

19



OFICINA ESPAÑOLA DE
PATENTES Y MARCAS

ESPAÑA



11 Número de publicación: **2 961 916**

51 Int. Cl.:

G01N 33/574 (2006.01)

12

TRADUCCIÓN DE PATENTE EUROPEA

T3

86 Fecha de presentación y número de la solicitud internacional: **23.05.2019 PCT/GB2019/051421**

87 Fecha y número de publicación internacional: **28.11.2019 WO19224542**

96 Fecha de presentación y número de la solicitud europea: **23.05.2019 E 19727472 (3)**

97 Fecha y número de publicación de la concesión europea: **16.08.2023 EP 3797295**

54 Título: **Isopropanol como biomarcador del cáncer colorrectal**

30 Prioridad:

23.05.2018 GB 201808476

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

14.03.2024

73 Titular/es:

**THE UNIVERSITY OF LIVERPOOL (50.0%)
Foundation Building 765 Brownlow Hill
Liverpool, Merseyside L69 7ZX, GB y
UNIVERSITY HOSPITALS BRISTOL NHS
FOUNDATION TRUST (50.0%)**

72 Inventor/es:

**PROBERT, CHRIS;
BOND, ASHLEY y
GREENWOOD, ROSEMARY**

74 Agente/Representante:

SÁEZ MAESO, Ana

ES 2 961 916 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

Isopropanol como biomarcador del cáncer colorrectal

Introducción

5 La presente invención se refiere a ciertos compuestos orgánicos volátiles que pueden usarse como biomarcadores para el cáncer colorrectal. Más específicamente, la presente invención se refiere a un método para determinar la probabilidad de que un individuo tenga cáncer colorrectal detectando la presencia y cantidad de ciertos compuestos orgánicos volátiles en una muestra de heces recogida del individuo en cuestión.

Antecedentes de la invención

10 El cáncer colorrectal es una de las principales causas de mortalidad y morbilidad en todo el mundo, con una incidencia europea estimada de 43.5 por 100,000 en 2012 y una mortalidad de 19.5 por 100,000.^[4] El riesgo de por vida, para los residentes del Reino Unido, es de 1 entre 15 para los hombres o 1 entre 19 para las mujeres.^[5] En toda Europa, el cáncer colorrectal es la segunda causa más común de mortalidad relacionada con el cáncer.^[4] El cáncer colorrectal supone una importante carga financiera para el National Health Service (NHS), con un coste anual medio de £12,000 y £8,800 por cada paciente diagnosticado con cáncer de colon rectal y no rectal, respectivamente.^[6] Los datos del Programa de Detección del Cáncer de Intestino del Reino Unido (UK BCSP) han demostrado claramente que la detección del cáncer colorrectal en una etapa más temprana y la identificación de adenomas premalignos avanzados pueden reducir la mortalidad y morbilidad futuras asociadas al cáncer.^[7,8]

20 El UK BCSP usa una herramienta de cribado basada en heces para seleccionar pacientes que se someterán a una colonoscopia, de acuerdo con las directrices europeas.^[9] Actualmente, en Inglaterra se emplea la prueba de sangre oculta en heces a base de guayaco (gFOBT). Esta prueba se basa en el sangrado de lesiones neoplásicas y puede usarse para identificar personas con una pérdida de sangre >10 ml al día. gFOBT es propenso a dar resultados falsos positivos después de la ingestión de ciertos alimentos.^[10] La baja sensibilidad de gFOBT ha generado críticas sobre su uso para el cribado poblacional.^[11] Es probable que la gFOBT sea reemplazada por FOBT inmunológica que puede proporcionar resultados tanto cualitativos como cuantitativos. Un estudio observacional reciente, realizado en Italia, demostró una reducción de la mortalidad relacionada con el CCR en las regiones donde se adoptó el cribado con este nuevo enfoque en comparación con las regiones donde aún no se había implementado el cribado.^[12,13] En 2010, un meta análisis informó una sensibilidad (67 %) y especificidad (85 %) para FOBT inmunológico en comparación con 54 % y 80 % para gFOBT, para la detección de cáncer colorrectal y neoplasia premaligna.^[14]

30 Varios estudios han sugerido que los compuestos orgánicos volátiles (VOC) emitidos por diferentes sustratos pueden usarse como biomarcadores del cáncer colorrectal. Uno de esos estudios usó espectrometría de masas con tubos de flujo de iones seleccionados (SIFT-MS) para detectar VOC en las heces.^[15] Otro analizó la orina de pacientes con cáncer colorrectal, empleando un espectrómetro de movilidad iónica asimétrica de campo (FAIMS).^[16] Un tercer aliento usado se analizó mediante cromatografía de gases con desorción térmica y espectrometría de masas en un intento de diagnosticar el cáncer colorrectal.^[17,18] Sin embargo, ninguno de estos estudios identificó compuestos orgánicos volátiles específicos que pudieran detectarse, cuantificarse y usarse como biomarcadores específicos del cáncer colorrectal. En cambio, estos estudios fueron predominantemente pruebas de concepto o estudios de viabilidad que informaron únicamente sobre patrones de producción y tendencias generales.

Por lo tanto, sigue existiendo la necesidad de métodos nuevos y mejorados para determinar la probabilidad de que un individuo tenga cáncer colorrectal que sean preferiblemente rápidos y no invasivos.

40 La presente invención se ideó teniendo en cuenta lo anterior.

Sumario de la invención

La presente invención reside en el reconocimiento de que ciertos compuestos orgánicos volátiles (VOC) presentes en las heces de un individuo pueden usarse como biomarcadores para el cáncer colorrectal (es decir, cáncer de colon y/o recto).

45 Las heces de un individuo contienen numerosas moléculas volátiles, que son subproductos de diversas vías metabólicas del cuerpo. La medición controlada de estos compuestos excretados ha identificado biomarcadores de VOC particulares que están asociados con el cáncer colorrectal. Estos biomarcadores proporcionan nuevos biomarcadores específicos de fenotipo.

50 Por lo tanto, la presente invención proporciona una metodología para determinar la probabilidad de que un individuo tenga cáncer colorrectal detectando y cuantificando las cantidades de ciertos compuestos orgánicos volátiles que están presentes en una muestra de heces excretadas y usando estos compuestos como biomarcadores para el cáncer colorrectal.

De este modo, en un aspecto, la presente invención proporciona un método para determinar la probabilidad de que un individuo tenga cáncer colorrectal, comprendiendo el método las etapas de:

i) analizar una muestra de heces recogida de dicho individuo para detectar si el compuesto orgánico volátil isopropanol está presente;

ii) si hay isopropanol presente en la etapa i), determinar la cantidad de isopropanol que está presente y comparar la cantidad detectada con un valor de control;

5 en el que la presencia de una mayor cantidad de isopropanol en la muestra de heces en comparación con el valor de control es indicativa de una mayor probabilidad de que el individuo tenga cáncer colorrectal.

También se divulga, pero no se reivindica, un método para determinar la probabilidad de que un individuo tenga cáncer colorrectal analizando una o más muestras de heces recolectadas del individuo para determinar la cantidad de isopropanol que está presente y comparando la cantidad detectada con un valor de control.

10 En otro aspecto, la presente invención proporciona el uso de isopropanol en una muestra de heces como biomarcador para el cáncer colorrectal.

En otro aspecto más, la presente invención proporciona un uso de isopropanol y uno o más compuestos orgánicos volátiles adicionales en una muestra de heces como biomarcadores para el cáncer colorrectal, en el que el uno o más compuestos orgánicos volátiles adicionales se seleccionan de:

15 i) 2-hexanona;

ii) Ácido butanoico, 3-metil, etil éster;

iii) Ácido butanoico, éster 1-metiletilico;

iv) Ácido pentanoico, éster 1-metiletilico;

v) p-Xileno;

20 vi) Ácido propanoico, éster 1-metiletilico; o

vii) Dimentol.

Se apreciará que los métodos de la presente invención se llevan a cabo fuera del cuerpo humano o animal y, en cambio, se realizan en una muestra de heces que se recoge del individuo en cuestión. De acuerdo con lo anterior, la metodología de la presente invención proporciona un medio no invasivo para determinar la probabilidad de que un individuo tenga cáncer colorrectal.

25

Descripción detallada de la invención

Definiciones

30 A lo largo de la descripción y las reivindicaciones de esta memoria descriptiva, las palabras "comprenden" y "contienen" y sus variaciones significan "incluido, pero no limitado a", y no pretenden (ni excluyen) excluir otras unidades estructurales, aditivos, componentes, números enteros o etapas. A lo largo de la descripción y las reivindicaciones de esta memoria descriptiva, el singular abarca el plural a menos que el contexto requiera lo contrario. En particular, cuando se usa el artículo indefinido, se debe entender que la memoria descriptiva contempla tanto la pluralidad como la singularidad, a menos que el contexto requiera lo contrario.

35 Se debe entender que los rasgos, números enteros, características, compuestos, unidades estructurales químicas o grupos descritos junto con un aspecto, realización o ejemplo particular de la invención son aplicables a cualquier otro aspecto, realización o ejemplo descrito en este documento a menos que sea incompatible con el mismo. Todos los rasgos divulgados en esta memoria descriptiva (incluidas las reivindicaciones, el resumen y los dibujos adjuntos), y/o todas las etapas de cualquier método o procedimiento así divulgado, pueden combinarse en cualquier combinación, excepto combinaciones en las que al menos algunas de dichos rasgos y/o etapas son mutuamente excluyentes. La invención no se limita a los detalles de ninguna de las realizaciones anteriores. La invención se extiende a cualquier novedad, o cualquier combinación novedosa, de los rasgos divulgados en esta memoria descriptiva (incluidos las reivindicaciones, resúmenes y dibujos adjuntos), o a cualquier novedad, o cualquier combinación novedosa, de los etapas de cualquier método o procedimiento así divulgado.

40

45 Se entenderá que el término "cáncer colorrectal" usado en este documento se refiere al cáncer asociado con cualquier parte del colon y/o recto.

El término "muestra de heces" usado en este documento se refiere a una muestra de materia fecal obtenida de un individuo.

Se entenderá que el término "compuesto orgánico volátil" o "VOC" usado en este documento se refiere a un compuesto orgánico que tiene una alta presión de vapor (volatilidad) a temperatura y presión ambiente. Los compuestos orgánicos

volátiles por lo general tienen un punto de ebullición menor que o igual a 250 °C cuando se miden a una presión atmosférica estándar de 101.3 kPa (1 atmósfera).

Se entenderá que el término "valor de control" usado en este documento se refiere a la cantidad promedio o normalizada (por ejemplo, concentración) de un compuesto orgánico volátil determinado que está presente en una muestra de heces tomada de un grupo de control. A este respecto, se entenderá que la etapa ii) de la presente invención implica determinar la cantidad relativa de isopropanol que está presente en una muestra de heces de un individuo en comparación con la cantidad promedio o normalizada de isopropanol detectada en la muestra de heces del grupo de control. También se entenderá que en ciertos casos, la cantidad promedio o normalizada (por ejemplo, concentración) de un compuesto orgánico volátil determinado (por ejemplo, isopropanol) que está presente en una muestra de heces tomada de un grupo de control puede ser cero (es decir, es posible que no hay isopropanol presente en la muestra de heces tomada de un grupo de control). En tales situaciones, se apreciará que, por lo tanto, el presente método únicamente comprenderá la etapa i) (es decir, detectar la presencia o ausencia del compuesto orgánico volátil isopropanol en la muestra de heces del individuo).

Adicionalmente, el "grupo de control" comprende una cohorte de individuos que no padecen cáncer colorrectal. De manera adecuada, el "grupo de control" está formado por una cohorte de pacientes que han mostrado uno o más síntomas colorrectales (es decir, síntomas comúnmente asociados con, o posiblemente asociados con, una enfermedad colorrectal, incluyendo, pero sin limitarse a, cáncer) pero, después de una colonoscopia, una colonografía por CT, una colonografía por MRI y/o un enema de bario se determinó posteriormente que estaban libres de cáncer. Por ejemplo, la terminología tal como "comparar la cantidad de isopropanol presente en la etapa i) con un valor de control" usado en este documento, se entenderá fácilmente como una referencia a la comparación entre la cantidad relativa de isopropanol presente en la etapa i) del método definido en este documento, y una cantidad promedio o normalizada (por ejemplo, concentración) de isopropanol que está presente en una muestra de heces tomada del grupo de control. Por supuesto, el tamaño y la demografía del grupo de control pueden variar. En la sección de ejemplos siguiente se proporcionan detalles adicionales de grupos de control específicos que pueden usarse.

Los nombres químicos asignados a los compuestos químicos (VOC) en este documento son nombres que serán reconocidos por los expertos en la técnica. Se aprecia que existen convenciones alternativas para nombrar compuestos químicos, pero una persona experta en la técnica apreciará, por ejemplo, que "ácido butanoico, 3-metil, etil éster" es un compuesto que podría denominarse alternativamente como "3-metilbutanoato de etilo", "3-metilbutirato de etilo" o "éster etílico del ácido 3-metilbutanoico". De manera similar, el etanol también puede denominarse, por ejemplo, alcohol etílico. La presente memoria descriptiva debe interpretarse teniendo esto en cuenta.

Métodos de la presente invención.

Como se define anteriormente en este documento, según un aspecto de la presente invención se proporciona un método para determinar la probabilidad de que un individuo tenga cáncer colorrectal, comprendiendo el método las etapas de:

i) analizar una muestra de heces recogida de dicho individuo para detectar si el compuesto orgánico volátil isopropanol está presente;

ii) si hay isopropanol presente en la etapa i), determinar la cantidad de isopropanol que está presente y comparar la cantidad con un valor de control;

en el que la presencia de una mayor cantidad de isopropanol en las heces en comparación con el valor de control es indicativa de una mayor probabilidad de que el individuo tenga cáncer colorrectal.

Un aumento en la cantidad de isopropanol presente en relación con un valor de control (obtenido de una cohorte de individuos libres de cáncer) indica una mayor probabilidad de que el individuo tenga cáncer colorrectal y, por lo tanto, se justifica una evaluación diagnóstica adicional, por ejemplo, mediante la realización de una colonoscopia. De manera adecuada, el aumento en la cantidad de isopropanol en relación con el valor de control es un aumento estadísticamente significativo (por ejemplo, con un valor p de la prueba t de Student de <0.01, <0.001 o <0.0001).

Se apreciará que la muestra de heces se puede analizar usando cualquier técnica convencional conocida en la técnica que sea capaz de detectar la presencia de compuestos específicos dentro de una muestra (por ejemplo, cromatografía).

En una realización, se usa espectrometría de masas por cromatografía de gases (GC-MS) o cromatografía líquida para analizar y detectar la cantidad de compuesto(s) orgánico(s) volátil(es) en la muestra de heces. De manera adecuada, se usa espectrometría de masas por cromatografía de gases (GC-MS) para analizar y detectar la cantidad de compuesto(s) orgánico(s) volátil(es) en la muestra de heces.

En otra realización, la cantidad de compuesto(s) orgánico(s) volátil(es) en la muestra de heces del individuo se prueba y detecta usando una prueba basada en anticuerpos. Ejemplos no limitantes de pruebas basadas en anticuerpos adecuadas incluyen ensayos inmunoabsorbentes ligados a enzimas (ELISA) o ensayos con tira reactiva.

- 5 En una realización particular de la presente invención, la etapa i) del método comprende además analizar la muestra de heces recolectada de dicho individuo para detectar la presencia de uno o más compuestos orgánicos volátiles adicionales y, si uno o más compuestos orgánicos volátiles adicionales están presentes, la etapa ii) comprende además determinar la cantidad de el uno o más compuestos orgánicos volátiles adicionales y comparar la cantidad con uno o más valores de control para cada uno del uno o más compuestos orgánicos volátiles adicionales; en el que un aumento o disminución en el nivel de dicho uno o más compuestos orgánicos volátiles adicionales con respecto al valor de control es indicativo de la probabilidad de que el individuo tenga cáncer colorrectal.
- 10 En otra realización particular de la presente invención, la etapa i) comprende además analizar la muestra de heces recolectada de dicho individuo para detectar la presencia de dos o más compuestos orgánicos volátiles adicionales y, si dos o más compuestos orgánicos volátiles adicionales están presentes, la etapa ii) comprende además determinar la cantidad de los dos o más compuestos orgánicos volátiles adicionales y comparar la cantidad con dos o más valores de control para cada uno de los dos o más compuestos orgánicos volátiles adicionales; en el que un aumento o disminución en el nivel de dichos dos o más compuestos orgánicos volátiles adicionales con respecto al valor de control es indicativo de la probabilidad de que el individuo tenga cáncer colorrectal.
- 15 Se apreciará que el uno o más compuestos orgánicos volátiles adicionales pueden ser cualquier compuesto orgánico apropiado que tenga una alta presión de vapor (volatilidad) a temperatura y presión ambiente.
- 20 En una realización, el uno o más compuestos orgánicos volátiles adicionales son compuestos orgánicos con un peso molecular menor que o igual a 500 Da. De manera adecuada, el uno o más compuestos orgánicos volátiles adicionales son compuestos orgánicos con un peso molecular menor que o igual a 300 Da. Más adecuadamente, uno o más compuestos orgánicos volátiles adicionales son compuestos orgánicos con un peso molecular menor que o igual a 250 Da. Aún más adecuadamente, el uno o más compuestos orgánicos volátiles adicionales son compuestos orgánicos con un peso molecular menor que o igual a 200 Da. Lo más adecuado, el uno o más compuestos orgánicos volátiles adicionales son compuestos orgánicos con un peso molecular menor que o igual a 150 Da.
- 25 En otra realización, el uno o más compuestos orgánicos volátiles adicionales son compuestos orgánicos con un punto de ebullición menor que o igual a 250 °C a una presión de 1 atmósfera. Más adecuadamente, el uno o más compuestos orgánicos volátiles adicionales son compuestos orgánicos con un punto de ebullición menor que o igual a 200 °C a una presión de 1 atmósfera. Más adecuadamente, el uno o más compuestos orgánicos volátiles adicionales son compuestos orgánicos con un punto de ebullición menor que o igual a 175 °C a una presión de 1 atmósfera. Lo más adecuado, el uno o más compuestos orgánicos volátiles adicionales son compuestos orgánicos con un punto de ebullición menor que o igual a 150 °C a una presión de 1 atmósfera.
- 30 Se entenderá que en los casos en los que dos o más compuestos orgánicos volátiles estén presentes en la muestra de heces del individuo, los dos o más compuestos orgánicos volátiles pueden formar un azeótropo. De este modo, se entenderá que los puntos de ebullición descritos en el párrafo [0031] anterior también cubren los puntos de ebullición de mezclas azeotrópicas de dos o más compuestos orgánicos volátiles.
- 35 En otra realización, uno o más compuestos orgánicos volátiles adicionales se seleccionan de:
- i) 2-hexanona;
 - ii) Ácido butanoico, 3-metil, etil éster;
 - iii) Ácido butanoico, éster 1-metiletílico;
 - iv) Ácido pentanoico, éster 1-metiletílico;
 - 40 v) p-Xileno;
 - vi) Ácido propanoico, éster 1-metiletílico; o
 - vii) Dimentol.
- De manera adecuada, el uno o más compuestos orgánicos volátiles adicionales se seleccionan de:
- i) 2-hexanona;
 - 45 ii) Ácido butanoico, 3-metil, etil éster;
 - iii) Ácido butanoico, éster 1-metiletílico;
 - iv) Ácido pentanoico, éster 1-metiletílico;
 - v) p-Xileno; o
 - vi) Ácido propanoico, éster 1-metiletílico.

Más adecuadamente, el uno o más compuestos orgánicos volátiles adicionales se seleccionan de:

- i) 2-hexanona;
 - ii) Ácido butanoico, 3-metil, etil éster;
 - iii) Ácido butanoico, éster 1-metiletilico; o
- 5 iv) Ácido pentanoico, éster 1-metiletilico.

Más adecuadamente, uno o más compuestos orgánicos volátiles adicionales se seleccionan de:

- i) 2-hexanona; o
- ii) Ácido butanoico, 3-metil, etil éster.

10 En otra realización particular de la presente invención, la etapa i) comprende analizar la muestra de heces recolectada de dicho individuo para detectar la presencia del compuesto orgánico volátil isopropanol y todos los compuestos orgánicos volátiles adicionales enumerados en uno cualquiera de los párrafos [0027] a [0030] y [0033] a [0036] anteriores y, si todos los compuestos orgánicos volátiles están presentes, la etapa ii) comprende además determinar la cantidad de todos los compuestos orgánicos volátiles adicionales y comparar la cantidad con valores de control para cada uno de los compuestos orgánicos volátiles; en el que un aumento o disminución en el nivel de los compuestos orgánicos volátiles adicionales con respecto al valor de control es indicativo de la probabilidad de que el individuo tenga cáncer colorrectal.

15 En otra realización, el individuo tiene uno o más síntomas asociados con el cáncer colorrectal. Los síntomas comúnmente asociados con el cáncer colorrectal serán evidentes para el experto en la técnica. Una lista no limitativa de síntomas comúnmente asociados con el cáncer colorrectal incluye sangrado rectal, diarrea, estreñimiento, calambres abdominales, dolor abdominal, fatiga y/o pérdida de peso.

20 En otra realización más, el individuo tiene un factor de riesgo predeterminado asociado con el cáncer colorrectal.

Se entenderá que el término "factor de riesgo predeterminado" usado en este documento se refiere a cualquier atributo y/o característica que posee un individuo antes del método de la presente invención que puede aumentar su probabilidad de desarrollar cáncer colorrectal.

25 En una realización, el factor de riesgo predeterminado asociado con el cáncer colorrectal se determina basándose en uno o más de los siguientes:

- i) una prueba de sangre oculta en heces (FOBT) positiva;
 - ii) la presencia de pólipos colorrectales;
 - iii) anemia por deficiencia de hierro;
- 30 iv) una condición que requiere imágenes radiológicas del intestino;
- v) hábitos intestinales anormales del individuo (por ejemplo, estreñimiento y/o diarrea);
 - vi) antecedentes familiares de pólipos colorrectales; o
 - vii) la presencia de un síndrome de poliposis.

35 En una realización, el factor de riesgo predeterminado asociado con el cáncer colorrectal se determina basándose en una prueba de sangre oculta en heces (FOBT) positiva.

Se entenderá que el método de la presente invención abarca de manera adecuada métodos para determinar la probabilidad de que un individuo tenga cualquier forma y/o mutación de cáncer colorrectal. De este modo, se apreciará que la presente invención abarca métodos para determinar la probabilidad de que un individuo tenga uno o más de los siguientes tipos de cáncer (tumores):

- 40 – adenocarcinomas colorrectales;
- tumores carcinoides;
- linfomas colorrectales;
- tumores del estroma gastrointestinal (GIST);
- leiomiomas; o

– y melanomas colorrectales.

En una realización, la presente invención proporciona un método para determinar la probabilidad de que un individuo tenga uno o más adenocarcinomas colorrectales, tumores carcinoides y/o tumores del estroma gastrointestinal (GIST), como se define anteriormente en este documento.

5 En otra realización, la presente invención proporciona un método para determinar la probabilidad de que un individuo tenga uno o más adenocarcinomas colorrectales, como se define anteriormente en este documento.

Grupo de control

10 Se entenderá que el tamaño y la demografía del grupo de control usado para obtener los valores de control usados en el método de la presente invención pueden variar. Preferiblemente, el grupo de control es lo más grande y diverso posible y comprende un número aproximadamente igual de participantes masculinos y femeninos. Sin embargo, la demografía y el origen étnico del grupo de control pueden variar según factores, como la ubicación (región) en la que se implementará el método.

15 En una realización, el grupo de control comprende más de o igual a 30 pacientes que han mostrado uno o más síntomas colorrectales pero, después de una colonoscopia, una colonografía por CT, una colonografía por MRI y/o un enema de bario, se determinó posteriormente que estaban libres de cáncer. De manera adecuada, el grupo de control comprende más de o igual a 40 pacientes que han mostrado uno o más síntomas colorrectales pero, después de una colonoscopia, una colonografía por CT, una colonografía por MRI y/o un enema de bario, se determinó posteriormente que estaban libres de cáncer. Más adecuadamente, el grupo de control comprende más de o igual a 50 pacientes que han mostrado uno o más síntomas colorrectales pero, después de una colonoscopia, una colonografía por CT, una colonografía por MRI y/o un enema de bario, se determinó posteriormente que estaban libres de cáncer. Más adecuadamente, el grupo de control comprende más de o igual a 60 pacientes que han mostrado uno o más síntomas colorrectales pero, después de una colonoscopia, una colonografía por CT, una colonografía por MRI y/o un enema de bario, se determinó posteriormente que estaban libres de cáncer. Más adecuadamente, el grupo de control comprende más de o igual a 100 pacientes que han mostrado uno o más síntomas colorrectales pero, después de una colonoscopia, una colonografía por CT, una colonografía por MRI y/o un enema de bario, se determinó posteriormente que estaban libres de cáncer.

25 En otra realización, el grupo de control comprende entre 25 % y 75 % de participantes masculinos. De manera adecuada, el grupo de control comprende entre un 35 % y un 65 % de participantes masculinos. Más adecuadamente, el grupo de control comprende entre un 40 % y un 60 % de participantes masculinos. Lo más adecuado es que el grupo de control comprende entre un 40 % y un 55 % de participantes masculinos.

30 En otra realización, el grupo de control comprende entre 25 % y 75 % de participantes femeninas. De manera adecuada, el grupo de control comprende entre un 35 % y un 65 % de participantes femeninas. Más adecuadamente, el grupo de control comprende entre un 40 % y un 60 % de participantes femeninas. Lo más adecuado es que el grupo de control comprende entre un 40 % y un 55 % de mujeres.

35 Se apreciará que la edad promedio del grupo de control puede variar; sin embargo, dado que el cáncer colorrectal es más prevalente en individuos mayores de 50 años, la media de la edad promedio del grupo de control de la presente invención es de manera adecuada más de o igual a 50 (por ejemplo, más de o igual a 55).

Realizaciones particulares

En una realización particular, el método de la presente invención comprende las etapas de:

40 i) analizar una muestra de heces recogida de dicho individuo para detectar si los compuestos orgánicos volátiles, isopropanol y ácido butanoico, 3-metil, etil éster, están presentes; y

ii) si están presentes isopropanol y ácido butanoico, 3-metil, etil éster, determinar la cantidad de isopropanol y ácido butanoico, 3-metil, etil éster presentes y comparar estas cantidades con valores de control para cada compuesto orgánico volátil respectivo;

45 en el que una mayor cantidad de isopropanol y ácido butanoico, 3-metil, etil éster en comparación con sus respectivos valores de control es indicativa de una mayor probabilidad de que el individuo tenga cáncer colorrectal.

En otra realización particular, el método de la presente invención comprende las etapas de:

50 i) analizar una muestra de heces recogida de dicho individuo para detectar si están presentes los compuestos orgánicos volátiles, isopropanol, ácido butanoico, 3-metil, etil éster, y uno o más compuestos orgánicos volátiles adicionales; y

ii) si están presentes isopropanol, ácido butanoico, 3-metil, etil éster, uno o más compuestos orgánicos volátiles adicionales, determinar la cantidad de isopropanol, ácido butanoico, 3-metil, etil éster y uno o más compuestos

orgánicos volátiles adicionales presentes y comparar estas cantidades con valores de control para cada compuesto orgánico volátil respectivo;

en el que una mayor cantidad de isopropanol y ácido butanoico, 3-metil, etil éster en comparación con sus respectivos valores de control es indicativa de una mayor probabilidad de que el individuo tenga cáncer colorrectal;

- 5 y un aumento o disminución en el nivel de dicho uno o más compuestos orgánicos volátiles adicionales con respecto al valor de control es indicativo de una mayor probabilidad de que el individuo tenga cáncer colorrectal.

En otra realización particular, el método de la presente invención comprende las etapas de:

i) analizar una muestra de heces recogida de dicho individuo para detectar si los compuestos orgánicos volátiles, isopropanol, 2-hexanona y ácido butanoico, 3-metil, etil éster, están presentes; y

- 10 ii) si están presentes isopropanol, 2-hexanona y ácido butanoico, 3-metil, etil éster, determinar la cantidad de isopropanol, 2-hexanona y ácido butanoico, 3-metil, etil éster presentes y comparar estas cantidades con los valores de control para cada compuesto orgánico volátil respectivo;

en el que una mayor cantidad de isopropanol, 2-hexanona y ácido butanoico, 3-metil, etil éster en comparación con sus respectivos valores de control es indicativa de una mayor probabilidad de que el individuo tenga cáncer colorrectal.

- 15 En otra realización particular, el método de la presente invención comprende las etapas de:

i) analizar una muestra de heces recogida de dicho individuo para detectar si están presentes los compuestos orgánicos volátiles, isopropanol, 2-hexanona, ácido butanoico, 3-metil, etil éster y uno o más compuestos orgánicos volátiles adicionales; y

- 20 ii) si están presentes isopropanol, 2-hexanona, ácido butanoico, 3-metil, etil éster uno o más compuestos orgánicos volátiles adicionales, determinar la cantidad de isopropanol, 2-hexanona, ácido butanoico, 3-metil, etil éster y uno o más compuestos orgánicos volátiles adicionales presentes y comparar estas cantidades con valores de control para cada compuesto orgánico volátil respectivo;

en el que una mayor cantidad de isopropanol, 2-hexanona y ácido butanoico, 3-metil, etil éster en comparación con sus respectivos valores de control es indicativa de una mayor probabilidad de que el individuo tenga cáncer colorrectal;

- 25 y un aumento o disminución en el nivel de dicho uno o más compuestos orgánicos volátiles adicionales con respecto al valor de control es indicativo de una mayor probabilidad de que el individuo tenga cáncer colorrectal.

En otra realización particular, el método de la presente invención comprende las etapas de:

- 30 i) analizar una muestra de heces recogida de dicho individuo para detectar si están presentes los compuestos orgánicos volátiles, isopropanol, 2-hexanona, ácido butanoico, 3-metil, etil éster y uno o más compuestos orgánicos volátiles adicionales; y

ii) si están presentes isopropanol, 2-hexanona, ácido butanoico, 3-metil, etil éster y uno o más compuestos orgánicos volátiles adicionales, determinar la cantidad de isopropanol, 2-hexanona, ácido butanoico, 3-metil, etil éster y uno o más compuestos orgánicos volátiles adicionales presentes y comparar estas cantidades con valores de control para cada compuesto orgánico volátil respectivo;

- 35 en el que el uno o más compuestos orgánicos volátiles adicionales se seleccionan de:

i) Ácido butanoico, éster 1-metiletilico;

ii) Ácido pentanoico, éster 1-metiletilico;

iii) p-Xileno;

iv) Ácido propanoico, éster 1-metiletilico; o

- 40 v) Dimentol;

y en el que una mayor cantidad de isopropanol, 2-hexanona y ácido butanoico, 3-metil, etil éster en comparación con sus respectivos valores de control es indicativa de una mayor probabilidad de que el individuo tenga cáncer colorrectal;

y un aumento o disminución en el nivel de dicho uno o más compuestos orgánicos volátiles adicionales con respecto al valor de control es indicativo de una mayor probabilidad de que el individuo tenga cáncer colorrectal.

- 45 En otra realización particular, el método de la presente invención comprende las etapas de:

i) analizar una muestra de heces recogida de dicho individuo para detectar si cada uno de los compuestos orgánicos volátiles enumerados a continuación está presente:

- isopropanol;
- 2-hexanona;
- 5 ▪ ácido butanoico, 3-metil, etil éster;
- ácido butanoico, éster 1-metilefílico;
- ácido pentanoico, éster 1-metilefílico;
- p-xileno;
- ácido propanoico, éster 1-metilefílico; y

10 ▪ dimentol;

ii) si cada uno de los compuestos orgánicos volátiles de la etapa i) está presente, determinar la cantidad de cada uno de los compuestos orgánicos volátiles de la etapa i) y comparar estas cantidades con valores de control para cada compuesto orgánico volátil respectivo;

15 y en el que una cantidad aumentada de isopropanol, 2-hexanona, ácido butanoico, 3-metil, etil éster, ácido butanoico, éster 1-metilefílico, ácido pentanoico, éster 1-metilefílico, p-xileno and ácido propanoico, éster 1-metilefílico en comparación con sus respectivos valores de control es indicativo de una mayor probabilidad de que el individuo tenga cáncer colorrectal;

y una disminución en el nivel de dimentol con respecto al valor de control es indicativa de una mayor probabilidad de que el individuo tenga cáncer colorrectal.

20 En otra realización particular, el método de la presente invención comprende las etapas de:

i) analizar una muestra de heces recogida de dicho individuo para detectar si cada uno de los compuestos orgánicos volátiles enumerados a continuación está presente:

- isopropanol;
- 2-hexanona;
- 25 ▪ ácido butanoico, 3-metil, etil éster;
- ácido butanoico, éster 1-metilefílico;
- ácido pentanoico, éster 1-metilefílico; o
- p-xileno;

30 i) si cada uno de los compuestos orgánicos volátiles de la etapa i) está presente, determinar la cantidad de cada uno de los compuestos orgánicos volátiles de la etapa i) y comparar estas cantidades con valores de control para cada compuesto orgánico volátil respectivo;

y en el que es indicativa una mayor cantidad de isopropanol, 2-hexanona, ácido butanoico, 3-metil, etil éster, ácido butanoico, éster 1-metilefílico, ácido pentanoico, éster 1-metilefílico y p-xileno en comparación con sus respectivos valores de control de una mayor probabilidad de que el individuo tenga cáncer colorrectal.

35 Biomarcadores de la presente invención.

Tras una extensa investigación, los inventores pudieron identificar y cuantificar las cantidades de compuestos orgánicos volátiles específicos (por ejemplo, isopropanol) presentes en una muestra de heces obtenida de un individuo. Mediante la correlación de las cantidades de cada uno de estos compuestos orgánicos volátiles con las cantidades correspondientes de cada compuesto orgánico volátil en las heces de un grupo de control, los inventores pudieron determinar la probabilidad de que un individuo tuviera cáncer colorrectal. De este modo, los inventores identificaron ciertos compuestos orgánicos volátiles descritos en este documento, usados solos o en combinación, que podrían usarse como biomarcadores para el cáncer colorrectal.

40

De acuerdo con lo anterior, en un aspecto adicional de la presente invención, se proporciona el uso de isopropanol en una muestra de heces como biomarcador para el cáncer colorrectal.

En otro aspecto más de la presente invención, se proporciona el uso de isopropanol y uno o más compuestos orgánicos volátiles adicionales en una muestra de heces como biomarcadores para el cáncer colorrectal, en el que el uno o más compuestos orgánicos volátiles adicionales se seleccionan de:

- i) 2-hexanona;
- 5 ii) Ácido butanoico, 3-metil, etil éster;
- iii) Ácido butanoico, éster 1-metiletilico;
- iv) Ácido pentanoico, éster 1-metiletilico;
- v) p-Xileno;
- vi) Ácido propanoico, éster 1-metiletilico; o
- 10 vii) dimentol.

En determinadas realizaciones, se usan isopropanol, ácido butanoico, 3-metil, etil éster y opcionalmente uno o más compuestos orgánicos volátiles enumerados en el párrafo [0054] o [0060] anterior como biomarcadores para el cáncer colorrectal.

- 15 En otras realizaciones, se usan isopropanol, 2-hexanona, ácido butanoico, 3-metil, etil éster y opcionalmente uno o más compuestos orgánicos volátiles enumerados en el párrafo [0054] o [0060] anterior como biomarcadores para el cáncer colorrectal.

En una realización particular, el isopropanol y todos los demás compuestos orgánicos volátiles enumerados en el párrafo [0054] o [0060] anterior se usan como biomarcadores para el cáncer colorrectal.

- 20 La capacidad del compuesto orgánico volátil (por ejemplo, isopropanol) de la presente invención para funcionar como un biomarcador fiable para el cáncer colorrectal se puede cuantificar usando diversos modelos estadísticos y/o cálculos. El experto en la técnica podrá seleccionar uno o más modelos o cálculos estadísticos apropiados para su uso con el fin de determinar la eficacia del compuesto(s) orgánico(s) volátil(es) como predictor del cáncer colorrectal. Un modelo estadístico particular que se puede usar para cuantificar la capacidad de los compuestos orgánicos volátiles (por ejemplo, isopropanol) para funcionar como biomarcador de cáncer colorrectal es la curva característica operativa del receptor, que se crea trazando la tasa de verdaderos positivos (TPR) contra la tasa de falsos positivos (FPR) en diversos configuraciones de umbral. Calcular el área bajo la característica operativa del receptor (comúnmente conocida como AUROC) proporciona un valor cuantitativo de qué tan bueno es un predictor de un compuesto orgánico volátil en particular.
- 25

- 30 De este modo, en una realización, los compuestos orgánicos volátiles de la presente invención, usados solos o en combinación, tienen un valor calculado de área bajo la característica operativa del receptor (AUROC) mayor que o igual a 0.7. De manera adecuada, el o los compuestos orgánicos volátiles de la presente invención, usados solos o en combinación, tienen un valor calculado del área bajo la característica operativa del receptor (AUROC) mayor que o igual a 0.75. Más adecuadamente, el o los compuestos orgánicos volátiles de la presente invención, usados solos o en combinación, tienen un valor calculado del área bajo la característica operativa del receptor (AUROC) mayor que o igual a 0.8. Lo más adecuado, el o los compuestos orgánicos volátiles de la presente invención, usados solos o en combinación, tienen un valor calculado del área bajo la característica operativa del receptor (AUROC) mayor que o igual a 0.85.
- 35

- 40 Otro modelo estadístico que puede usarse para cuantificar la capacidad del compuesto orgánico volátil (por ejemplo, isopropanol) para funcionar como biomarcador de cáncer colorrectal es la prueba t de Student. Esta prueba proporciona un método para probar hipótesis sobre el promedio de una muestra pequeña extraída de una población distribuida más grande, cuando se desconoce la desviación estándar de la población más grande. La prueba t de Student proporciona ciertos valores P, o probabilidades calculadas, que son las probabilidades, suponiendo que la hipótesis nula sea verdadera, de observar una estadística de prueba más extrema en la dirección de la hipótesis alternativa que la observada. Se dice que un resultado es estadísticamente significativo si el valor p es pequeño (es decir, menor que 0.1).
- 45

- De este modo, en otra realización, el(los) compuesto(s) orgánico(s) volátil(es) de la presente invención tiene un valor de p calculado usando la prueba t de Student menor que o igual a 0.06. De manera adecuada, el(los) compuesto(s) orgánico(s) volátil(es) de la presente invención tiene un valor p calculado usando la prueba t de Student menor que o igual a 0.05. Más adecuadamente, el(los) compuesto(s) orgánico(s) volátil(es) de la presente invención tiene un valor de p calculado usando la prueba t de Student menor que o igual a 0.04. Aún más adecuadamente, el(los) compuesto(s) orgánico(s) volátil(es) de la presente invención tiene un valor p calculado usando la prueba t de Student menor que o igual a 0.03. Lo más adecuado, el o los compuestos orgánicos volátiles de la presente invención tienen un valor de p calculado usando la prueba t de Student menor que o igual a 0.01.
- 50

Ejemplos

Descripción de dibujos

Se describirán realizaciones de la invención, únicamente a modo de ejemplo, con referencia a los dibujos adjuntos, en los que:

5 La figura 1 muestra el PLS-DA que compara los VOC emitidos por muestras fecales de pacientes con adenocarcinoma de colon y sin neoplasia (normal). Todos los VOC identificados se sometieron a PLS-DA usando Metaboanalyst.

La figura 2 muestra una curva ROC que muestra la sensibilidad y especificidad del modelo 3-VOC (alcohol isopropílico; 2-hexanona; 3-metil, etil éster del ácido butanoico) para el diagnóstico de cáncer colorrectal.

Materiales y métodos

Participantes

10 La mayoría de los participantes fueron reclutados en las listas de espera de colonoscopia del Hospital Universitario Royal Liverpool.

15 Los participantes fueron personas remitidas por el programa de detección de cáncer de intestino de Merseyside y Wirral con FOBT positivo, o pacientes sometidos a colonoscopia para vigilancia de pólipos, polipectomía planificada, investigación de anemia por deficiencia de hierro (IDA), cambio en el hábito intestinal o imágenes radiológicas anormales. Se desconocía el estado FOBT de los pacientes sin BCSP.

Se proporcionó un subconjunto de muestras fecales de una cohorte de pacientes sintomáticos sometidos a colonoscopia en Sheffield y Plymouth, Reino Unido.

20 La aprobación del comité de ética para el estudio se obtuvo del Comité NRES South West - Central Bristol (referencia REC 14/SW/1162) con la aprobación de R&D de la Universidad de Liverpool y Broadgreen University Hospital Trust, donde se reclutó a los pacientes durante un período de 12 meses. Todos los pacientes recibieron una hoja informativa y dieron su consentimiento por escrito.

El comité de investigación del programa de detección de cáncer intestinal del NHS también otorgó un permiso específico. Las muestras recolectadas de Sheffield and Plymouth se adquirieron de acuerdo con la aprobación ética existente.

25 Recogida y almacenamiento de muestras.

Las muestras se produjeron dentro de las 48 horas posteriores a la realización de la colonoscopia por parte del donante y antes de comenzar la preparación intestinal requerida. Se pidió a los participantes que colocaran al menos 3 cucharadas de heces en un frasco de vidrio, antes de sellarlo y almacenarlo en un lugar fresco. La muestra fue llevada al Departamento de Endoscopia cuando los pacientes asistieron para la colonoscopia y recogida por el investigador.

30 Se registraron los resultados de la colonoscopia, incluido cualquier hallazgo histológico. Luego, los pacientes se clasificaron como sin neoplasia, pólipos adenomatosos o cáncer. Se registró la ubicación, tamaño y número de pólipos. Los pólipos se asignaron al grupo de adenoma únicamente después de la confirmación histológica. Los pólipos hiperplásicos se clasificaron como no neoplasias.

También se registraron detalles demográficos, tabaquismo y uso de antibióticos.

35 Análisis de laboratorio

Se tomaron muestras del Departamento de Endoscopia directamente al laboratorio y se dividieron en alícuotas 450 mg de heces no adulteradas en viales nuevos con espacio de cabeza de 10 ml y se sellaron con tapas magnéticas (Supelco, Reino Unido).^[19] Tanto la muestra destinada al análisis como las heces residuales se almacenaron a -20 °C hasta que se realizó el análisis GCMS.

40 El análisis de VOC en el espacio de cabeza se realizó usando una fibra de microextracción en fase sólida Combipal (CTC, Suiza) y carboxeno/polidimetilsiloxano (Sigma Aldrich, Dorset, Reino Unido). La fibra se expuso al espacio superior sobre las heces durante 20 minutos.

45 Los VOC se analizaron mediante GCMS (Perkin Elmer Clarus 500 cuadrupole, Beaconsfield, Reino Unido): Los VOC se desorbieron térmicamente de la fibra a 220 °C en el puerto de inyección del GCMS durante 5 minutos. La inyección se realizó en modo splitless y se activó un split de 50 ml/min a los dos minutos de ejecución. Se pasó gas portador de helio con una pureza del 99.996 % (BOC, Guildford, Reino Unido) a través de un sistema de purificación de helio, Excelasorb.™ (Supelco, Poole, Reino Unido) a 1 ml min⁻¹. La columna para GC era una columna capilar Zebron ZB-624 de 60 metros de largo con un diámetro interior de 0.25 mm. La columna estaba revestida con una película de 1.4 μm, diseñada específicamente para la separación de VOC (Phenomenex, Macclesfield, Reino Unido), que consta de 94 % de dimetilpolisiloxano y 6 % de cianopropilfenilo. El programa de temperatura del GCMS de la serie fue el siguiente: la temperatura inicial del horno se mantuvo a 40 °C, durante 2 minutos, luego la temperatura se aumentó a una velocidad de 5 °C/min hasta 220 °C, con un mantenimiento de 4 minutos en esta temperatura para dar un tiempo

total de ejecución de 42 minutos. El espectrómetro de masas se hizo funcionar en modo de ionización por impacto electrónico (EI), explorando el intervalo de iones de masa 10-300 a 0.05 barridos/s. Se usó un retraso de disolvente de 4 minutos al inicio del experimento. ^[19-21]

Procesamiento de datos

5 Los datos de GCMS se procesaron usando una tubería que involucra el software Automated Mass Spectral Deconvolution and Identification System (AMDIS, versión 2.71, 2012), la biblioteca de espectros de masas NIST (versión 2.0, 2011) y el paquete R (R core team, 2013) Metab.^[2]

10 Se usaron los software AMDIS y NIST para crear una biblioteca de VOC que contiene 162 metabolitos presentes en las muestras de heces analizadas en este estudio. Se usó una coincidencia directa e inversa de 800/1000 y superior para asignar identificaciones tentativas de compuestos. Usando esta biblioteca de VOC, se aplicó AMDIS para deconvolucionar cromatogramas e identificar metabolitos.

15 Metab procesó adicionalmente el informe generado por AMDIS para confirmar la identidad de los metabolitos y recalcular sus abundancias relativas en función de la intensidad de un fragmento de masa iónica específica por metabolito. Para desarrollar modelos estadísticos parsimoniosos y robustos, se eliminaron aquellos compuestos que estaban presentes en menos del 20 % de los pacientes de ambos grupos.^[20,21]

Análisis estadístico

El análisis de los datos se realizó en R, Stata y Metaboanalyst,^[3] usando la prueba t de Student, la prueba exacta de Fisher, ANOVA, corrección de la tasa de descubrimiento falso, análisis discriminante de mínimos cuadrados parciales (PLS-DA), análisis factorial y análisis de característica del operador del receptor (ROC).

20 Se usó un modelo de regresión logística, junto con una validación cruzada de 10 veces, para probar biomarcadores potenciales.

Cuando se usó Metaboanalyst, los datos se normalizaron mediante la mediana y se transformaron logarítmicamente.

Resultados

Demografía del participante

25 Se incluyeron en este estudio un total de 137 pacientes: la edad promedio fue de 64.3 años; El 56 % eran hombres. La edad media fue menor en aquellos sin neoplasia y mayor en aquellos con cáncer, pag=0.02.

Ninguno de los participantes informó ser fumador o vegetariano.

Se anotó el origen étnico autoinformado: todos los pacientes, excepto uno, declararon ser británicos blancos. Los participantes del BCSP constituyeron el grupo más grande de donantes (31.5 %).

30 Tabla 1 - Características demográficas y clínicas de los participantes reclutados en Liverpool, Sheffield y Plymouth.

| | Total | Sin neoplasia | Adenoma | Cáncer |
|------------------------------|--------------|---------------|--------------|--------------|
| Número | 137 | 60 | 56 | 21 |
| Edad media, años (intervalo) | 64.3 (22-85) | 61.9 (22-85) | 65.6 (41-84) | 72.7 (64-78) |
| Género | | | | |
| Masculino | 69 | 25 | 36 | 7 |
| Femenino | 57 | 34 | 20 | 3 |
| Fumador (Sí) | 0 | 0 | 0 | 0 |
| Indicación de colonoscopia | | | | |
| BCSP | 38 | 13 | 22 | 3 |
| AIF | 27 | 16 | 6 | 5 |

| | | | | |
|--|----|----|----|----|
| Cambio en el hábito intestinal: diarrea. | 16 | 11 | 4 | 1 |
| Vigilancia neoplasia previa/HF | 35 | 10 | 24 | 1 |
| Evaluación/vigilancia de la EII | 9 | 9 | 0 | 0 |
| GI sangrado | 1 | 1 | 0 | 0 |
| Desconocido | 11 | 0 | 0 | 11 |

Identificación de compuestos orgánicos volátiles (biomarcadores)

Se identificaron un total de 162 VOC en todo el conjunto de muestras. El número medio de VOC identificados en toda la cohorte fue 56.7, sin diferencias significativas entre aquellos con o sin neoplasia, $p=0.2$.

- 5 La identificación de biomarcadores se centró en enfermedades neoplásicas de mayor riesgo, a saber, cáncer colorrectal establecido, un adenoma único de >1 cm de tamaño y >4 pólipos individuales de cualquier tamaño.

El análisis se realizó usando datos cuantitativos y cualitativos.

VOC como biomarcador de adenocarcinoma de colon: análisis cuantitativo

- 10 PLS-DA que comparó aquellos sin neoplasia y aquellos con adenocarcinoma de colon mostró una separación que sugirió una posible utilidad diagnóstica (Figura 1). Los candidatos potenciales para el análisis de biomarcadores se pueden ver en la tabla 2.

Tabla 2 - VOC con valores de $p < 0,05$, identificados a partir de la prueba t de Student que compara la ausencia de neoplasia y el cáncer. El valor q se encontró después de corregir comparaciones múltiples.

| VOC | valor p | valor q | Dirección de la abundancia en el cáncer: |
|---------------------------------------|---------|---------|--|
| Isopropanol | <0.0001 | 0.004 | Aumentó |
| 2-hexanona | 0.01 | 0.77 | Aumentó |
| Ácido butanoico, 3-metil, etil éster | 0.03 | 0.77 | Aumentó |
| Ácido butanoico, éster 1-metileílico | 0.03 | 0.77 | Aumentó |
| Ácido pentanoico, éster 1-metileílico | 0.03 | 0.77 | Aumentó |
| p-Xileno | 0.03 | 0.77 | Aumentó |
| Ácido propanoico, éster 1-metileílico | 0.04 | 0.77 | Aumentó |
| dl-Mentol | 0.05 | 0.77 | Disminuido |

- 15 El isopropanol se mostró más prometedor como biomarcador del cáncer colorrectal. De forma aislada, alcanza un área bajo la característica operativa del receptor (AUROC) de 0.76.

- 20 Calcular las proporciones de todos los pares de metabolitos posibles y luego elegir las proporciones mejor clasificadas, según los valores de p, permitió una evaluación adicional de los biomarcadores. Esta técnica identificó la combinación de ácido butanoico, 3-metil- e isopropanol como la que tiene el mayor potencial: los datos de 21 pacientes con cáncer y 60 sin neoplasia se modelaron mediante regresión logística y validación cruzada de 10 veces, basada en la abundancia de ácido butanoico, 3-metil- e isopropanol (Figura 2): AUROC es 0.86, sensibilidad 87.9 % (CI 95 % 0.87-0.99) y especificidad 84.6 % (CI 95 % 0.65-1.0).

VOC como biomarcador de adenocarcinoma de colon: análisis cualitativo

5 Se aplicó un análisis de componentes principales y un análisis de rasgos de rotación no ortogonal a los datos cualitativos (presencia/ausencia) de VOC. La solución no se pudo extraer debido a problemas de convergencia hasta que el número de factores extraídos se redujo a 17. Este procedimiento destacó la combinación de isopropanol, 2-hexanona y éster etílico del ácido 3-metil-butanoico como un predictor clave. El uso de los 3 VOC como panel de biomarcadores predice el cáncer frente a todos los demás con un valor de p de 0.001 y un área bajo la curva de 0.73, y predice el cáncer frente a lo normal con un valor de p de 0.006 y un área bajo la curva ROC de 0.70.

Tabla 3 - Prevalencia de isopropanol, 2-hexanona y éster etílico del ácido 3-metil-butanoico en heces de pacientes con adenocarcinoma de colon, pólipos adenomatosos de colon y sin neoplasia.

| | Adenoma | Cáncer | Normal |
|---|----------------|----------------|----------------|
| Número medio de estos tres VOC | 1.16 | 2.0 | 1.33 |
| Proporción que no tiene ninguno de estos tres VOC | 23.2 % (13/56) | 0 % (0/21) | 20.0 % (12/60) |
| Con solo 1 | 42.8 % (24/56) | 23.8 % (5/21) | 36.7 % (22/60) |
| Con solo 2 | 28.6 % (16/56) | 52.4 % (21/11) | 33.3 % (20/60) |
| Con los tres | 5.4 % (3/56) | 23.8 % (5/21) | 10.0 % (6/60) |

10 Las soluciones de referencia puras de isopropanol, 2-hexanona y ácido butanoico, 3-metil, etil éster confirmaron que la identificación en las muestras de heces era correcta.

Aunque en este documento se han descrito realizaciones específicas de la invención con fines de referencia e ilustración, para un experto en la técnica resultarán evidentes diversas modificaciones sin apartarse del alcance de la invención tal como se define en las reivindicaciones adjuntas.

15 Referencias

1 CRUK. http://publications.cancerresearchuk.org/downloads/Product/CS_KF_BOWEL.pdf. 2014.

2 Aggio R, Villas-Bôas SG, Ruggiero K. Metab: an R package for high-throughput analysis of metabolomics data generated by GC-MS. *Bioinformatics* 2011;27:2316-8. doi: 10.1093/bioinformatics/btr379

20 3 Xia, J., Sinelnikov, I., Han, B., and Wishart D. MetaboAnalyst 3.0 - making metabolomics more meaningful . *Nucleic acid Res* 2015;43:W251-7.

4 Ferlay J, Steliarova-Foucher E, Lortet-Tieulent J, et al. Cancer incidence and mortality patterns in Europe: estimates for 40 countries in 2012. *Eur J Cancer* 2013;49:1374-403. doi:10.1016/j.ejca.2012.12.027

5 Rees CJ, Bevan R. The National Health Service Bowel Cancer Screening Program: the early years. *Expert Rev Gastroenterol Hepatol* 2013;7:421-37. doi:10.1586/17474124.2013.811045

25 6 Trueman P, Lowson K, Chaplin S, et al. Bowel Cancer Services: Costs and Benefits. 2007.

7 Logan RF a, PatnickJ, Nickerson C, et al. Outcomes of the Bowel Cancer Screening Programme (BCSP) in England after the first 1 million tests. *Gut* 2012;61:1439-46. doi:10.1136/gutjnl-2011-300843

8 Corley DA, Jensen CD, Marks AR, et al. Adenoma detection rate and risk of colorectal cancer and death. *N Engl J Med* 2014;370:2541. doi:10.1056/NEJMoa1309086

30 9 Altobelli E, Lattanzi a, Paduano R, et al. Colorectal cancer prevention in Europe: burden of disease and status of screening programs. *Prev Med (Baltim)* 2014;62:132-41. doi:10.1016/j.ypmed.2014.02.010

10 Colorectal cancer association of Canada. A guide to FOBT and FIT tests. Guaiac-based FOBT Immunochem. FOBT. 2016;: <http://www.colorectal-cancer.ca/en/screening/fobt->.

35 11 Tonus C, Neupert G, Sellinger M. Colorectal cancer screening by non-invasive metabolic biomarker fecal tumor M2-PK. *World J Gastroenterol* 2006;12:7007-11.

- 12 Tinmouth J, Lansdorp-Vogelaar I, Allison JE. Faecal immunochemical tests versus guaiac faecal occult blood tests: what clinicians and colorectal cancer screening programme organisers need to know. *Gut* 2015;64:1327-37. doi:10.1136/gutjnl-2014-308074
- 5 13 Zorzi M, Fedeli U, Schievano E, et al. Impact on colorectal cancer mortality of screening programmes based on the faecal immunochemical test. *Gut* 2015;64:784-90. doi: 10.1136/gutjnl-2014-307508
- 14 Sawbridge D, Probert C. Population-based screening in colorectal cancer - current practice and future developments: faecal biomarkers review. *J Gastrointest Liver Dis* 2014;23:195-202.
- 15 Batty CA, Cauchi M, Lourenço C, et al. Use of the Analysis of the Volatile Faecal Metabolome in Screening for Colorectal Cancer. *PLoS One* 2015;10:e0130301. doi:10.1371/journal.pone.0130301
- 10 16 Arasaradnam RP, McFarlane MJ, Ryan-Fisher C, et al. Detection of colorectal cancer (CRC) by urinary volatile organic compound analysis. *PLoS One* 2014;9:e108750. doi:10.1371/journal.pone.0108750
- 17 Altomare DF, Di Lena M, Porcelli F, et al. Exhaled volatile organic compounds identify patients with colorectal cancer. *Br J Surg* 2013;100:144-50. doi:10.1002/bjs.8942
- 15 18 Altomare DF, Di Lena M, Porcelli F, et al. Effects of Curative Colorectal Cancer Surgery on Exhaled Volatile Organic Compounds and Potential Implications in Clinical Follow-up. *Ann Surg* 2015;262:862-7. doi:10.1097/SLA.0000000000001471
- 19 Reade S MA. Optimisation of Sample Preparation for Direct SPME-GC-MS Analysis of Murine and Human Faecal Volatile Organic Compounds for Metabolomic Studies. *J Anal Bioanal Tech* 2014;5. doi:10.4172/2155-9872.1000184
- 20 20 Bond A, Vernon A, Reade S, et al. Investigation of Volatile Organic Compounds Emitted from Faeces for the Diagnosis of Giardiasis. *J Gastrointest Liver Dis* 2015;24:281-6.
- 21 Khalid T, Aggio R, White P, et al. Urinary Volatile Organic Compounds for the Detection of Prostate Cancer. *PLoS One* 2015;10:e0143283. doi:10.1371/journal.pone.0143283

REIVINDICACIONES

1. Un método para determinar la probabilidad de que un individuo tenga cáncer colorrectal, comprendiendo el método las etapas de:
- 5 i) analizar una muestra de heces recogida de dicho individuo para detectar si el compuesto orgánico volátil isopropanol está presente;
- ii) si hay isopropanol presente en la etapa i), determinar la cantidad de isopropanol que está presente y comparar la cantidad detectada con un valor de control;
- en el que la presencia de una mayor cantidad de isopropanol en las heces en comparación con el valor de control es indicativa de una mayor probabilidad de que el individuo tenga cáncer colorrectal.
- 10 2. Un método según la reivindicación 1, en el que la etapa i) comprende además analizar la muestra de heces recogida de dicho individuo para detectar la presencia de uno o más compuestos orgánicos volátiles adicionales y, si uno o más compuestos orgánicos volátiles adicionales están presentes, la etapa ii) comprende además determinar la cantidad de uno o más compuestos orgánicos volátiles adicionales y comparar la cantidad detectada con uno o más valores de control para cada uno de los uno o más compuestos orgánicos volátiles adicionales;
- 15 en el que un aumento o disminución en el nivel de dicho uno o más compuestos orgánicos volátiles adicionales con respecto al valor de control es indicativo de la probabilidad de que el individuo tenga cáncer colorrectal.
3. Un método según la reivindicación 2, en el que el uno o más compuestos orgánicos volátiles adicionales son compuestos orgánicos con:
- (i) un peso molecular menor que o igual a 250 Da; y/o
- 20 (ii) un punto de ebullición menor que o igual a 250 °C cuando se mide a una presión atmosférica estándar de 101.3 kPa (1 atmósfera).
4. Un método según una cualquiera de las reivindicaciones 2 o 3, en el que el uno o más compuestos orgánicos volátiles adicionales se seleccionan de:
- i) 2-hexanona;
- 25 ii) Ácido butanoico, 3-metil-, etil éster;
- iii) Ácido butanoico, éster 1-metileílico;
- iv) Ácido pentanoico, éster 1-metileílico;
- v) p-Xileno;
- vi) Ácido propanoico, éster 1-metileílico; o
- 30 vii) Dimentol.
5. Un método según cualquiera de las reivindicaciones anteriores, en el que dicho método comprende las etapas de:
- i) analizar una muestra de heces recogida de dicho individuo para detectar si los compuestos orgánicos volátiles, isopropanol y ácido butanoico, 3-metil, etil éster, están presentes; y
- 35 ii) si están presentes isopropanol y ácido butanoico, 3-metil-, etil éster, determinar la cantidad de isopropanol y ácido butanoico, 3-metil-, etil éster presentes y comparar estas cantidades con valores de control para cada compuesto orgánico volátil respectivo;
- en el que una mayor cantidad de isopropanol y ácido butanoico, 3-metil-, etil éster en comparación con sus respectivos valores de control es indicativa de una mayor probabilidad de que el individuo tenga cáncer colorrectal;
- 40 opcionalmente en el que la etapa i) comprende además analizar la muestra de heces recolectada de dicho individuo para detectar la presencia de uno o más compuestos orgánicos volátiles adicionales y, si uno o más compuestos orgánicos volátiles adicionales están presentes, la etapa ii) comprende además determinar la cantidad del uno o más compuestos orgánicos volátiles adicionales y comparar la cantidad con uno o más valores de control para cada uno de los uno o más compuestos orgánicos volátiles adicionales;
- 45 en el que un aumento o disminución en el nivel de dicho uno o más compuestos orgánicos volátiles adicionales con respecto al valor de control es indicativo de la probabilidad de que el individuo tenga cáncer colorrectal;
- además opcionalmente en el que el uno o más compuestos orgánicos volátiles adicionales se seleccionan de

i) 2-hexanona;

ii) Ácido butanoico, éster 1-metileílico;

iii) Ácido pentanoico, éster 1-metileílico;

iv) p-Xileno;

5 v) Ácido propanoico, éster 1-metileílico; o

vi) Dimentol;

y en el que un aumento en los niveles de i) a v) con respecto a sus respectivos valores de control y una disminución en la cantidad de vi) con respecto a su valor de control es indicativo de una mayor probabilidad de que el individuo tenga cáncer colorrectal.

10 6. Un método según cualquiera de las reivindicaciones anteriores, en el que dicho método comprende las etapas de:

i) analizar la muestra de heces recolectada de dicho individuo para detectar si los compuestos orgánicos volátiles, isopropanol, 2-hexanona y ácido butanoico, éster 3-metileílico, están presentes;

15 ii) si isopropanol, 2-hexanona y ácido butanoico, 3-metil, etil éster, están presentes en la etapa i), determinar la cantidad de isopropanol, 2-hexanona y ácido butanoico, 3-metil, etil éster presentes y comparar la cantidad con valores de control para cada compuesto orgánico volátil respectivo;

en el que una mayor cantidad de isopropanol, 2-hexanona y ácido butanoico, 3-metil, etil éster en comparación con sus respectivos valores de control es indicativa de una mayor probabilidad de que el individuo tenga cáncer colorrectal;

20 opcionalmente en el que la etapa i) comprende además analizar la muestra de heces recolectada de dicho individuo para detectar la presencia de uno o más compuestos orgánicos volátiles adicionales y, si uno o más compuestos orgánicos volátiles adicionales están presentes, la etapa ii) comprende además determinar la cantidad del uno o más compuestos orgánicos volátiles adicionales y comparar la cantidad con uno o más valores de control para cada uno de los uno o más compuestos orgánicos volátiles adicionales

en el que un aumento o disminución en el nivel de dicho uno o más compuestos orgánicos volátiles adicionales con respecto al valor de control es indicativo de la probabilidad de que el individuo tenga cáncer colorrectal;

25 además opcionalmente en el que el uno o más compuestos orgánicos volátiles adicionales se seleccionan de:

i) Ácido butanoico, éster 1-metileílico;

ii) Ácido pentanoico, éster 1-metileílico;

iii) p-Xileno;

iv) Ácido propanoico, éster 1-metileílico; o

30 v) Dimentol;

y en el que un aumento en los niveles de i) a iv) con respecto a sus respectivos valores de control y una disminución en la cantidad de v) con respecto a su valor de control es indicativo de una mayor probabilidad de que el individuo tenga cáncer colorrectal.

35 7. Un método según la reivindicación 4, en el que se determina la presencia y cantidad de isopropanol y todos los compuestos orgánicos volátiles enumerados en la reivindicación 4, y las cantidades de cada uno se comparan con los valores de control respectivos.

8. Un método según cualquiera de las reivindicaciones anteriores, en el que la presencia y cantidad del compuesto orgánico volátil se determina usando espectrometría de masas por cromatografía de gases (GC-MS).

40 9. Un método según cualquier reivindicación anterior, en el que el individuo tiene uno o más síntomas asociados con el cáncer colorrectal;

opcionalmente en el que los síntomas asociados con el cáncer colorrectal se seleccionan entre sangrado rectal, diarrea, estreñimiento, calambres abdominales, dolor abdominal, fatiga o pérdida de peso.

10. Un método según cualquier reivindicación anterior, en el que el individuo tiene un factor de riesgo predeterminado asociado con el cáncer colorrectal,

opcionalmente en el que el factor de riesgo predeterminado asociado con el cáncer colorrectal se determina basándose en uno o más de los siguientes:

- i) una prueba de sangre oculta en heces (FOBT) positiva;
 - ii) la presencia de pólipos colorrectales;
 - 5 iii) anemia por deficiencia de hierro;
 - iv) una condición que requiere imágenes radiológicas del intestino;
 - v) hábitos intestinales anormales del individuo (por ejemplo, estreñimiento y/o diarrea);
 - vi) antecedentes familiares de pólipos colorrectales; o
 - vii) la presencia de un síndrome de poliposis.
- 10 11. Un método según una cualquiera de las reivindicaciones 1 a 10, en el que dicho método implica determinar la probabilidad de que un individuo tenga adenocarcinoma colorrectal.
12. Uso de isopropanol en una muestra de heces como biomarcador de cáncer colorrectal.
13. Uso según la reivindicación 12, en el que isopropanol y uno o más compuestos orgánicos volátiles adicionales en una muestra de heces como biomarcadores para el cáncer colorrectal, en el que el uno o más compuestos orgánicos volátiles adicionales se seleccionan de:
- 15 i) 2-hexanona;- ii) Ácido butanoico, 3-metil, etil éster;
- iii) Ácido butanoico, éster 1-metileílico;
- iv) Ácido pentanoico, éster 1-metileílico;

20 v) p-Xileno;- vi) Ácido propanoico, éster 1-metileílico; o
- vii) dimentol.

14. Uso según la reivindicación 13, en el que isopropanol, ácido butanoico, 3-metil, etil éster y opcionalmente uno o más compuestos orgánicos volátiles enumerados en la reivindicación 13 se usan como biomarcadores para el cáncer colorrectal.

25 15. Uso según una cualquiera de las reivindicaciones 13 o 14, en el que isopropanol, 2-hexanona, ácido butanoico, 3-metil, etil éster y opcionalmente uno o más compuestos orgánicos volátiles enumerados en la reivindicación 13 se usan como biomarcadores para el cáncer colorrectal.

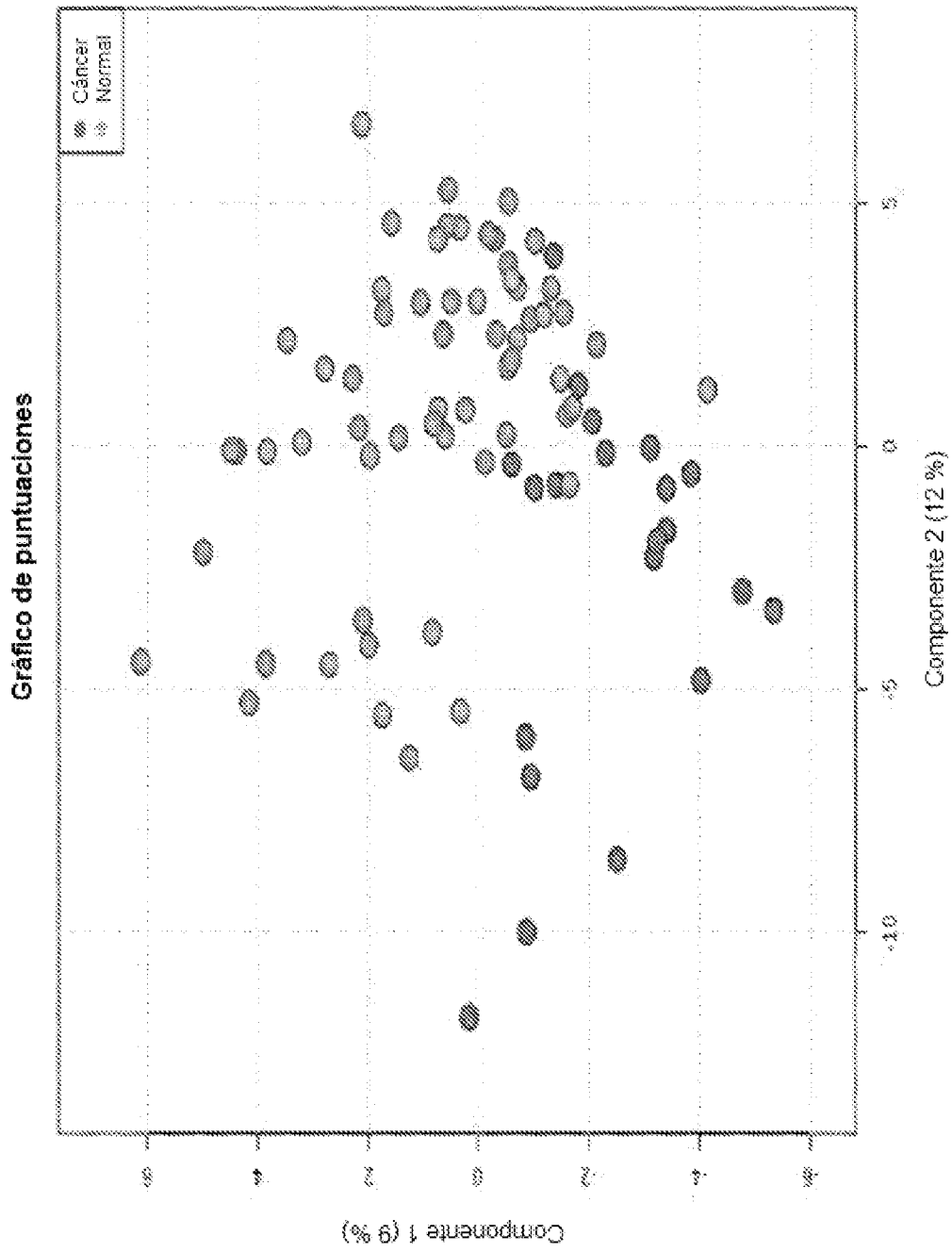


FIGURA 1

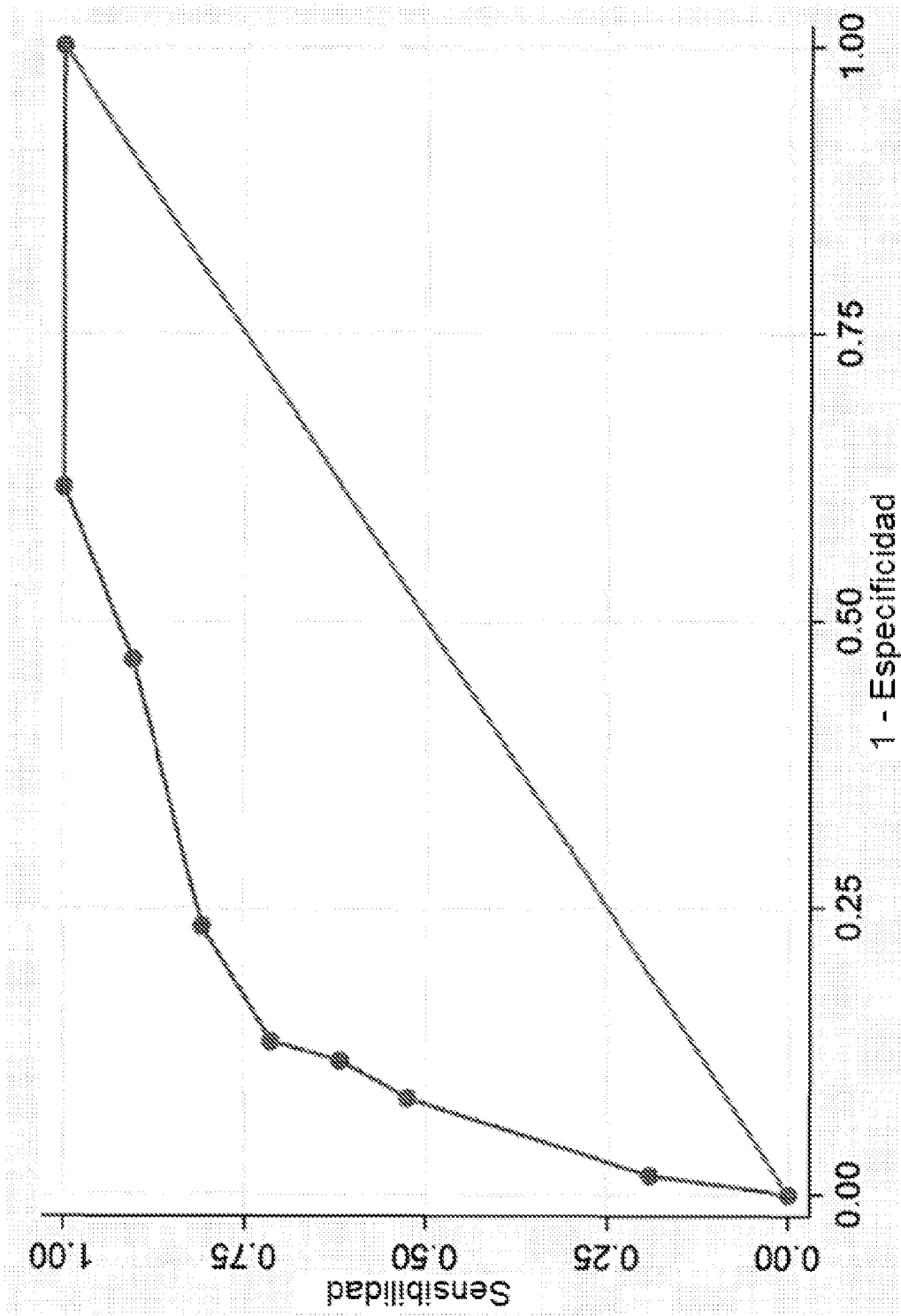


FIGURA 2