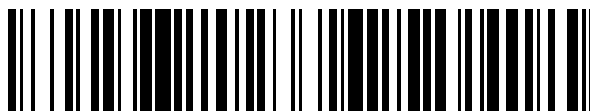


19



OFICINA ESPAÑOLA DE
PATENTES Y MARCAS

ESPAÑA



11 Número de publicación: **2 661 684**

51 Int. Cl.:

C12Q 1/68

(2006.01)

12

TRADUCCIÓN DE PATENTE EUROPEA

T3

96 Fecha de presentación y número de la solicitud europea: **03.03.2014 E 14382074 (4)**

97 Fecha y número de publicación de la concesión europea: **06.12.2017 EP 2915884**

54 Título: **Método para diagnosticar cáncer colorrectal a partir de una muestra de heces humanas mediante PCR cuantitativa**

45 Fecha de publicación y mención en BOPI de la traducción de la patente:
03.04.2018

73 Titular/es:

**FUNDACIO INSTITUT D'INVESTIGACIÓ
BIOMÈDICA DE GIRONA DR. JOSEP TRUETA
(50.0%)**

**C/ Dr. Castany, s/n, Edific M2 - Parc Hospitalari
Martí i Julià**

17190 Salt (Girona), ES y

UNIVERSITAT DE GIRONA (50.0%)

72 Inventor/es:

**GARCÍA-GIL, JESÚS;
ALDEGUER, XAVIER;
SERRA PAGÈS, MARIONA y
MAS DE XAXARS, TERESA**

74 Agente/Representante:

MARTÍN BADAJOZ, Irene

Observaciones :

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

ES 2 661 684 T3

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

DESCRIPCIÓN

Método para diagnosticar cáncer colorrectal a partir de una muestra de heces humanas mediante PCR cuantitativa

5 **Campo de la invención**

La presente invención se refiere a métodos de diagnóstico molecular. Específicamente, en la presente invención, se diagnostica cáncer colorrectal a partir de la cuantificación mediante PCR de secuencias de ADN bacteriano específicas presentes en las heces.

10

Antecedentes de la invención

El cáncer colorrectal (CRC) es la segunda causa principal de muerte debida a cáncer en Europa y en los Estados Unidos, y es el cáncer que se diagnostica con la mayor frecuencia en Europa, con más de 400.000 nuevos casos y 200.000 muertes en 2008.

15

Estos datos reflejan que es necesario tomar medidas preventivas. La medida más efectiva y económica para reducir la incidencia de CRC y la mortalidad son pruebas de detección del riesgo de desarrollar CRC, por tanto, se requiere una mejora de la sensibilidad de los propios métodos de detección. Por este motivo, resulta crucial una mejor comprensión de la etiología del CRC para hallar el biomarcador clave para la detección del riesgo de desarrollar CRC.

20

La base genética y la evolución natural del CRC están bien definidas, considerando que menos del 5% de los CRC son hereditarios, y la mayoría son esporádicos, diagnosticados en pacientes sin antecedentes personales o familiares de neoplasia de colon. Todavía se desconoce la etiología de esta enfermedad, aunque se sospecha de un origen multifactorial en el que participan activamente factores endógenos y exógenos en el desarrollo de un tumor. Estos factores son: la edad, el tabaquismo, antecedentes personales de enfermedad inflamatoria del intestino, la dieta, el estilo de vida y, más recientemente, la microbiota.

25

Recientemente se ha demostrado que las comunidades bacterianas en la mucosa del colon de pacientes con CRC difieren de las de individuos sanos y se ha propuesto la microbiota intestinal como agente determinante en el desarrollo y la progresión de CRC a lo largo de sus estadios (Chen W *et al.* Human intestinal lumen and mucosa-associated microbiota in patients with colorectal cancer. PLoS One. 2012;7(6):e39743; Zhu Q *et al.* The role of gut microbiota in the pathogenesis of colorectal cancer. Tumour Biol. Junio de 2013;34(3):1285-300; Ahn J *et al.* Human gut microbiome and risk for colorectal cancer. J Natl Cancer Inst. 18 de diciembre de 2013;105(24):1907-11).

30

35

Na wu *et al* (Microbial ecology, 2013;66(2):462-470) describen las diferencias observadas en la composición de la microbiota fecal entre individuos sanos y pacientes con CRC. Mencionan el posible uso de *Fusobacterium spp.* como marcador fecal para el diagnóstico preliminar de CRC. Sin embargo, no proporcionan ningún dato de especificidad/sensibilidad que confirme realmente la utilidad de *Fusobacterium spp.* como biomarcador de diagnóstico de CRC en muestras fecales.

40

Por otra parte, Hassan Brim *et al* (PLoS ONE, 8(12), e81352) se refieren a la obtención de perfiles taxonómicos de secuencias bacterianas en muestras de heces de individuos sanos y pacientes con pólipos en el colon usando tecnología de micromatrices génicas de ARNr 16S y pirosecuenciación. Se dice que la presencia de pólipos en el colon está asociada con un riesgo del 10% de progresión maligna. No se notifican diferencias en la composición de la microbiota a nivel de género entre los dos grupos. A nivel de subgénero, se encontró que predominaban las bacterias del grupo *Bacteroides* en las muestras de pacientes con pólipos. No obstante, el análisis metagenómico no reveló diferencias importantes en las abundancias/prevalencias de genes bacterianos entre los dos grupos ni siquiera cuando se restringieron el análisis y las comparaciones a genomas de *Bacteroides* disponibles.

50

Teresa Mas de Xaxars. (2012, Depósito legal: GI. 1664-2012, <http://hdl.handle.net/10803/94513>) divulga una asociación en muestras de mucosa intestinal entre CRC y la prevalencia de las secuencias bacterianas de SEQ ID NO:1, SEQ ID NO:4, SEQ ID NO:7 y SEQ ID NO:10 de la presente invención tal como se determina mediante electroforesis en gel con gradiente de desnaturalización (DGGE). Sin embargo, este documento no enseña que haya una asociación entre la abundancia de estas secuencias y el diagnóstico de CRC. Además, la relación observada es en muestras de mucosa, no en muestras de heces.

55

Puede considerarse que el problema que ha de resolverse es la provisión de un método fiable para diagnosticar cáncer colorrectal a partir de muestras de heces humanas.

60

La presente invención, tal como se define en las reivindicaciones, proporciona una solución a este problema.

Descripción de la invención

65

En la presente invención, se han identificado secuencias bacterianas específicas asociadas con el diagnóstico de

cáncer colorrectal y el diagnóstico del riesgo de desarrollar cáncer colorrectal.

Una realización preferida es un método para diagnosticar cáncer colorrectal a partir de una muestra de heces humanas, que comprende:

5 (a) determinar mediante PCR cuantitativa en dicha muestra de heces humanas la concentración de al menos una secuencia bacteriana de ADNr 16S seleccionada del grupo que consiste en SEQ ID NO: 4, SEQ ID NO: 7 y SEQ ID NO: 10, en el que se determina la concentración de SEQ ID NO: 4 usando cebadores con una identidad de al menos el 90% con respecto a SEQ ID NO: 5-6, se determina la concentración de SEQ ID NO: 7 usando cebadores con una
10 identidad de al menos el 90% con respecto a SEQ ID NO: 8-9 y se determina la concentración de SEQ ID NO: 10 usando cebadores con una identidad de al menos el 90% con respecto a SEQ ID NO: 11-12,

15 (b) opcionalmente, determinar al menos una de las razones de concentraciones seleccionadas del grupo que consiste en SEQ ID NO: 10/SEQ ID NO: 4 y SEQ ID NO: 7/SEQ ID NO: 4, y

(c) diagnosticar cáncer colorrectal a partir de la concentración de al menos una de las secuencias de la etapa (a) y/o el valor de al menos una razón obtenida en la etapa (b); en el que se diagnostica cáncer colorrectal en la etapa c) si hay un aumento del valor de Ct de al menos una de las secuencias de la etapa (a) y/o una disminución del valor de al menos una razón obtenida en la etapa (b) con respecto a un valor de punto de corte, y con ello, el método para
20 diagnosticar cáncer colorrectal de la invención.

En la presente solicitud, la secuencia identificada mediante SEQ ID NO: 1 también se identifica como "B3". De manera similar, SEQ ID NO: 4 también se identifica como "B10", SEQ ID NO: 7 también se identifica como "B46" y SEQ ID NO: 10 también se identifica como "B48". B3, B10, B46 y B48 fueron los nombres usados por los inventores de la presente solicitud para identificar las secuencias durante la realización de todos los experimentos llevados a
25 cabo para llegar a la presente invención.

Las secuencias identificadas mediante SEQ ID NO: 1, 4, 7 y 10 están disponibles en bases de datos de secuencias públicas con los siguientes números de acceso: GQ411111.1 (SEQ ID NO: 1), GQ411118.1 (SEQ ID NO: 4),
30 GQ411150.1 (SEQ ID NO: 7), GQ411152.1 (SEQ ID NO: 10).

Sin embargo, en la técnica anterior no se ha identificado la presencia de dichas secuencias en muestras de heces humanas ni se ha sugerido un método de diagnóstico de cáncer colorrectal a partir de una muestra de heces humanas basándose en la determinación mediante PCR cuantitativa de la concentración de estas secuencias,
35 usando los cebadores definidos en las reivindicaciones de la presente solicitud.

En la presente solicitud, una secuencia problema tiene una identidad del 95% con respecto a una secuencia determinada si el 95% de los residuos de la secuencia problema son idénticos a los residuos de la secuencia determinada.
40

En la presente solicitud, se obtiene la razón de concentraciones de las secuencias SEQ ID NO: 10/SEQ ID NO: 4 dividiendo la concentración de la secuencia identificada mediante SEQ ID NO: 10 entre la concentración de la secuencia identificada mediante SEQ ID NO: 4. La razón también podría obtenerse dividiendo el valor de Ct de la secuencia identificada mediante SEQ ID NO: 10 entre el valor de Ct de la secuencia identificada mediante SEQ ID
45 NO: 4. El significado de Ct se explica en el ejemplo 3.

El resto de las razones indicadas en las reivindicaciones se calcularán en consecuencia.

50 El método de la invención es una potente herramienta para prevenir el cáncer colorrectal a través de un diagnóstico de la enfermedad en un estadio temprano.

Otra realización es el método de la invención, en el que dichos cebadores con una identidad de al menos el 90% con respecto a SEQ ID NO: 5-6 son cebadores con una identidad de al menos el 95% con respecto a SEQ ID NO: 5-6, dichos cebadores con una identidad de al menos el 90% con respecto a SEQ ID NO: 8-9 son cebadores con una
55 identidad de al menos el 95% con respecto a SEQ ID NO: 8-9 y dichos cebadores con una identidad de al menos el 90% con respecto a SEQ ID NO: 11-12 son cebadores con una identidad de al menos el 95% con respecto a SEQ ID NO: 11-12. Particularmente, dichos cebadores con una identidad de al menos el 95% con respecto a SEQ ID NO: 5-6 son los cebadores identificados mediante SEQ ID NO: 5-6, dichos cebadores con una identidad de al menos el 95% con respecto a SEQ ID NO: 8-9 son los cebadores identificados mediante SEQ ID NO: 8-9 y dichos cebadores con una identidad de al menos el 95% con respecto a SEQ ID NO: 11-12 son los cebadores identificados mediante
60 SEQ ID NO: 11-12.

Otra realización es el método de la invención, en el que se diagnostica cáncer colorrectal en la etapa (c) si la concentración de SEQ ID NO: 4 está por encima del valor de Ct de punto de corte de 16,56, o si la concentración de SEQ ID NO: 7 está por encima del valor de Ct de punto de corte de 22,97, o si la concentración de SEQ ID NO: 10 está por encima del valor de Ct de punto de corte de 19,24, o si el valor de la razón SEQ ID NO: 10/SEQ ID NO: 4
65

está por debajo del valor de punto de corte de 1,16, o si el valor de la razón SEQ ID NO: 7/SEQ ID NO: 4 está por debajo del valor de punto de corte de 1,40.

5 Un objetivo de la presente invención es proporcionar una herramienta de diagnóstico preliminar. La presente invención proporciona un método para diagnosticar cáncer colorrectal antes de tener manifestaciones clínicas y para distinguir la población de alto riesgo.

10 Por tanto, otra realización preferida de la presente invención es un método para diagnosticar el riesgo de desarrollar cáncer colorrectal a partir de una muestra de heces humanas, que comprende:

15 (a) determinar mediante PCR cuantitativa en dicha muestra de heces humanas la concentración de al menos una secuencia bacteriana de ADNr 16S seleccionada del grupo que consiste en SEQ ID NO: 7 y SEQ ID NO: 10, en el que se determina la concentración de SEQ ID NO: 7 usando cebadores con una identidad de al menos el 90% con respecto a SEQ ID NO: 8-9 y se determina la concentración de SEQ ID NO: 10 usando cebadores con una identidad de al menos el 90% con respecto a SEQ ID NO: 11-12,

20 (b) opcionalmente, determinar al menos una de las razones de concentraciones seleccionadas del grupo que consiste en SEQ ID NO: 10/SEQ ID NO: 4, y SEQ ID NO: 7/SEQ ID NO: 4; en el que se determina la concentración de SEQ ID NO: 4 mediante PCR cuantitativa en dicha muestra de heces humanas usando cebadores con una identidad de al menos el 90% con respecto a SEQ ID NO: 5-6; y

25 (c) diagnosticar cáncer colorrectal a partir de la concentración de al menos una de las secuencias de la etapa (a) y/o el valor de al menos una razón obtenida en la etapa (b); en el que se diagnostica un riesgo aumentado de desarrollar cáncer colorrectal en la etapa c) si hay un aumento del valor de Ct de al menos una de las secuencias de la etapa (a) y/o una disminución del valor de al menos una razón obtenida en la etapa (b) con respecto a un valor de punto de corte, y con ello, el método para diagnosticar el riesgo de desarrollar cáncer colorrectal de la invención.

30 Otra realización es el método para diagnosticar el riesgo de desarrollar cáncer colorrectal, en el que se diagnostica un riesgo de desarrollar cáncer colorrectal en la etapa (c) si la concentración de SEQ ID NO: 7 está por encima del valor de Ct de punto de corte de 24,76, o si la concentración de SEQ ID NO: 10 está por encima del valor de Ct de punto de corte de 21,42, o si el valor de la razón SEQ ID NO: 10/SEQ ID NO: 4 está por debajo del valor de punto de corte de 1,56, o si el valor de la razón SEQ ID NO: 7/SEQ ID NO: 4 está por debajo del valor de punto de corte de 1,78.

35 También se describe en el presente documento un cebador para PCR identificado mediante cualquiera de las secuencias seleccionadas del grupo que consiste en SEQ ID NO: 5-6, SEQ ID NO: 8-9 y SEQ ID NO: 11-12.

40 Otra realización de la presente invención se refiere al uso de un kit en un método para diagnosticar cáncer colorrectal a partir de una muestra de heces humanas según la presente invención, que comprende al menos un par de cebadores para PCR seleccionados del par de cebadores del grupo que consiste en SEQ ID NO: 5-6, SEQ ID NO: 8-9 y SEQ ID NO: 11-12.

Breve descripción de las figuras

45 Figura 1. Razón de valores de Ct para 2 secuencias: SEQ ID NO: 10/SEQ ID NO: 4. CRC representa los valores obtenidos de muestras de heces de pacientes con cáncer colorectal, y C representa los valores de control obtenidos de pacientes sanos.

50 Figura 2. Razón de valores de Ct para 2 secuencias: SEQ ID NO: 7/SEQ ID NO: 4. CRC representa los valores obtenidos de muestras de heces de pacientes con cáncer colorectal, y C representa los valores de control obtenidos de pacientes sanos.

55 Figura 3. Razón de valores de Ct para 2 secuencias: SEQ ID NO: 4/SEQ ID NO: 1. CRC representa los valores obtenidos de muestras de heces de pacientes con cáncer colorectal, y C representa los valores de control obtenidos de pacientes sanos.

60 Figura 4. Valores absolutos de Ct para la secuencia SEQ ID NO: 4. CRC representa los valores obtenidos de muestras de heces de pacientes con cáncer colorectal, y C representa los valores de control obtenidos de pacientes sanos.

Figura 5. Valores absolutos de Ct para la secuencia SEQ ID NO: 7. CRC representa los valores obtenidos de muestras de heces de pacientes con cáncer colorectal, y C representa los valores de control obtenidos de pacientes sanos.

65 Figura 6. Razón valores de Ct para 2 secuencias: SEQ ID NO: 4/ SEQ ID NO: 1. CRC representa los valores obtenidos de muestras de heces de pacientes con cáncer colorrectal, Alto riesgo representa valores obtenidos de

individuos con síndrome de Lynch que tenían pólipos en su última colonoscopia y tienen un riesgo aumentado de desarrollar cáncer colorrectal, Bajo riesgo representa valores obtenidos de individuos con síndrome de Lynch que no tenían pólipos en su última colonoscopia.

5 Figura 7. Valores absolutos de Ct para la secuencia SEQ ID NO: 4. CRC representa los valores obtenidos de muestras de heces de pacientes con cáncer colorrectal, Alto riesgo representa valores obtenidos de individuos con síndrome de Lynch que tenían pólipos en su última colonoscopia y tienen un riesgo aumentado de desarrollar cáncer colorrectal, Bajo riesgo representa valores obtenidos de individuos con síndrome de Lynch que no tenían pólipos en su última colonoscopia.

10

Ejemplos de la invención

Ejemplo 1: Muestras de pacientes e identificación de marcadores bacterianos.

15 En el ejemplo 3, se han analizado un total de 16 muestras de heces en 7 controles y 9 pacientes con cáncer colorrectal.

En el ejemplo 4, se analizaron un total de 8 individuos con síndrome de Lynch (con riesgo genético aumentado de desarrollar cáncer colorrectal).

20

A todos los individuos se les había realizado una colonoscopia, en el periodo máximo de un año, antes de la obtención de muestras fecales. Según el examen endoscópico, 4 de ellos habían tenido un pólipo maligno (nombrados como de Alto riesgo) y 4 no tenían ningún pólipo (nombrados como de Bajo riesgo).

25 Se han identificado los siguientes marcadores bacterianos en dichas muestras humanas:

- secuencia bacteriana de ADNr 16S SEQ ID NO: 1 (B3)
- secuencia bacteriana de ADNr 16S SEQ ID NO: 4 (B10)
- secuencia bacteriana de ADNr 16S SEQ ID NO: 7 (B46)
- secuencia bacteriana de ADNr 16S SEQ ID NO: 10 (B48)

30

35 Ejemplo 2. Diseño de cebadores

Los cebadores de la presente divulgación (SEQ ID NO: 2-3, SEQ ID NO: 5-6, SEQ ID NO: 8-9 y SEQ ID NO: 11-12) se han diseñado a partir del análisis comparativo con secuencias obtenidas previamente de grupos filogenéticos usando las herramientas bioinformáticas: ClustalX, Netprimer y PrimerExpress. Se han diseñado dichos cebadores para la cuantificación de los marcadores bacterianos citados en el ejemplo 1 mediante PCR cuantitativa.

40

El sistema de detección elegido fue SybrGreen® o similar. Se descartaron los conjuntos de cebadores con menos de 3 posiciones diferentes con respecto a grupos cercanos. También se descartaron los conjuntos de cebadores con valores de T_f en curvas de disociación diferentes de los esperados.

45

Ejemplo 3: Métodos de PCR cuantitativa y resultados en pacientes con cáncer colorrectal

La cuantificación de cada uno de los marcadores bacterianos citados en el ejemplo 1 en las muestras de heces analizadas se expresa en valores de Ct. El Ct (umbral de ciclos) se define como el número de ciclos de q-PCR requeridos para que la señal de fluorescencia sobrepase el umbral. Los niveles de Ct son inversamente proporcionales a la cantidad de ácido nucleico diana en la muestra (es decir, cuanto menor es el nivel de Ct, mayor es la cantidad de ácido nucleico diana en la muestra). Los ensayos en tiempo real de WVDL se someten a 40 ciclos de amplificación.

50

55 Se muestran, a continuación, los resultados obtenidos, en las tablas 1 y 2. La tabla 1 representa valores absolutos de Ct y la tabla 2 representa razones de Ct.

Tabla 1. Valores absolutos de Ct

ID	Grupo	Condición	B48	B46	B10	B3
F10	CRC	1	18,59	22,78	16,33	33,64
F11	CRC	1	20,33	26,45	20,37	41,57
F3	CRC	1	23,52	26,2	19,8	38,45
F4	CRC	1	16,41	20,87	14,88	
F5	CRC	1	19,04	24	17,61	35,68

ES 2 661 684 T3

F6	CRC	1	23,22	27,67	21,82	
F16	CRC	1		20,75	14,35	
F7	CRC	1	23,19	28,2	22,34	
F8	CRC	1	18,82	22,04	15,61	
F12	C	0	17,55	20,9	14,95	
F13	C	0	19,36	24,78	19,22	
F14	C	0	19,46	21,44	15,07	37,34
F15	C	0	17,55	19,85	12,84	36,98
F9	C	0	17,61	21,8	15,41	35,66
F1	C	0	18,09	21,97	14,79	38,3
F2	C	0	17,07	20,57	12,76	
Media	CRC		20,39	24,329	18,12	37,34
	C		18,099	21,616	15,01	37,07
Desviación estándar	CRC		2,65	2,89	3,04	3,44
	C		0,94	1,58	2,15	1,09
Valor de p	CRC vs. C		0,025	0,021	0,019	0,444
Punto medio (valores de punto de corte)			19,244	22,972	16,56	37,2
% de sensibilidad			66,67	83,33	83,33	50
% de especificidad			55,56	60	60	50
Exactitud			60	68,75	68,75	50

Tabla 2. Razones de Ct

ID	Grupo	Condición	B48/B10	B10/B3	B46/B10	B46/B48	B46/B3	B48/B3
F10	CRC	1	1,14	0,49	1,39	1,23	0,68	0,55
F11	CRC	1	1	0,49	1,3	1,3	0,64	0,49
F3	CRC	1	1,19	0,51	1,32	1,11	0,68	0,61
F4	CRC	1	1,1		1,4	1,27		
F5	CRC	1	1,08	0,49	1,36	1,26	0,67	0,53
F6	CRC	1	1,06		1,27	1,19		
F16	CRC	1			1,45			
F7	CRC	1	1,04		1,26	1,22		
F8	CRC	1	1,21		1,41	1,17		
F12	C	0	1,17		1,4	1,19		
F13	C	0	1,01		1,29	1,28		
F14	C	0	1,29	0,4	1,42	1,1	0,57	0,52
F15	C	0	1,37	0,35	1,55	1,13	0,54	0,47
F9	C	0	1,14	0,43	1,41	1,24	0,61	0,49
F1	C	0	1,22	0,39	1,49	1,21	0,57	0,47
F2	C	0	1,34		1,61	1,21		
Media	CRC		1,1	0,5	1,35	1,22	0,67	0,55
	C		1,22	0,39	1,45	1,19	0,57	0,49
Desviación estándar	CRC		0,07	0,01	0,07	0,06	0,02	0,05
	C		0,13	0,04	0,11	0,06	0,03	0,02
Valor de p	CRC vs. C		0,02	0,001	0,018	0,224	0,001	0,045
Punto medio (valores de punto de corte)			1,16123	0,4441	1,40243	1,20669	0,62	0,52
% de sensibilidad			75	100	77,78	55,56	100,00	75,00
% de especificidad			71,43	100	71,43	42,86	100,00	75,00
Exactitud			73,33	100	75	50	100,00	75,00

5 La sensibilidad y especificidad del diagnóstico de cáncer colorrectal son del 75 y el 71% para la razón SEQ ID NO: 10/SEQ ID NO: 4; del 77% y el 71%, respectivamente, para la razón SEQ ID NO: 7/SEQ ID NO: 4; del 100% y el 100%, respectivamente, para la razón SEQ ID NO: 4/SEQ ID NO: 1; del 100% y el 100%, respectivamente, para la razón SEQ ID NO: 7/ SEQ ID NO: 1; y del 75% y el 75%, respectivamente, para la razón SEQ ID NO: 10/ SEQ ID NO: 1.

10 Las figuras 1, 2 y 3 son representaciones gráficas de razones de valores de Ct (SEQ ID NO: 10/SEQ ID NO: 4, SEQ ID NO: 7/SEQ ID NO: 4 y SEQ ID NO: 4/SEQ ID NO: 1).

15 Las figuras 4 y 5 son representaciones gráficas de los valores absolutos de Ct (SEQ ID NO: 4, SEQ ID NO: 7).

Ejemplo 4. Riesgo de cáncer colorrectal antes de presentar manifestaciones clínicas. Métodos de PCR cuantitativa y

resultados en pacientes con síndrome de Lynch

Se determinó la cuantificación de cada uno de los marcadores bacterianos citados en el ejemplo 1 en las muestras de heces humanas analizadas usando los cebadores descritos en el ejemplo 2 y se cuantificó en valores de Ct.

5 Se muestran a continuación los resultados obtenidos, en las tablas 3 y 4. La tabla 3 representa valores absolutos de Ct y la tabla 4 representa razones de Ct.

10 Tabla 3. Valores absolutos de Ct

ID	Grupo	Condición	B48	B46	B10	B3
F10	CRC	1	18,59	22,78	16,33	33,64
F11	CRC	1	20,33	26,45	20,37	41,57
F3	CRC	1	23,52	26,20	19,80	38,45
F4	CRC	1	16,41	20,87	14,88	
F5	CRC	1	19,04	24,00	17,61	35,68
F6	CRC	1	23,22	27,67	21,82	
F16	CRC	1		20,75	14,35	
F7	CRC	1	23,19	28,20	22,34	
F8	CRC	1	18,82	22,04	15,61	
MIL1	Alto riesgo	2	22,58	25,87	14,56	35,56
MIL2	Alto riesgo	2	24,53	25,79	14,73	37,06
MIL5	Alto riesgo	2	22,56	24,57	14,16	38,44
MIL4	Alto riesgo	2	20,00	29,90	18,41	37,99
MIL6	Bajo riesgo	3	20,15	24,90	15,20	37,58
MIL3	Bajo riesgo	3	18,11	20,45	10,34	31,16
MIL7	Bajo riesgo	3	22,81	24,70	13,35	41,40
MIL8	Bajo riesgo	3	20,60	21,88	11,38	32,42
Media	CRC		20,39	24,33	18,12	37,34
	Alto riesgo		22,42	26,53	15,46	37,26
	Bajo riesgo		20,42	22,98	12,57	35,64
Desviación estándar	CRC		2,65	2,89	3,04	3,44
	Alto riesgo		1,86	2,32	1,98	1,27
	Bajo riesgo		1,93	2,18	2,15	4,74
Valor de p	CRC vs. Alto riesgo		0,10	0,10	0,070	0,48
	CRC vs. Bajo riesgo		0,49	0,21	0,004	0,29
	Alto riesgo vs. Bajo riesgo		0,09	0,03	0,047	0,27
Punto medio (valores de punto de corte)			21,42	24,76	14,02	36,45
% de sensibilidad			75,00	75,00	80,00	60,00
% de especificidad			75,00	75,00	100,00	66,67
Exactitud			75,00	75,00	87,50	62,50

Tabla 4. Razones de Ct

ID	Grupo	Condición	B48/B10	B10/B3	B46/B10	B46/B48	B46/B3	B48/B3
F10	CRC	1	1,14	0,49	1,39	1,23	0,68	0,55
F11	CRC	1	1,00	0,49	1,30	1,30	0,64	0,49
F3	CRC	1	1,19	0,51	1,32	1,11	0,68	0,61
F4	CRC	1	1,10		1,4	1,27		
F5	CRC	1	1,08	0,49	1,36	1,26	0,67	0,53
F6	CRC	1	1,06		1,27	1,19		
F16	CRC	1			1,45			
F7	CRC	1	1,04		1,26	1,22		
F8	CRC	1	1,21		1,41	1,17		
MIL1	Alto riesgo	2	1,55	0,41	1,78	1,15	0,73	0,63
MIL2	Alto riesgo	2	1,67	0,40	1,75	1,05	0,70	0,66
MIL5	Alto riesgo	2	1,59	0,37	1,74	1,09	0,64	0,59
MIL4	Alto riesgo	2	1,09	0,48	1,62	1,49	0,79	0,53
MIL6	Bajo riesgo	3	1,33	0,40	1,64	1,24	0,66	0,54
MIL3	Bajo riesgo	3	1,75	0,33	1,98	1,13	0,66	0,58

MIL7	Bajo riesgo	3	1,71	0,32	1,85	1,08	0,60	0,55
MIL8	Bajo riesgo	3	1,81	0,35	1,92	1,06	0,67	0,64
Media	CRC		1,10	0,50	1,35	1,22	0,67	0,55
	Alto riesgo		1,47	0,41	1,72	1,20	0,71	0,60
	Bajo riesgo		1,65	0,35	1,85	1,13	0,65	0,58
Desviación estándar	CRC		0,07	0,01	0,07	0,06	0,02	0,05
	Alto riesgo		0,26	0,05	0,07	0,20	0,06	0,06
	Bajo riesgo		0,22	0,04	0,15	0,08	0,03	0,04
Valor de p	CRC vs. Alto riesgo	0,001491	0,009755	0,000001	0,38	0,11	0,10	
	CRC vs. Bajo riesgo	0,000029	0,000159	0,000002	0,02	0,19	0,21	
	Alto riesgo vs. Bajo riesgo	0,172991	0,044382	0,087799	0,28	0,06	0,25	
Punto medio (valores de punto de corte)			1,56	0,38	1,78	1,16	0,68	0,59
% de sensibilidad			66,67	75,00	80,00	50,00	75,00	75,00
% de especificidad			60,00	75,00	100,00	50,00	75,00	75,00
Exactitud			62,50	75,00	87,50	50,00	75,00	75,00

5 Los marcadores de razones microbiológicas pudieron distinguir el grupo de individuos con alto riesgo de desarrollar cáncer colorrectal (pacientes con síndrome de Lynch y pólipos). La sensibilidad y especificidad en la detección de la población con alto riesgo de desarrollar cáncer colorrectal fueron del 80% y el 100% para la SEQ ID NO: 4; del 75% y el 75%, respectivamente, para la razón SEQ ID NO: 4/SEQ ID NO: 1; del 80% y el 100%, respectivamente, para la razón SEQ ID NO: 7/SEQ ID NO: 4; del 75% y el 75%, respectivamente, para la razón SEQ ID NO: 7/SEQ ID NO: 1; y del 75% y el 75% para la razón SEQ ID NO: 10/SEQ ID NO: 1.

10 La figura 6 es una representación gráfica de la razón de valores de Ct (SEQ ID NO: 4/SEQ ID NO: 1) y la figura 7 es una representación gráfica de los valores absolutos de Ct (SEQ ID NO: 4).

Lista de secuencias

15 <110> Institut d'Investigació Biomèdica de Girona Dr. Josep Trueta (IDIBGI)
Universitat de Girona (UdG)

<120> MÉTODO PARA DIAGNOSTICAR CÁNCER COLORRECTAL A PARTIR DE UNA MUESTRA DE HECES HUMANAS MEDIANTE PCR CUANTITATIVA, CEBADORES Y KIT

20 <160> 12

<170> BiSSAP 1.2

25 <210> 1
<211> 489
<212> ADN
<213> Secuencia artificial

30 <220>
<221> fuente
<222> 1..489
<223> /tipo_mol="ADN sin asignar" /nota="Secuencia de ADN ribosómico 16S B3, secuencia parcial (número de acceso GQ411111.1)" /organismo="Secuencia artificial"

35 <400> 1

ES 2 661 684 T3

acggaggcct tcgggtcgta accgctttca gcaggggaaga gtcaagactg tacctgcaga 60
 agaagccccg gctaactacg tgccagcagc cgcggtaata cgtagggggc gagcgttatc 120
 cggattcatt gggcgtaaag cgcgcgtagg cggcccggca ggccgggggt cgaagcgggg 180
 ggctcaaccc cccgaagccc ccggaacctc cgcggcttgg gtccggtagg ggaggggtgga 240
 acaccgggtg tagcgggtgga atgcgcagat atcgggtgga acaccgggtg cgaaggcggc 300
 cctctggggc gagaccgacg ctgaggcgcg aaagctgggg gagcgaacag gattagatac 360
 cctggtagtc ccagccgtaa acgatggacg ctaggtgtgg ggggacgata cccccgtgcc 420
 gcagccaacg cattaagcgt cccgcctggg gagtacggcc gcaaggctaa aactcaaagg 480
 aattgacgg 489

5 <210> 2
 <211> 19
 <212> ADN
 <213> Secuencia artificial

10 <220>
 <221> fuente
 <222> 1..19
 <223> /tipo_mol="ADN sin asignar" /nota="Cebador directo de secuencia de ADN ribosómico 16S B3"
 /organismo="Secuencia artificial"

15 <400> 2
 ggaggccttc ggtcgtaa 19

20 <210> 3
 <211> 18
 <212> ADN
 <213> Secuencia artificial

25 <220>
 <221> fuente
 <222> 1..18
 <223> /tipo_mol="ADN sin asignar" /nota="Cebador inverso de secuencia de ADN ribosómico 16S B3"
 /organismo="Secuencia artificial"

30 <400> 3
 ccgaagcccc cgaacct 18

35 <210> 4
 <211> 485
 <212> ADN
 <213> Secuencia artificial

40 <220>
 <221> fuente
 <222> 1..485
 <223> /tipo_mol="ADN sin asignar" /nota="Secuencia de ADN ribosómico 16S B10, secuencia parcial (número de
 acceso GQ411118.1)" /organismo="Secuencia artificial"

<400> 4

ES 2 661 684 T3

cttcggattg taaactcctg ttgttgagga gataatgacg gtactcaaca aggtaagtga 60
 cggctaacta cgtgccagca gccgcggtaa aacgtaggtc acaagcgttg tccggaatta 120
 ctgggtgtaa agggagcgcg gccgggaaga caagttggaa gtgaaatcca tgggctcaac 180
 ccatgaactg ctttcaaac tgtttttctt gagtagtgca caggtaggcg gaattcccgg 240
 tgtagcggtg gaatgcgtag atatcgggag gaacaccagt ggcgaaggcg gcctactggg 300
 caccaactga cgctgaggct cgaaagtgtg ggtagcaaac aggattagat accctggtag 360
 tccacactgt aaacgatgat tactaggtgt tggaggattg accccttcag tgccgcagtt 420
 aacacaataa gtaatccacc tggggagtac gaccgcaagg ttgaaactca aaggaattga 480
 cggac 485

5 <210> 5
 <211> 19
 <212> ADN
 <213> Secuencia artificial

10 <220>
 <221> fuente
 <222> 1..19
 <223> /tipo_mol="ADN sin asignar" /nota="Cebador directo de secuencia de ADN ribosómico 16SB10"
 /organismo="Secuencia artificial"

15 <400> 5
 caacaaggta agtgacggc 19

20 <210> 6
 <211> 20
 <212> ADN
 <213> Secuencia artificial

25 <220>
 <221> fuente
 <222> 1..20
 <223> /tipo_mol="ADN sin asignar" /nota="Cebador inverso de secuencia de ADN ribosómico 16S B10"
 /organismo="Secuencia artificial"

30 <400> 6
 cgcctacctg tgcactactc 20

35 <210> 7
 <211> 474
 <212> ADN
 <213> Secuencia artificial

40 <220>
 <221> fuente
 <222> 1..474
 <223> /tipo_mol="ADN sin asignar" /nota="Secuencia de ADN ribosómico 16S B46, secuencia parcial (número de
 acceso GQ411150.1)" /organismo="Secuencia artificial"

<400> 7

ES 2 661 684 T3

gtaacatttc tgtaacaaga catacagcag tttctcagag ttcccaaact caaaggaatt 60
gacggaagcc gcggttccac gtaagtcaca agcggtgtcc ggaattactg ggtgtaaagg 120
gagcgcagcc gggaagacaa gttggaagtg aatccatgg gctcaacca taaactgott 180
tcctaactgt ttttcttgag tagtgcacag gtaggcggaa ttcccgggtg agcgggtggaa 240
tgcctagata tcgggaggaa caccattggc gaaggcggcc tactggactg caactgacgc 300
tgaggctcga aagtgtgggt agcaaacagg attagatacc ctggtagtcc actccgtaaa 360
ccatgattac tacgtgttgg aggattgacc ctttctgtgc cgcagataac acaataagta 420
atccacctgg ggagtacgac cgcccgggtg agactcacag gaattgacgg actc 474

5 <210> 8
<211> 19
<212> ADN
<213> Secuencia artificial

10 <220>
<221> fuente
<222> 1..19
<223> /tipo_mol="ADN sin asignar" /nota="Cebador directo de secuencia de ADN ribosómico 16S B46"
/organismo="Secuencia artificial"

15 <400> 8
tccacgtaag tcacaagcg 19

20 <210> 9
<211> 20
<212> ADN
<213> Secuencia artificial

25 <220>
<221> fuente
<222> 1..20
<223> /tipo_mol="ADN sin asignar" /nota="Cebador inverso de secuencia de ADN ribosómico 16S B46"
/organismo="Secuencia artificial"

30 <400> 9
cgctacctg tgcactact 20

35 <210> 10
<211> 566
<212> ADN
<213> Secuencia artificial

40 <220>
<221> fuente
<222> 1..566
<223> /tipo_mol="ADN sin asignar" /nota="Secuencia de ADN ribosómico 16S B48, secuencia parcial (número de
acceso GQ411152.1)" /organismo="Secuencia artificial"

<400> 10

ES 2 661 684 T3

tctcttacgg ggagcagcag tggggaatat tgcacaatgg gggaaaccct gatgcagcga 60
 cgccgcgtga gcgatgaagt atttcgggat gtaaagctct atcagcaggg aagaaaatga 120
 cggtagctga ctaagaagcc ccggctaaat acgtgccagc agccgcggta atacgtatgg 180
 tgcaagcgtt atccggattt actgggtgta aagggagcgt agacggagtg gcaagtctga 240
 tgtgaaaacc cggggctcaa ccccgggact gcattggaaa ctgtgcatct agagtgtcgg 300
 agaggtaagc ggaattccta gtgtagcggg gaaatgcgta gatattagga ggaacaccag 360
 tggcgaaggc ggcttactgg acgataactg acgctgaggc tcgaaagcgt ggggagcaaa 420
 caggattaga taccctggta gtccacgccg taaacgatga ctactaggtg tcggggagca 480
 cagctcttcg gtgccgcagc aaacgcaata agtattccac ctggggagta cgttcgcaag 540
 aatgaaactc acagaatttg acggag 566

5 <210> 11
 <211> 18
 <212> ADN
 <213> Secuencia artificial

10 <220>
 <221> fuente
 <222> 1..18
 <223> /tipo_mol="ADN sin asignar" /nota="Cebador directo de secuencia de ADN ribosómico 16S B48"
 /organismo="Secuencia artificial"

15 <400> 11
 gtacggggag cagcagtg 18

20 <210> 12
 <211> 23
 <212> ADN
 <213> Secuencia artificial

25 <220>
 <221> fuente
 <222> 1..23
 <223> /tipo_mol="ADN sin asignar" /nota="Cebador inverso de secuencia de ADN ribosómico 16S B48"
 /organismo="Secuencia artificial"

30 <400> 12
 gacactctag atgcacagtt tcc 23

REIVINDICACIONES

1. Método para diagnosticar el riesgo de desarrollar cáncer colorrectal a partir de una muestra de heces humanas, que comprende:
- 5 (a) determinar mediante PCR cuantitativa en dicha muestra de heces humanas la concentración de al menos una secuencia bacteriana de ADNr 16S seleccionada del grupo que consiste en SEQ ID NO: 7 y SEQ ID NO: 10,
- 10 en el que se determina la concentración de SEQ ID NO: 7 usando cebadores con una identidad de al menos el 90% con respecto a SEQ ID NO: 8-9, y se determina la concentración de SEQ ID NO: 10 usando cebadores con una identidad de al menos el 90% con respecto a SEQ ID NO: 11-12;
- 15 (b) opcionalmente, determinar al menos una de las razones de concentraciones seleccionadas del grupo que consiste en SEQ ID NO: 10/SEQ ID NO: 4, y SEQ ID NO: 7/SEQ ID NO: 4,
- 20 en el que se determina la concentración de SEQ ID NO: 4 mediante PCR cuantitativa en dicha muestra de heces humanas usando cebadores con una identidad de al menos el 90% con respecto a SEQ ID NO: 5-6; y
- 25 (c) diagnosticar el riesgo de desarrollar cáncer colorrectal a partir de la concentración de al menos una de las secuencias de la etapa (a) y/o el valor de al menos una razón obtenida en la etapa (b);
- en el que se diagnostica un riesgo aumentado de desarrollar cáncer colorrectal en la etapa c) si hay un aumento del valor de Ct de al menos una de las secuencias de la etapa (a) y/o una disminución del valor de al menos una razón obtenida en la etapa (b) con respecto a un valor de punto de corte.
2. Método para diagnosticar cáncer colorrectal a partir de una muestra de heces humanas, que comprende:
- 30 (a) determinar mediante PCR cuantitativa en dicha muestra de heces humanas la concentración de al menos una secuencia bacteriana de ADNr 16S seleccionada del grupo que consiste en SEQ ID NO: 4, SEQ ID NO: 7 y SEQ ID NO: 10, en el que se determina la concentración de SEQ ID NO: 4 usando cebadores con una identidad de al menos el 90% con respecto a SEQ ID NO: 5-6, se determina la concentración de SEQ ID NO: 7 usando cebadores con una identidad de al menos el 90% con respecto a SEQ ID NO: 8-9, y se determina la concentración de SEQ ID NO: 10 usando cebadores con una identidad de al menos el 90% con respecto a SEQ ID NO: 11-12;
- 35 (b) opcionalmente, determinar al menos una de las razones de concentraciones seleccionadas del grupo que consiste en SEQ ID NO: 10/SEQ ID NO: 4, y SEQ ID NO: 7/SEQ ID NO: 4; y
- 40 (c) diagnosticar cáncer colorrectal a partir de la concentración de al menos una de las secuencias de la etapa (a) y/o el valor de al menos una razón obtenida en la etapa (b);
- 45 en el que se diagnostica cáncer colorrectal en la etapa c) si hay un aumento del valor de Ct de al menos una de las secuencias de la etapa (a) y/o una disminución del valor de al menos una razón obtenida en la etapa (b) con respecto a un valor de punto de corte.
3. El método según cualquiera de las reivindicaciones 1 o 2, caracterizado por que dichos cebadores con una identidad de al menos el 90% con respecto a SEQ ID NO: 5-6 son cebadores con una identidad de al menos el 95% con respecto a SEQ ID NO: 5-6, dichos cebadores con una identidad de al menos el 90% con respecto a SEQ ID NO: 8-9 son cebadores con una identidad de al menos el 95% con respecto a SEQ ID NO: 8-9, y dichos cebadores con una identidad de al menos el 90% con respecto a SEQ ID NO: 11-12 son cebadores con una identidad de al menos el 95% con respecto a SEQ ID NO: 11-12.
- 50
- 55 4. El método según la reivindicación 3, caracterizado por que dichos cebadores con una identidad de al menos el 95% con respecto a SEQ ID NO: 5-6 son los cebadores identificados mediante SEQ ID NO: 5-6, dichos cebadores con una identidad de al menos el 95% con respecto a SEQ ID NO: 8-9 son los cebadores identificados mediante SEQ ID NO: 8-9, y dichos cebadores con una identidad de al menos el 95% con respecto a SEQ ID NO: 11-12 son los cebadores identificados mediante SEQ ID NO: 11-12.
- 60
5. Uso de un kit en un método para diagnosticar cáncer colorrectal a partir de una muestra de heces humanas según la reivindicación 2, en el que dicho kit está caracterizado por que comprende al menos un par de cebadores para PCR seleccionados del grupo que consiste en SEQ ID NO: 5-6, SEQ ID NO: 8-9 y SEQ ID NO: 11-12.
- 65
6. Uso de la concentración determinada mediante PCR cuantitativa en una muestra de heces humanas de al

5 menos una secuencia bacteriana de ADNr 16S seleccionada del grupo que consiste en SEQ ID NO: 7 y SEQ ID NO: 10, y/o el valor de al menos una razón de concentraciones determinada mediante PCR cuantitativa en dicha muestra de heces humanas seleccionada del grupo que consiste en SEQ ID NO: 10/SEQ ID NO: 4, y SEQ ID NO: 7/SEQ ID NO: 4, como marcador bacteriano del riesgo de desarrollar cáncer colorrectal,

10 en el que se determina la concentración de SEQ ID NO: 4 usando cebadores con una identidad de al menos el 90% con respecto a SEQ ID NO: 5-6, en el que se determina la concentración de SEQ ID NO: 7 usando cebadores con una identidad de al menos el 90% con respecto a SEQ ID NO: 8-9, y se determina la concentración de SEQ ID NO: 10 usando cebadores con una identidad de al menos el 90% con respecto a SEQ ID NO: 11-12; y

15 en el que se diagnostica un riesgo aumentado de desarrollar cáncer colorrectal si hay un aumento del valor de Ct de al menos una de las secuencias de la etapa (a) y/o una disminución del valor de al menos una razón obtenida en la etapa (b) con respecto a un valor de punto de corte.

7. 20 Uso de la concentración determinada mediante PCR cuantitativa en una muestra de heces humanas de al menos una secuencia bacteriana de ADNr 16S seleccionada de SEQ ID NO:4, SEQ ID NO:7 y SEQ ID NO:10, y/o el valor de al menos una razón de concentraciones determinada mediante PCR cuantitativa en una muestra de heces humanas seleccionada del grupo que consiste en SEQ ID NO: 10/SEQ ID NO: 4, y SEQ ID NO: 7/SEQ ID NO: 4, como marcador bacteriano de cáncer colorrectal,

25 en el que se determina la concentración de SEQ ID NO: 4 usando cebadores con una identidad de al menos el 90% con respecto a SEQ ID NO: 5-6, se determina la concentración de SEQ ID NO: 7 usando cebadores con una identidad de al menos el 90% con respecto a SEQ ID NO: 8-9, y se determina la concentración de SEQ ID NO: 10 usando cebadores con una identidad de al menos el 90% con respecto a SEQ ID NO: 11-12;

30 en el que se diagnostica cáncer colorrectal si hay un aumento del valor de Ct de al menos una de las secuencias de la etapa (a) y/o una disminución del valor de al menos una razón obtenida en la etapa (b) con respecto a un valor de punto de corte.

8. 35 El uso según cualquiera de las reivindicaciones 6 o 7, caracterizado por que dichos cebadores con una identidad de al menos el 90% con respecto a SEQ ID NO: 5-6 son cebadores con una identidad de al menos el 95% con respecto a SEQ ID NO: 5-6, dichos cebadores con una identidad de al menos el 90% con respecto a SEQ ID NO: 8-9 son cebadores con una identidad de al menos el 95% con respecto a SEQ ID NO: 8-9, y dichos cebadores con una identidad de al menos el 90% con respecto a SEQ ID NO: 11-12 son cebadores con una identidad de al menos el 95% con respecto a SEQ ID NO: 11-12.

9. 40 El uso según la reivindicación 8, caracterizado por que dichos cebadores con una identidad de al menos el 95% con respecto a SEQ ID NO: 5-6 son los cebadores identificados mediante SEQ ID NO: 5-6, dichos cebadores con una identidad de al menos el 95% con respecto a SEQ ID NO: 8-9 son los cebadores identificados mediante SEQ ID NO: 8-9, y dichos cebadores con una identidad de al menos el 95% con respecto a SEQ ID NO: 11-12 son los cebadores identificados mediante SEQ ID NO: 11-12.

45

B48/B10

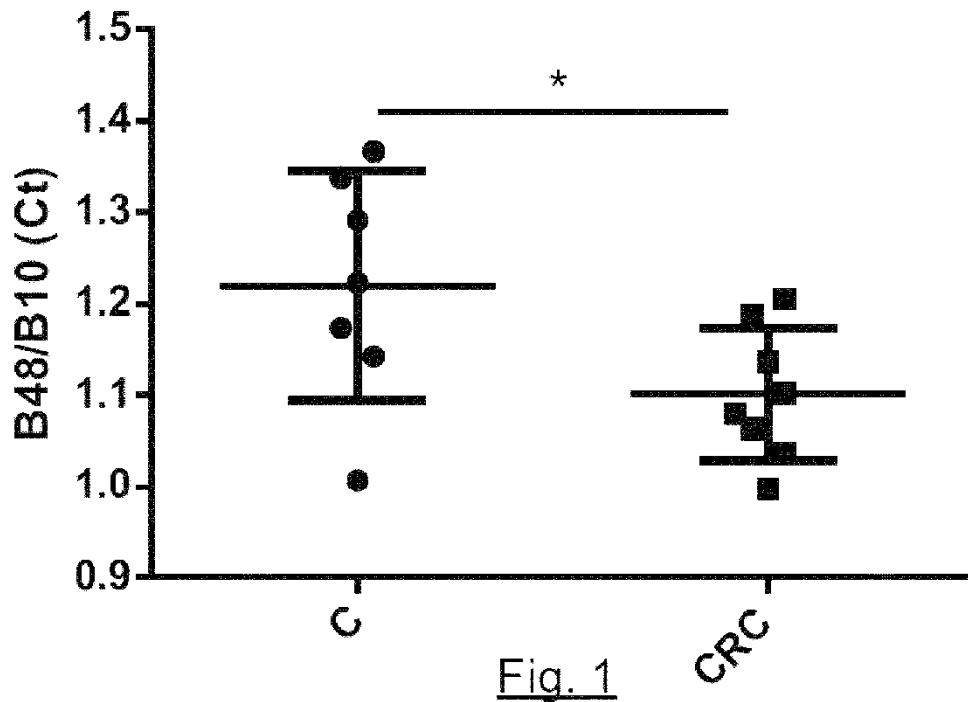


Fig. 1

B46/B10

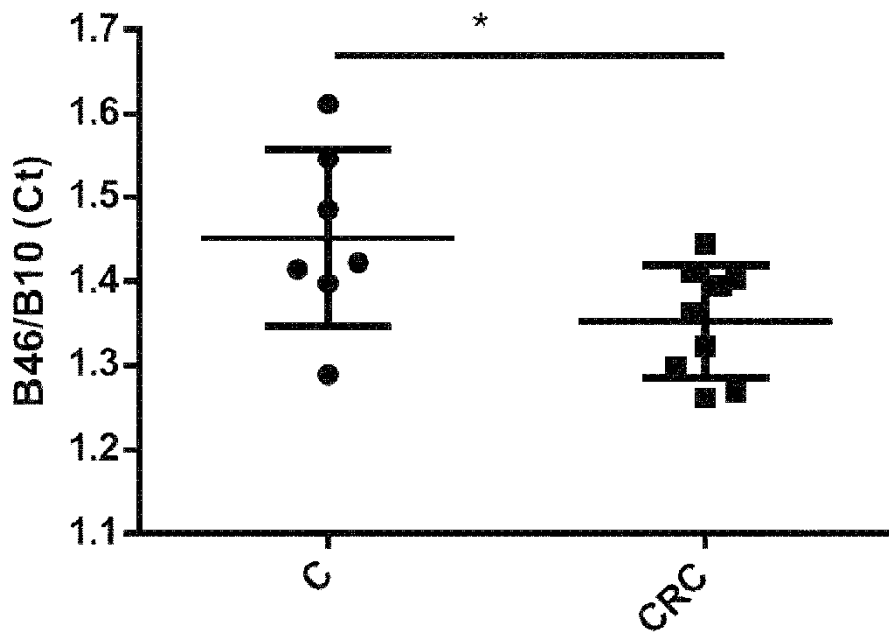


Fig. 2

B10/B3

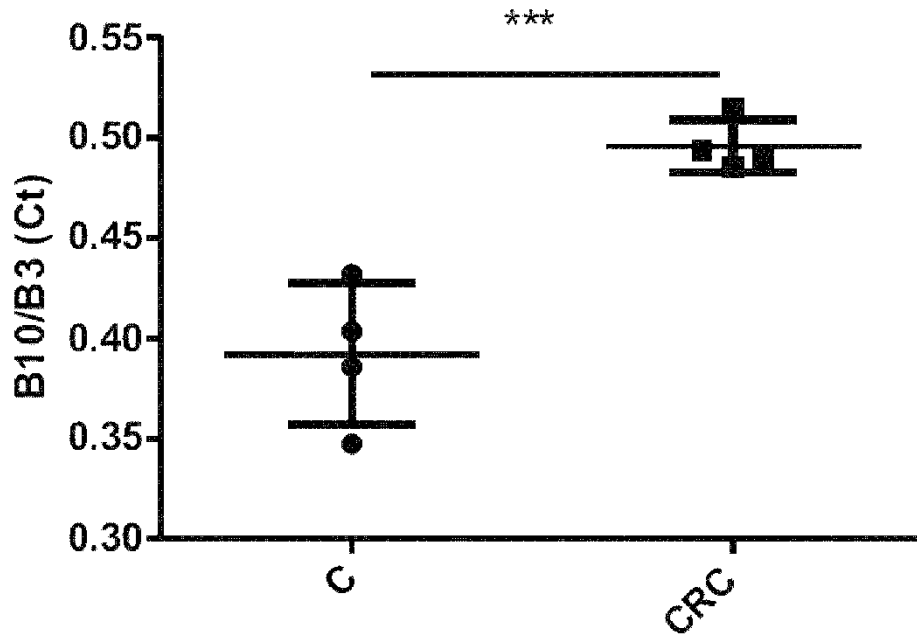


Fig. 3

B10

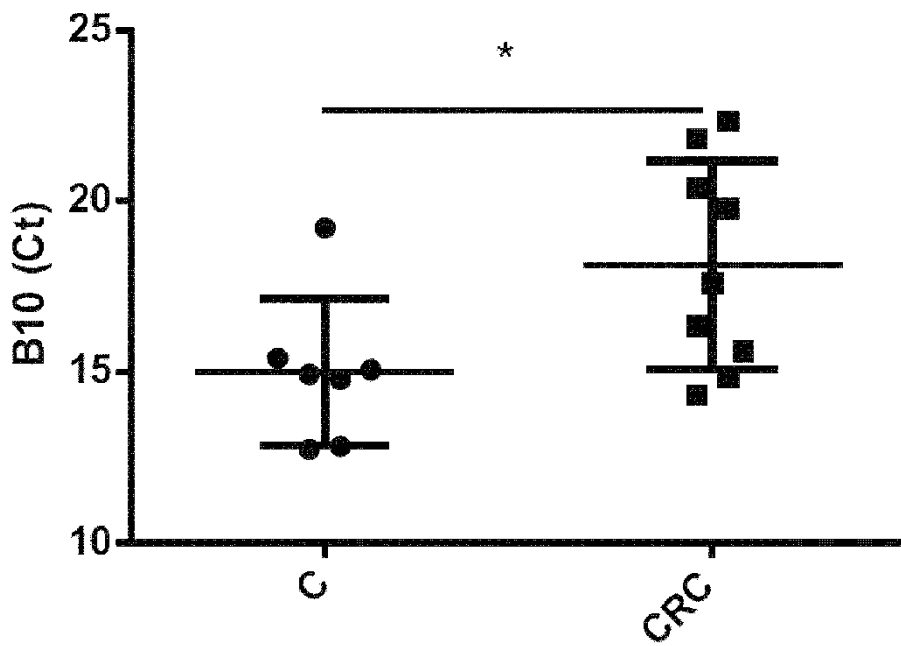
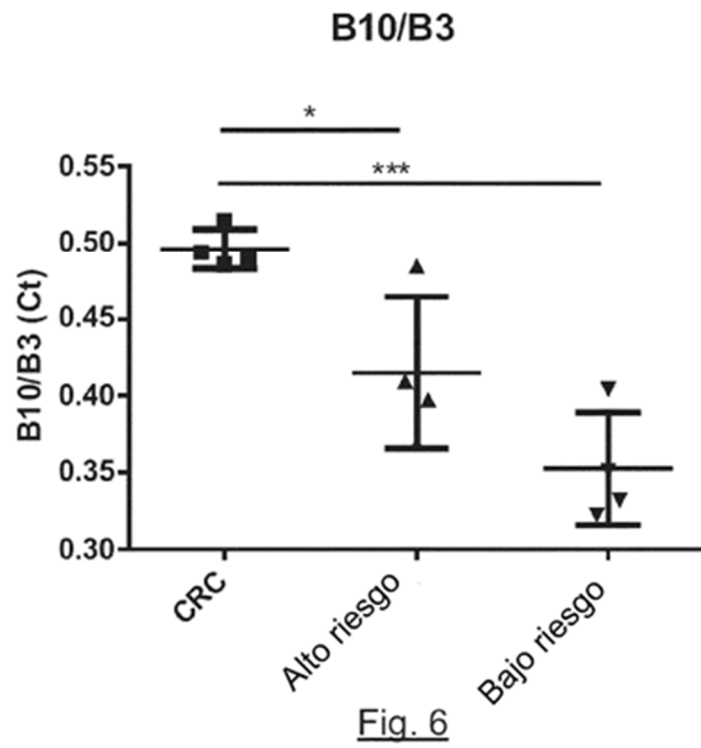
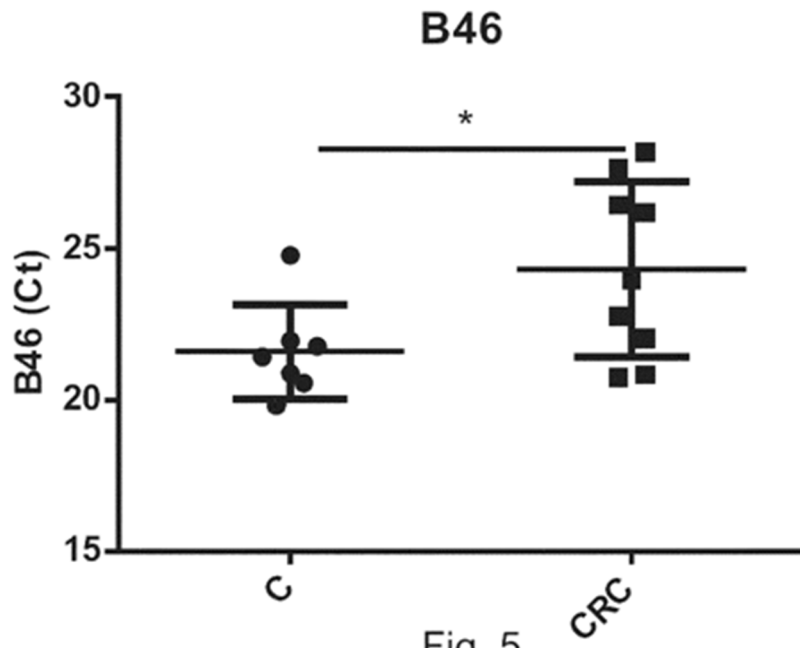


Fig. 4



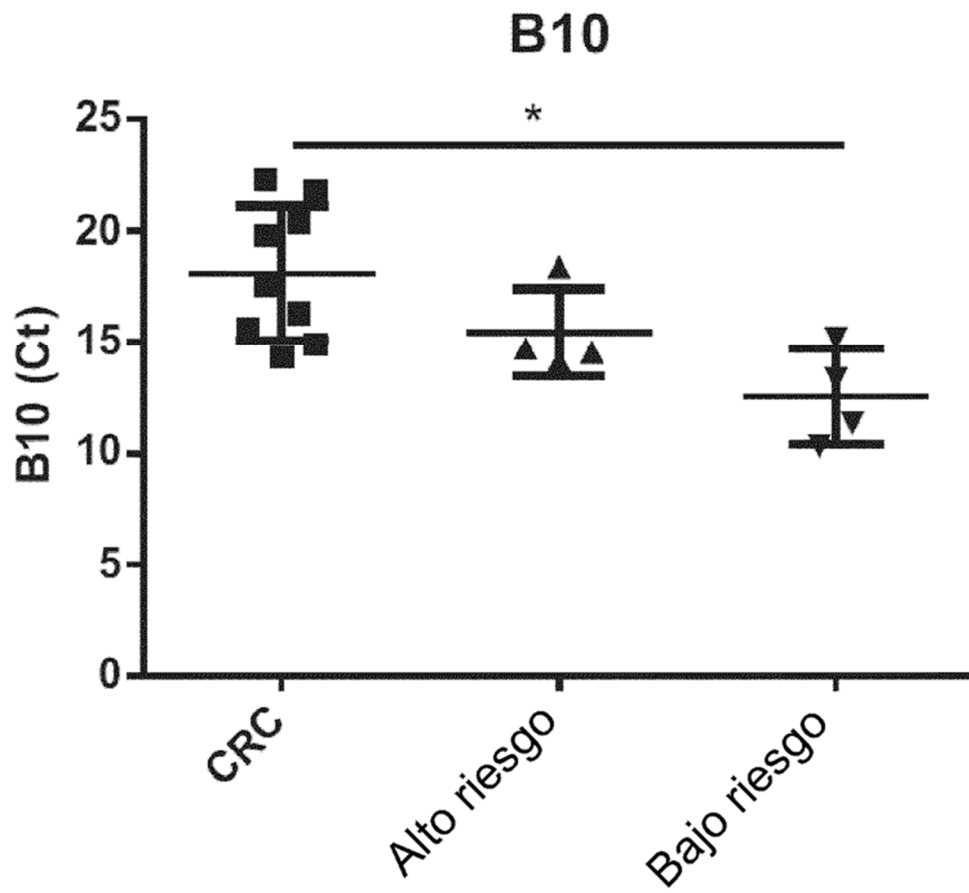


Fig. 7