres grupos de heces diferentes y evaluar la asociación de los niveles de marcadores con la localización del tumor, el sexo, el estadio de Dukes y el grado de diferenciación. Se calculó la correlación de los niveles de marcadores con el tamaño del tumor y la edad del paciente con el procedimiento Logístico. Se utilizaron los ensayos de Chi-cuadrado y el ensayo exacto de Fisher para evaluar la asociación de la tasa de detección del panel marcador con las características clínicas. Se calculó la combinación de los niveles de ADN largo y hemoglobina con un modelo logístico. Se construyó la Curva Operativa del Receptor (ROC, del inglés Receiver Operating Curve) para comparar los niveles de ADN largo y hemoglobina en los cánceres o adenomas versus sujetos normales, y se calculó también el valor del área bajo la curva (AUC, del inglés área under the curve) para cada curva. Se calcularon las sensibilidades al 90% de especificidad para los marcadores individuales y su combinación. El análisis estadístico se llevó a cabo con el software SAS (SAS Institute, Cary, NC).

#### Resultados

Los niveles medios de ADN humano fueron 421 (rango: 0-19.140), 86 (0-6.260) y 11 (0-30.000) ng por g de heces de pacientes con CRC o adenomas, o de controles normales, respectivamente ( $p=0,0001$ , CRC vs normal,  $p=0,0005$ , adenoma vs normal,  $p=0,007$ , CRC vs adenoma, Figura 1A). Los niveles medios de hemoglobina fueron 3,4 (0,1-36,1), 1,5 (0,1-10,9) y 1,1 (0,3-11,0) mg por g de heces de pacientes con CRC o adenomas, o de controles normales, respectivamente ( $p=0,0001$ , CRC vs normal o adenoma;  $p=1,0$ , adenoma vs normal; Figura 1B). El ADN largo fecal y los niveles de sangre oculta no se correlacionaron ( $R^2=0,0001$ ; Figura 2).

Al 90% de especificidad, los ensayos de ADN largo detectaron un 70% de cánceres colorrectales y un 46% de adenomas, mientras que los ensayos de sangre oculta detectaron un 50% y un 12% (Figuras 1 y 3). La combinación de estos ensayos detectó un 80% de cánceres colorrectales y un 46% de adenomas al 90% de especificidad (Figura 3). Para la detección del cáncer colorrectal, los valores de AUC fueron 0,82, 0,78 y 0,90 para el ADN largo fecal, la sangre oculta y la combinación de ensayos, respectivamente ( $p=0,02$ , ADN largo vs combinación;  $p=0,0001$ , sangre oculta vs combinación; Figura 3). Para la detección del adenoma avanzado, los valores de AUC fueron de 0,72, 0,50 y 0,72 para los ensayos de ADN fecal, sangre oculta y combinación, respectivamente ( $p=0,8$ , ADN largo vs combinación;  $p=0,03$ , sangre oculta vs combinación; Figura 3).

El nivel medio (rango) de ADN largo fecal fue de 181 (0-7.120) ng/g de heces con cánceres en estadio 1-2 y 910 (0-19.140) ng/g de heces con cánceres en estadio 3-4,  $p=0,001$ ; y 112 (0-4.780) ng/g de heces con cáncer proximal y 1.006 (0-19.140) ng/g de heces con cáncer distal,  $p=0,0001$ . El nivel medio de sangre oculta fecal fue de 7,0 mg Hb/g (0,2-26,4 mg/g) con cánceres proximales y 2,5 mg/g (0,13-36,1 mg/g) con distales,  $p=0,04$ . Los niveles medios de ADN largo fecal y de sangre oculta en heces de pacientes con CRC y adenomas avanzados no se asociaron con otras características clínicas. El tamaño medio fue de 4,0 cm (1,0-15,0) para las neoplasias detectadas por los ensayos combinados y de 3,7 cm (1,0-7,0) para las neoplasias no detectadas,  $p=0,02$ . Las tasas de detección de neoplasias por los ensayos combinados no se vieron afectadas ni por el sitio ni por el estadio del tumor.

**Equivalentes**

La invención se puede realizar en otras formas específicas. Por lo tanto, las realizaciones anteriores se deben considerar en todos los aspectos ilustrativas en lugar de limitar la invención descrita en la presente memoria.

**REIVINDICACIONES**

1. Un método para detectar la presencia de una neoplasia colorrectal en un mamífero, comprendiendo dicho método:
  - 5 a) detectar la presencia de marcadores epiteliales exfoliados en una muestra de heces obtenida de dicho mamífero, en donde dichos marcadores epiteliales exfoliados específicos para una neoplasia colorrectal comprenden marcadores de ácidos nucleicos específicos de neoplasia colorrectal que comprenden un gen que tiene una mutación puntual y genes que tienen metilación aberrante; y
  - b) detectar la presencia de un marcador de sangre oculta fecal en dicha muestra de heces;
  - 10 c) identificar dicho mamífero que tiene una neoplasia colorrectal cuando se detecta la presencia de ambos marcadores epiteliales exfoliados en dicha muestra de heces y el marcador de sangre oculta fecal en dicha muestra de heces.
2. El método de la reivindicación 1, en donde dicha neoplasia colorrectal es premaligna.
3. El método de la reivindicación 1, en donde dicha neoplasia colorrectal es maligna.
4. El método de la reivindicación 1, en donde dicho gen que tiene una mutación puntual es K-ras.
5. El método de la reivindicación 1, en donde dichos genes que tienen metilación aberrante son bmp-3 y NDRG4.
- 15 6. El método de la reivindicación 1, en donde dicho marcador de sangre oculta fecal es hemoglobina.
7. El método de la reivindicación 1, en donde dicho mamífero es un ser humano.

FIGURA 1

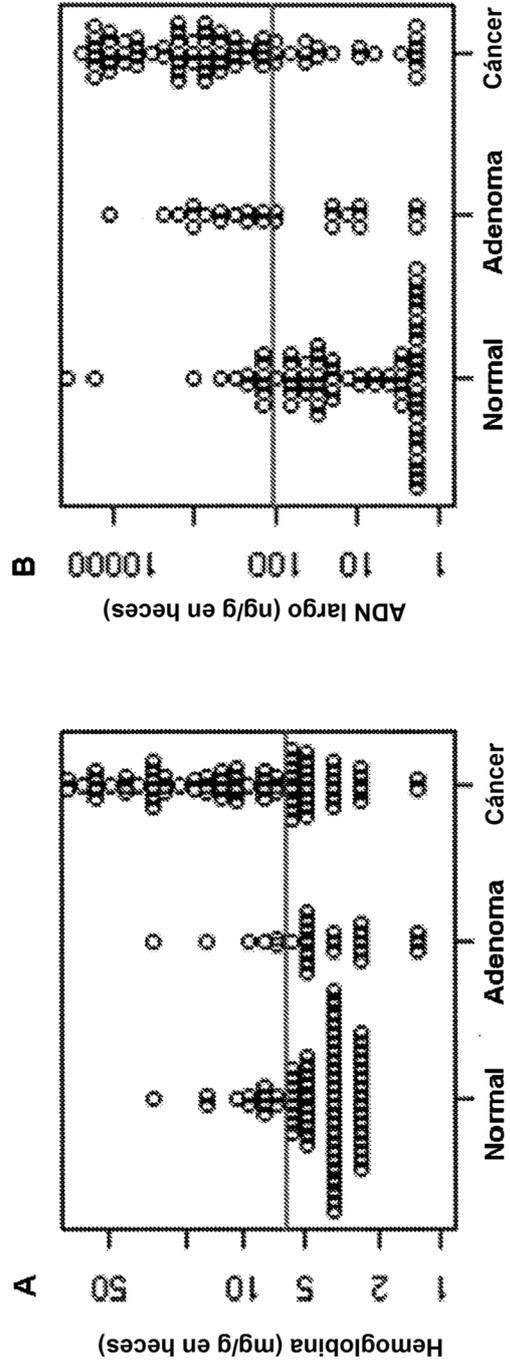


FIGURA 2

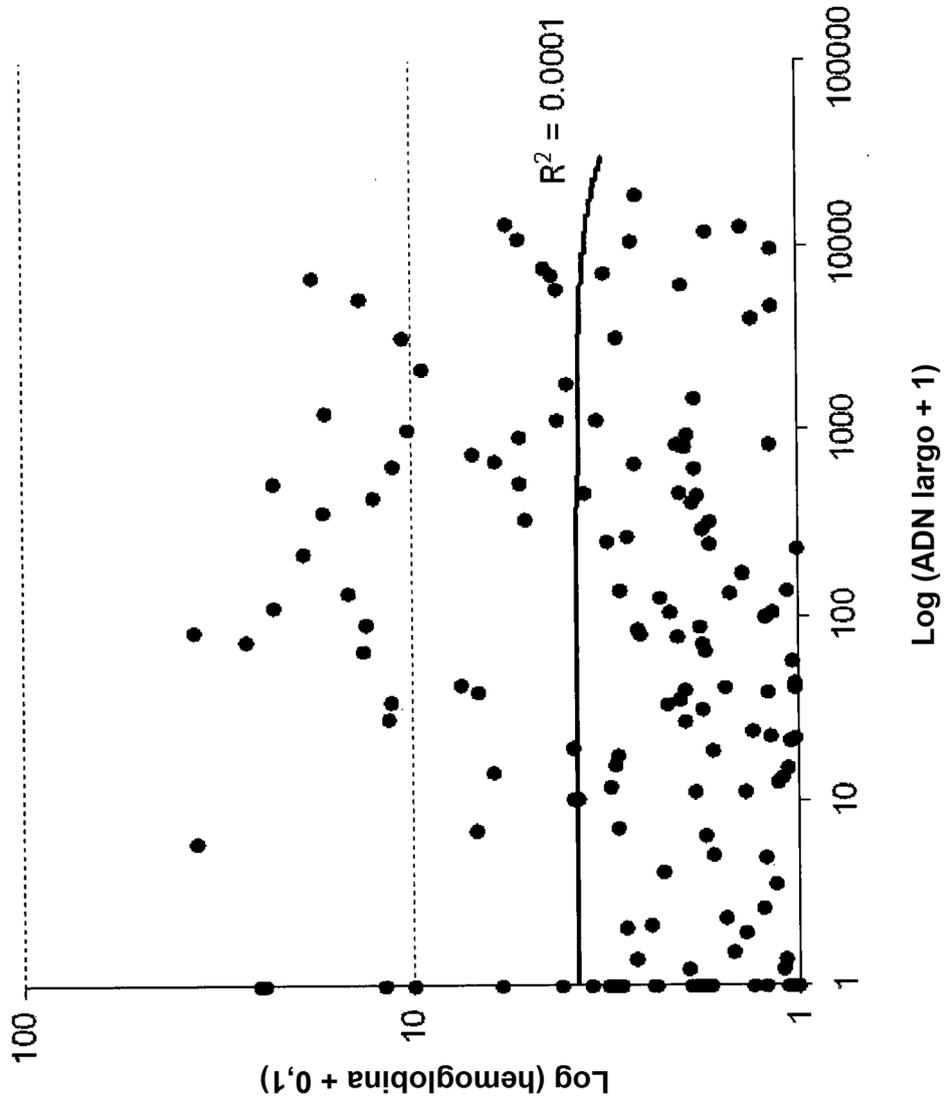


FIGURA 3

