

(12) SOLICITUD INTERNACIONAL PUBLICADA EN VIRTUD DEL TRATADO DE COOPERACIÓN EN MATERIA DE PATENTES (PCT)

(19) Organización Mundial de la Propiedad
Intelectual
Oficina internacional



(43) Fecha de publicación internacional
3 de junio de 2010 (03.06.2010)

PCT

(10) Número de Publicación Internacional
WO 2010/061023 A1

(51) Clasificación Internacional de Patentes:
C12Q 1/68 (2006.01)

(21) Número de la solicitud internacional:
PCT/ES2009/070479

(22) Fecha de presentación internacional:
3 de noviembre de 2009 (03.11.2009)

(25) Idioma de presentación: español

(26) Idioma de publicación: español

(30) Datos relativos a la prioridad:
P200803127
3 de noviembre de 2008 (03.11.2008) ES

(71) Solicitante (para todos los Estados designados salvo US): **FINA BIOTECH, S.L.U.** [ES/ES]; Gobelas, 21 1ª planta - La Florida, E-28023 Madrid (ES).

(72) Inventores; e

(75) Inventores/Solicitantes (para US solamente):
CAPELLA MUNAR, Gabriel [ES/ES]; Gobelas, 21 1ª planta - La Florida, E-28023 Madrid (ES). **AZUARA GARCIA, Daniel** [ES/ES]; Gobelas, 21 1ª planta - La Florida, E-28023 Madrid (ES). **ESTELLER BADOSA, Manel** [ES/ES]; Gobelas, 21 1ª planta - La Florida, E-28023 Madrid (ES).

(74) Mandatario: **CARPINTERO LOPEZ, Mario**; Alcala, 35, E-28014 Madrid (ES).

(81) Estados designados (a menos que se indique otra cosa, para toda clase de protección nacional admisible): AE, AG, AL, AM, AO, AT, AU, AZ, BA, BB, BG, BH, BR, BW, BY, BZ, CA, CH, CL, CN, CO, CR, CU, CZ, DE, DK, DM, DO, DZ, EC, EE, EG, ES, FI, GB, GD, GE, GH, GM, GT, HN, HR, HU, ID, IL, IN, IS, JP, KE, KG, KM, KN, KP, KR, KZ, LA, LC, LK, LR, LS, LT, LU, LY, MA, MD, ME, MG, MK, MN, MW, MX, MY, MZ, NA, NG, NI, NO, NZ, OM, PE, PG, PH, PL, PT, RO, RS, RU, SC, SD, SE, SG, SK, SL, SM, ST, SV, SY, TJ, TM, TN, TR, TT, TZ, UA, UG, US, UZ, VC, VN, ZA, ZM, ZW.

(84) Estados designados (a menos que se indique otra cosa, para toda clase de protección regional admisible): ARIPO (BW, GH, GM, KE, LS, MW, MZ, NA, SD, SL, SZ, TZ, UG, ZM, ZW), euroasiática (AM, AZ, BY, KG, KZ, MD, RU, TJ, TM), europea (AT, BE, BG, CH, CY, CZ, DE, DK, EE, ES, FI, FR, GB, GR, HR, HU, IE, IS, IT, LT, LU, LV, MC, MK, MT, NL, NO, PL, PT, RO, SE, SI, SK, SM, TR), OAPI (BF, BJ, CF, CG, CI, CM, GA, GN, GQ, GW, ML, MR, NE, SN, TD, TG).

Publicada:

- con informe de búsqueda internacional (Art. 21(3))
- con la parte de lista de secuencias de la descripción (Regla 5.2(a))

(54) Title: COLORECTAL CANCER DIAGNOSTIC METHOD

(54) Título : MÉTODO DE DIAGNÓSTICO DE CANCER COLORECTAL

(57) Abstract: The invention relates to an in vitro method for diagnosing colorectal cancer, in which a biological sample obtained from a subject is used to determine the promoter methylation state of at least one of the following genes therein, namely: APC, RARB2 and p14 and, optionally, MGMT and p16. The invention also relates to a kit used to carry out the method.

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



WO 2010/061023 A1

MÉTODO DE DIAGNÓSTICO DE CANCER COLORECTAL

CAMPO DE LA INVENCION

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

ANTECEDENTES DE LA INVENCION

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

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

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

falsos positivos. Además, algunas pruebas requieren que los pacientes cambien su dieta, lo que reduce potencialmente su empleo [46-47].

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

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

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

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

Los genomas de las células preneoplásicas, cancerosas y envejecidas comparten tres cambios importantes en los niveles de metilación, como eventos tempranos en el desarrollo de algunos tumores. Primero, la hipometilación de la heterocromatina que

conduce a una inestabilidad genómica e incrementa los eventos de recombinación mitótica; segundo, hipermetilación de genes individuales y, finalmente hipermetilación de la islas CpG de genes constitutivos y genes supresores de tumores. Los dos niveles de metilación pueden presentarse en forma individual o simultánea. En general, la hipermetilación está involucrada con el silenciamiento de genes y la hipometilación con la sobre-expresión de ciertas proteínas involucradas en los procesos de invasión y metástasis.

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

En los últimos años, los cambios en la metilación de los residuos de citosina de secuencias ricas en CpG (islas CpG) se han reconocido cada vez más como aberraciones moleculares muy habituales con supuesta utilidad clínica [34]. En el cáncer colorrectal, los marcadores metilados son interesantes para la detección porque se producen con alta frecuencia en la neoplasia de fase temprana [35]. Se ha propuesto la detección de la metilación de islas CpG en ADN humano aislado de heces [11-12,36] o de suero [37-39] como una estrategia novedosa para el diagnóstico precoz de la neoplasia colorrectal. Así, se ha evaluado el estado de metilación de la región promotora de genes tales como *p16*, *MGMT*, *MLH1*, *SFRP2*, *HIC1* y *vimentina* en el ADN de heces, bien solos o bien usando un panel combinado [11-15,25,40, 48-53]. La metilación de *SFRP2* es, hasta ahora, el marcador individual más sensible (sensibilidad del 77-90%). Sin embargo, tanto los marcadores metilados individuales como los combinados han estado obstaculizados por una proporción relativamente alta de falsos positivos.

La evaluación de la hipermetilación de promotores de genes en el ADN de heces podría proporcionar un enfoque valioso para la detección no invasiva de lesiones colorrectales tempranas [11-15]. Sin embargo, la falta de especificidad demostrada hasta ahora dificulta su posible utilidad clínica. El ADN resultante de la exfoliación del

epitelio colónico en la materia fecal es difícilmente amplificable debido a la gran cantidad de inhibidores de PCR que se encuentra en las heces.

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

Así, tras un importante trabajo de investigación, han encontrado un panel de 5 marcadores metilados (*RARB2*, *MGMT*, *p16^{INK4a}*, *APC* y *p14^{ARF}*) que conjuntamente representan la mayoría de los tumores.

Tras hallar estos cinco marcadores, los autores de la invención, han desarrollado un nuevo método de diagnóstico precoz de cáncer colorectal basado en el análisis de las curvas de disociación mediante detección por PCR a tiempo real (*RT PCR Melting curve*, MC) del estado de metilación de los promotores de los 5 genes: *RARB2*, *p16^{INK4a}*, *MGMT*, *p14^{ARF}* y *APC* en el ADN de heces, demostrando una alta sensibilidad en la detección precoz de tumores de CCR y una excelente especificidad (ningún falso positivo en colonoscopias normales).

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

BREVE DESCRIPCIÓN DE LAS FIGURAS

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

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

OBJETO DE LA INVENCION

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

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

DESCRIPCION DE LA INVENCION

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

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

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

El gen **APC** (adenomatous polyposis coli) (también denominado GS; DP2; DP3; BTPS2; DP2.5), localizado en 5q21-q22, nº acceso NCBI M74088.1, codifica una proteína supresora de tumores que actúa como antagonista de la vía de señalización Wnt. Está además implicada en otros procesos como la migración y adhesión celular, activación transcripcional y apoptosis. Su inactivación se considera una alteración presente en la inmensa mayoría de los tumores colorectales.

El gen **RARB** (Retinoic acid receptor Beta) (también denominado HAP, NR1B2, RRB2), localizado en 3p24, nº acceso NCBI Y00291.1 codificada una proteína miembro de la superfamilia de receptores hormonales tiroide/esteroide de reguladores transcripcionales nucleares. El gen se expresa a partir de dos promotores distintos, los cuales presentan islas CpG distintas. RARB1 se expresa principalmente durante la embriogenesis, mientras que RARB2 se expresa en tejidos adultos y está hipermetilado en células cancerígenas.

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

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

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

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

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

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

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

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

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

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

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

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

APC, RARB2 y p14. Adicionalmente, el kit puede incluir cebadores para la determinación del estado de metilación del promotor de al menos uno de los genes p16 y MGMT.

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

EJEMPLOS

MATERIALES Y MÉTODOS

Pacientes y recogida de muestras fecales y tisulares

Análisis de tejidos tumorales

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

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

Conjunto de validación. Se recogieron heces de 28 pacientes con CCR esporádico, 23 pacientes con adenomas, 17 con enfermedad inflamatoria del intestino (EII) localizada en el colon (colitis ulcerosa y colitis de Crohn) y 20 sujetos macroscópicamente normales sometidos a cirugía o endoscopia en el Hospital Universitario de Bellvitge. Se recogieron muestras fecales de pacientes con CCR tras el tratamiento laxante antes de la cirugía colónica y durante la colonoscopia (enema) de los demás pacientes. Las

heces se almacenaron a -80°C hasta que se trataron. Todos los pacientes dieron su consentimiento informado por escrito para participar y para que sus muestras biológicas fueran analizadas.

Aislamiento de ADN y modificación con bisulfito

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

Análisis de metilación de ADN

PCR específica para metilación (MSP)

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

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

Se detectó la presencia de ADN metilado en base a la temperatura de disociación mediante RT PCR. Analizamos los estados de metilación de 5 genes (*RARB2*, *p16^{INK4}*,

MGMT, *p14^{ARF}* y *APC*) (figura 1). Se realizó una PCR en todos los casos para obtener un fragmento de cada una de las islas CpG que iban a analizarse (véase las condiciones en la tabla 1) usando un Light Cycler®2.0 (Roche Applied Science) y el Fast Start DNA Master Sybr Green I mix (Roche Applied Science) con detección en tiempo real, tal como se describe [22].

Tabla 1. Secuencia de los cebadores, tamaño de los productos, temperatura de anillamiento y CpGs internos para los ensayos de MC.

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

Tras el tratamiento con bisulfito, una secuencia metilada conserva los pares CG mientras que una secuencia no metilada presenta cambios a pares TG. Este cambio en el contenido de CG da como resultado una variación de la temperatura de disociación de un fragmento de ADN particular. Basándose en las temperaturas de disociación respecto a unos controles, cuyo estado de metilación era previamente conocido, fue posible asignar un estado de metilación a las muestras sometidas a prueba. El ensayo de análisis de la curva de fusión-metilación solamente empleó un conjunto de cebadores que no incluyeron CpG susceptibles de metilación en su secuencia, lo que aumentó la fiabilidad de la reacción. Este conjunto de cebadores (tabla 1) amplificó tanto la secuencia metilada como la no metilada después del tratamiento con bisulfito. La diferencia se hizo evidente en las curvas de disociación, ya que el producto metilado presenta una temperatura de disociación superior a la del producto no metilado.

RESULTADOS

Metilación en tumores de CCR mediante MSP

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

Conjunto de entrenamiento

Metilación en ADN fecal y tisular mediante MSP

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

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

metilación para la detección de células tumorales era del 75% para carcinomas y del 60% para adenomas (tabla 2).

TABLA 2. Prevalencia de marcadores metilados en ADN de heces y biopsia por parejas en el conjunto inicial de muestras (resultados MSP).

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

Conjunto de validación

Metilación en ADN fecal y tisular mediante curvas de fusión

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

TABLA 3. Prevalencia de marcadores metilados en ADN de heces y biopsia por parejas en el conjunto de validación (resultados MC).

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

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

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

Tabla 4. Prevalencia de los 5 marcadores metilados en ADN de heces y biopsia por parejas en el conjunto de validación (resultados MC).

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

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

Tabla 5. Amplificación de los 5 marcadores en individuos sanos

	MUESTRA	p14	p16	RARB2	APC	MGMT
NORMAL	HECES	8/20 (40%)	12/20(60%)	13/16(81%)	15/20(75%)	15/16(94%)
N=20	TEJIDO	20/20 (100%)	20/20(100%)	15/16(94%)	15/15(100%)	15/16(94%)
INFLAMATORIA	HECES	13/17(76%)	11/15(73%)	15/17(88%)	7/11(64%)	12/15(80%)
N=18	TEJIDO	15/18(100%)	13/14(93%)	12/13(92%)	12/13(92%)	9/10(90%)
	HECES	13/23(57%)	14/23(61%)	18/18(100%)	14/19(74%)	16/17(94%)
ADENOMA	TEJIDO N	22/23(96%)	23/23(100%)	21/21(100%)	13/14(92%)	18/18(100%)
N=23	TEJIDO AD	23/23(100%)	21/23(91%)	20/20(100%)	14/16(88%)	16/16(100%)
	HECES	17/30(57%)	18/30(60%)	22/23(96%)	16/21(76%)	16/21(76%)
TUMOR	TEJIDO N	27/28(96%)	28/29(97%)	23/25(92%)	23/25(92%)	24/25(96%)
N=30	TEJIDO T	29/30(97%)	29/30(97%)	26/27(96%)	22/25(88%)	21/21(100%)

BIBLIOGRAFÍA

- 1 Winawer S, Fletcher R, Rex D, *et al.* Colorectal cancer screening and surveillance: clinical guidelines and rationale-Update based on new evidence. *Gastroenterology* 2003;_124:544-60.
- 2 Mandel JS, Church TR, Bond JH, *et al.* The effect of fecal occult-blood screening on the incidence of colorectal cancer. *The New England journal of medicine* 2000;_343:1603-7.
- 3 Dong SM, Traverso G, Johnson C, *et al.* Detecting colorectal cancer in stool with the use of multiple genetic targets. *J Natl Cancer Inst* 2001;_93:858-65.
- 4 Ahlquist DA. Stool-based DNA tests for colorectal cancer: clinical potential and early results. *Rev Gastroenterol Disord* 2002;_2 Suppl 1:S20-6.
- 5 Traverso G, Shuber A, Levin B, *et al.* Detection of APC mutations in fecal DNA from patients with colorectal tumors. *N Engl J Med* 2002;_346:311-20.
- 6 Brenner DE, Rennert G. Fecal DNA biomarkers for the detection of colorectal neoplasia: attractive, but is it feasible? *J Natl Cancer Inst* 2005;_97:1107-9.
- 7 Capella G. Is fecal DNA testing superior to fecal occult-blood testing for colorectal cancer screening? *Nat Clin Pract Oncol* 2005;_2:234-5.
- 8 Esteller M, Fraga MF, Guo M, *et al.* DNA methylation patterns in hereditary human cancers mimic sporadic tumorigenesis. *Human molecular genetics* 2001;_10:3001-7.
- 9 Esteller M, Corn PG, Baylin SB, *et al.* A gene hypermethylation profile of human cancer. *Cancer research* 2001;_61:3225-9.
- 10 Esteller M, Guo M, Moreno V, *et al.* Hypermethylation-associated Inactivation of the Cellular Retinol-Binding-Protein 1 Gene in Human Cancer. *Cancer research* 2002;_62:5902-5.
- 11 Belshaw NJ, Elliott GO, Williams EA, *et al.* Use of DNA from human stools to detect aberrant CpG island methylation of genes implicated in colorectal cancer. *Cancer Epidemiol Biomarkers Prev* 2004;_13:1495-501.
- 12 Leung WK, To KF, Man EP, *et al.* Detection of epigenetic changes in fecal DNA as a molecular screening test for colorectal cancer: a feasibility study. *Clinical chemistry* 2004;_50:2179-82.

- 13 Muller HM, Oberwalder M, Fiegl H, *et al.* Methylation changes in faecal DNA: a marker for colorectal cancer screening? *Lancet* 2004;_363:1283-5.
- 14 Petko Z, Ghiassi M, Shuber A, *et al.* Aberrantly methylated CDKN2A, MGMT, and MLH1 in colon polyps and in fecal DNA from patients with colorectal polyps. *Clin Cancer Res* 2005;_11:1203-9.
- 15 Lenhard K, Bommer GT, Asutay S, *et al.* Analysis of promoter methylation in stool: a novel method for the detection of colorectal cancer. *Clin Gastroenterol Hepatol* 2005;_3:142-9.
- 16 Puig P, Urgell E, Capella G, *et al.* A highly sensitive method for K-ras mutation detection is useful in diagnosis of gastrointestinal cancer. *International journal of cancer* 2000;_85:73-7.
- 17 Puig P, Urgell E, Capella G, *et al.* Improved detection of K-ras codon 12 mutations in fecal exfoliated cells. *Laboratory investigation; a journal of technical methods and pathology* 1999;_79:617-8.
- 18 Herman JG, Graff JR, Myohanen S, *et al.* Methylation-specific PCR: a novel PCR assay for methylation status of CpG islands. *Proceedings of the National Academy of Sciences of the United States of America* 1996;_93:9821-6.
- 19 Herman JG, Umar A, Polyak K, *et al.* Incidence and functional consequences of hMLH1 promoter hypermethylation in colorectal carcinoma. *Proceedings of the National Academy of Sciences of the United States of America* 1998;_95:6870-5.
- 20 Esteller M, Sparks A, Toyota M, *et al.* Analysis of adenomatous polyposis coli promoter hypermethylation in human cancer. *Cancer research* 2000;_60:4366-71.
- 21 Esteller M, Avizienyte E, Corn PG, *et al.* Epigenetic inactivation of LKB1 in primary tumors associated with the Peutz-Jeghers syndrome. *Oncogene* 2000;_19:164-8.
- 22 Frigola J, Song J, Stirzaker C, *et al.* Epigenetic remodeling in colorectal cancer results in coordinate gene suppression across an entire chromosome band. *Nature genetics* 2006;_38:540-9.
- 23 Osborn NK, Ahlquist DA. Stool screening for colorectal cancer: molecular approaches. *Gastroenterology* 2005;_128:192-206.

- 24 Song K, Fendrick AM, Ladabaum U. Fecal DNA testing compared with conventional colorectal cancer screening methods: a decision analysis. *Gastroenterology* 2004;_126:1270-9.
- 25 Ahlquist DA, Shuber AP. Stool screening for colorectal cancer: evolution from occult blood to molecular markers. *Clinica chimica acta; international journal of clinical chemistry* 2002;_315:157-68.
- 26 Traverso G, Shuber A, Olsson L, *et al.* Detection of proximal colorectal cancers through analysis of faecal DNA. *Lancet* 2002;_359:403-4.
- 27 Brenner DE, Rennert G. Fecal DNA biomarkers for the detection of colorectal neoplasia: attractive, but is it feasible? *Journal of the National Cancer Institute* 2005;_97:1107-9.
- 28 Ahlquist DA, Skoletsky JE, Boynton KA, *et al.* Colorectal cancer screening by detection of altered human DNA in stool: feasibility of a multitarget assay panel. *Gastroenterology* 2000;_119:1219-27.
- 29 Imperiale TF, Ransohoff DF, Itzkowitz SH, *et al.* Fecal DNA versus fecal occult blood for colorectal-cancer screening in an average-risk population. *The New England journal of medicine* 2004;_351:2704-14.
- 30 Whitney D, Skoletsky J, Moore K, *et al.* Enhanced retrieval of DNA from human fecal samples results in improved performance of colorectal cancer screening test. *J Mol Diagn* 2004;_6:386-95.
- 31 Loktionov A, O'Neill IK, Silvester KR, *et al.* Quantitation of DNA from exfoliated colonocytes isolated from human stool surface as a novel noninvasive screening test for colorectal cancer. *Clin Cancer Res* 1998;_4:337-42.
- 32 Sidransky D, Tokino T, Hamilton SR, *et al.* Identification of ras oncogene mutations in the stool of patients with curable colorectal tumors. *Science (New York, NY)* 1992;_256:102-5.
- 33 Eguchi S, Kohara N, Komuta K, *et al.* Mutations of the p53 gene in the stool of patients with resectable colorectal cancer. *Cancer* 1996;_77:1707-10.
- 34 Esteller M. Epigenetics in cancer. *The New England journal of medicine* 2008;_358:1148-59.

- 35 Zou H, Harrington JJ, Shire AM, *et al.* Highly methylated genes in colorectal neoplasia: implications for screening. *Cancer Epidemiol Biomarkers Prev* 2007; **16**:2686-96.
- 36 Zitt M, Zitt M, Muller HM. DNA methylation in colorectal cancer--impact on screening and therapy monitoring modalities? *Disease markers* 2007; **23**:51-71.
- 37 Leung WK, To KF, Man EP, *et al.* Quantitative detection of promoter hypermethylation in multiple genes in the serum of patients with colorectal cancer. *Am J Gastroenterol* 2005; **100**:2274-9.
- 38 Nakayama G, Hibi K, Kodera Y, *et al.* P16 methylation in serum as a potential marker for the malignancy of colorectal carcinoma. *Anticancer Res* 2007; **27**:3367-70.
- 39 Zou HZ, Yu BM, Wang ZW, *et al.* Detection of aberrant p16 methylation in the serum of colorectal cancer patients. *Clin Cancer Res* 2002; **8**:188-91.
- 40 Leung WK, To KF, Man EP, *et al.* Detection of hypermethylated DNA or cyclooxygenase-2 messenger RNA in fecal samples of patients with colorectal cancer or polyps. *The American journal of gastroenterology* 2007; **102**:1070-6.
- 41 Cottrell SE, Laird PW. Sensitive detection of DNA methylation. *Annals of the New York Academy of Sciences* 2003; **983**:120-30.
- 42 Mikeska T, Bock C, El-Maarri O, *et al.* Optimization of quantitative MGMT promoter methylation analysis using pyrosequencing and combined bisulfite restriction analysis. *J Mol Diagn* 2007; **9**:368-81.
- 43 Kristensen LS, Mikeska T, Krypuy M, *et al.* Sensitive Melting Analysis after Real Time- Methylation Specific PCR (SMART-MSP): high-throughput and probe-free quantitative DNA methylation detection. *Nucleic acids research* 2008; **36**:e42.
- 44 Lieberman DA, Weiss DG, Bond JH, *et al.* Use of colonoscopy to screen asymptomatic adults for colorectal cancer. Veterans Affairs Cooperative Study Group 380. *The New England journal of medicine* 2000; **343**:162-8.
- 45 Imperiale TF, Wagner DR, Lin CY, *et al.* Risk of advanced proximal neoplasms in asymptomatic adults according to the distal colorectal findings. *The New England journal of medicine* 2000; **343**:169-74.
- 46 Ore L, Hagoel L, Lavi I, *et al.* Screening with faecal occult blood test (FOBT) for colorectal cancer: assessment of two methods that attempt to improve compliance. *Eur J Cancer Prev* 2001; **10**:251-6.

47. Shields HM, Weiner MS, Henry DR, *et al.* Factors that influence the decision to do an adequate evaluation of a patient with a positive stool for occult blood. *The American journal of gastroenterology* 2001; **96**:196-203.
48. Markovitz Sanford, D (UNIV CASE WESTERN RESERVE) Methods and compositions for detecting cancers. EP1551437, July 13, 2005. App. 20030757461, June 5, 2003.
49. Hoon Dave S B *et al.* (WAYNE JOHN CANCER INST). DNA Markers for management of Cancer. WO2004086949, October 14, 2004.
50. Lofton-Day Cathy *et al.* (EPIGENOMICS AG; LOFTON-DAY CATHY). Methods and nucleic acids for the analysis of colon cell proliferative disorders. WO2005001140, January 6, 2005.
51. Todd Alison Velyian *et al.* (Johnson & Johnson Res Pty LTD). Method for detection of alkylated cytosine in DNA. EP1644519, April 12, 2006. Appl. 20040737521, July 5, 2004.
52. Lofton-Day Cathy *et al.* (EPIGENOMICS AG; LOFTON-DAY CATHY; EBERT MATHIAS). Methods and nucleic acids for the detection of metastasis of colon cell proliferative disorders. WO 2006002344, January 5, 2006.
53. Shuber Anthony P. Methods for detecting hypermethylated nucleic acid in heterogeneous biological samples. US6818404, May 8, 2003. Appl. US20020123071, April 11, 2002.

REIVINDICACIONES

1. Método in vitro para diagnosticar cáncer colorectal que comprende:
 - a. obtener una muestra biológica de un sujeto; y
 - b. determinar en la muestra biológica el estado de metilación del promotor de al menos uno de los siguientes genes: APC, RARB2 y p14.
2. Método, según la reivindicación 1, caracterizado porque el paso b) comprende determinar adicionalmente en la muestra biológica el estado de metilación del promotor de al menos un gen seleccionado entre p16 y MGMT.
3. Método, según la reivindicación 1, caracterizado porque el paso b) comprende determinar en la muestra biológica el estado de metilación de los promotores de los genes APC, RARB2, p16, MGMT y p14.
4. Método, según cualquiera de las reivindicaciones anteriores, caracterizado porque la muestra biológica es una muestra de heces.
5. Método, según la reivindicación anterior, caracterizado porque la determinación de la metilación se lleva a cabo en ADN fecal.
6. Método, según cualquiera de las reivindicaciones anteriores, caracterizado porque la determinación de la metilación se lleva a cabo mediante el análisis de la curva de disociación.
7. Kit de diagnóstico de cáncer colorectal, para llevar a cabo el método de las reivindicaciones 1-6, caracterizado porque comprende un set de cebadores adecuado para la determinación en una muestra biológica del estado de metilación del promotor de al menos uno de los genes APC, RARB2 y p14.

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

1/2

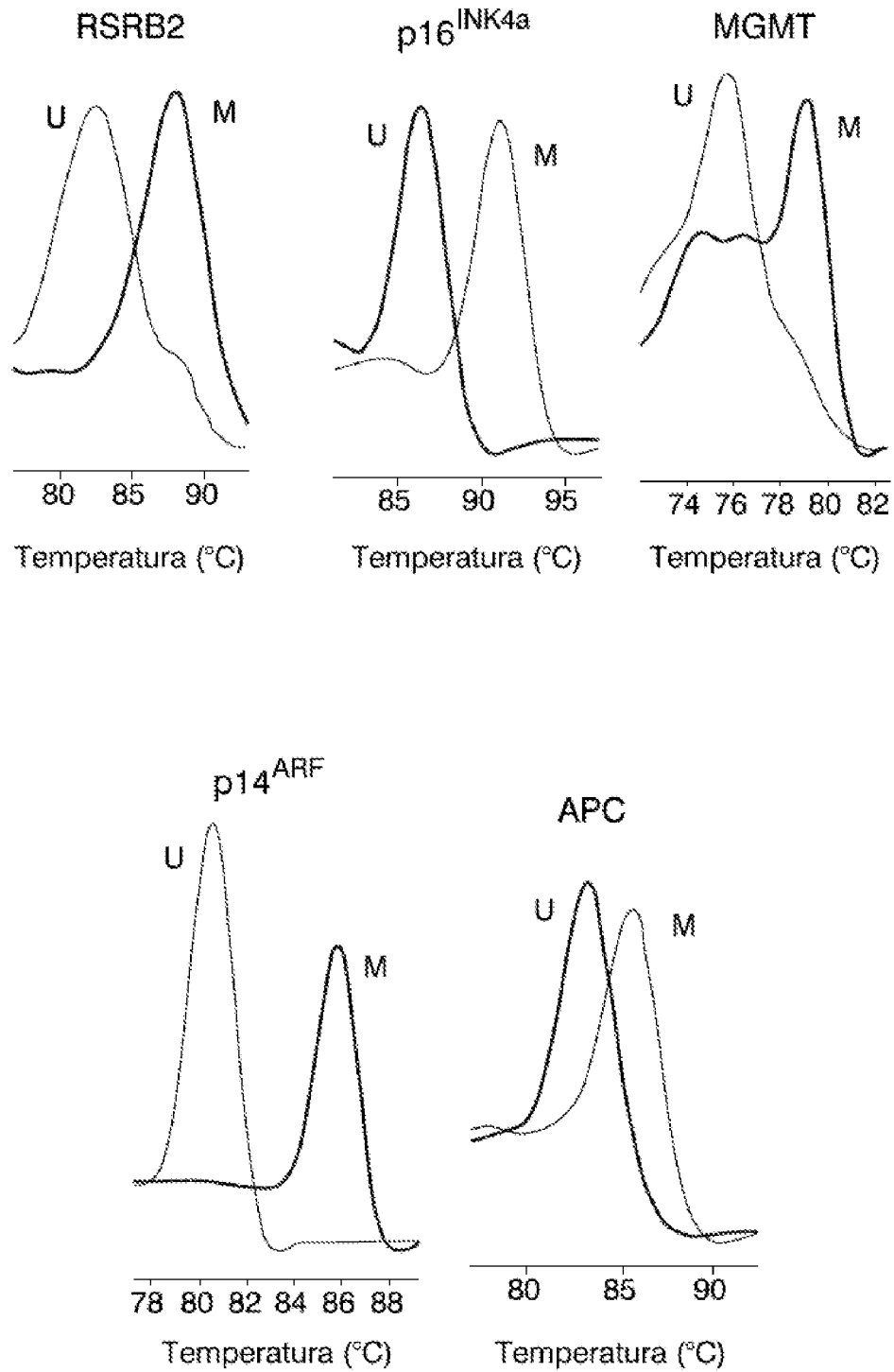


FIG. 1

2/2

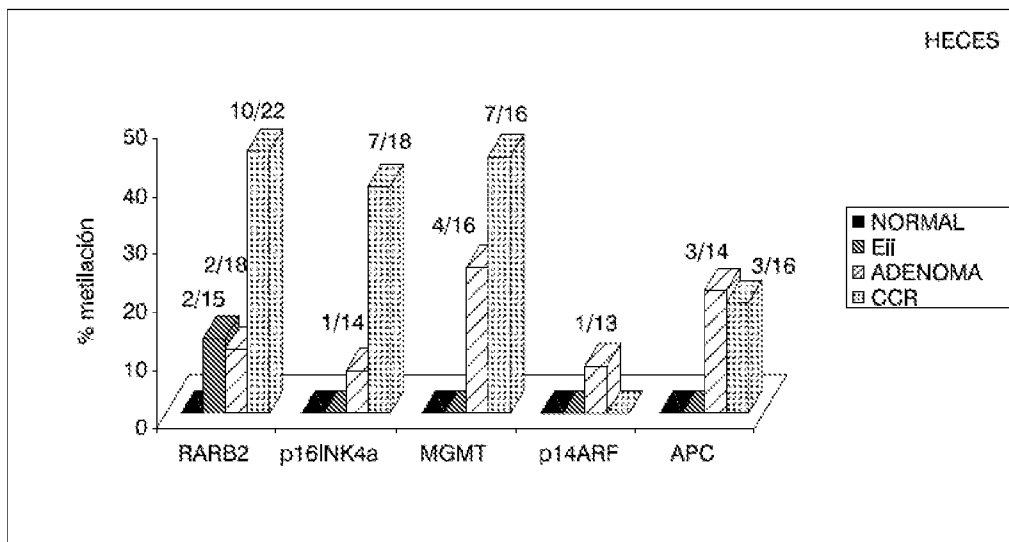


FIG. 2a

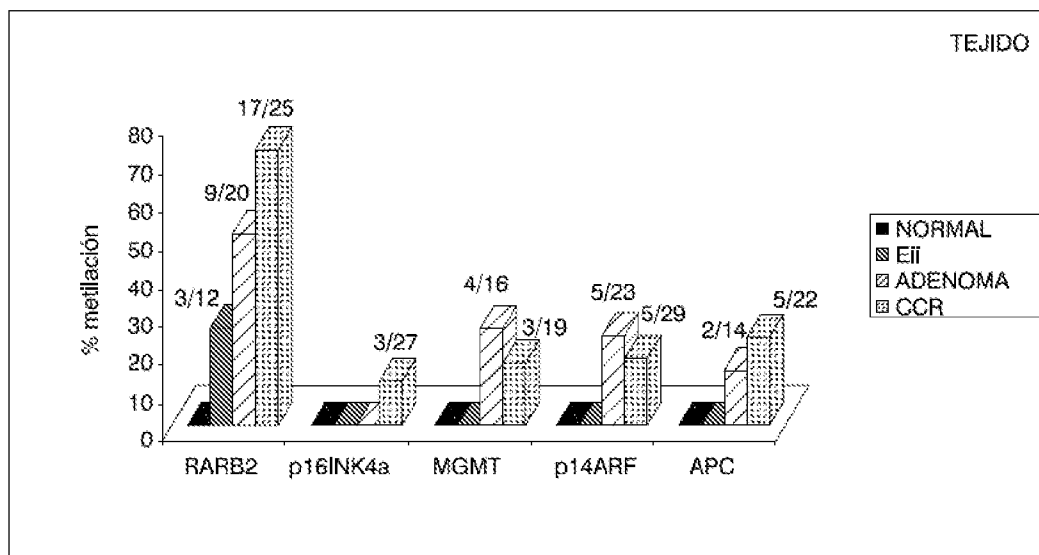


FIG. 2b

INTERNATIONAL SEARCH REPORT

International application No.
PCT/ ES 2009/070479

A. CLASSIFICATION OF SUBJECT MATTER

C12Q 1/68 (2006.01)

According to International Patent Classification (IPC) or to both national classification and IPC

B. FIELDS SEARCHED

Minimum documentation searched (classification system followed by classification symbols)

C12Q

Documentation searched other than minimum documentation to the extent that such documents are included in the fields searched

Electronic data base consulted during the international search (name of data base and, where practicable, search terms used)

INVENES, EPODOC, WPI, BIOSIS, EMBASE, MEDLINE, EMBL-EBI

C. DOCUMENTS CONSIDERED TO BE RELEVANT

Category*	Citation of document, with indication, where appropriate, of the relevant passages	Relevant to claim No.
X	GRADY, W.M. et al., "Genomic and epigenetic instability in colorectal cancer pathogenesis.", GASTROENTEROLOGY, 2008 Oct, Vol. 135, No. 4, pages 1079-1099, ISSN: 0016-5085, Epub: 04.09.2008, pages 1091-1094, ('Epigenetic alterations and Epigenetic instability'), Conclusions.	1-9
X	AHMED, F.E., "Colorectal cancer epigenetics: the role of environmental factors and the search for molecular biomarkers.", JOURNAL OF ENVIRONMENTAL SCIENCE AND HEALTH PART C ENVIRONMENTAL CARCINOGENESIS & ECOTOXICOLOGY REVIEWS, 2007, Vol. 25, No. 2, pages 101-54, ISSN 1059-0501, pages 105-116 ('Epigenetic modifications in colorectal cancer').	1-9

☒ Further documents are listed in the continuation of Box C.

☒ See patent family annex.

* Special categories of cited documents:	"T" later document published after the international filing date or priority date and not in conflict with the application but cited to understand the principle or theory underlying the invention
"A" document defining the general state of the art which is not considered to be of particular relevance.	
"E" earlier document but published on or after the international filing date	
"L" document which may throw doubts on priority claim(s) or which is cited to establish the publication date of another citation or other special reason (as specified)	"X" document of particular relevance; the claimed invention cannot be considered novel or cannot be considered to involve an inventive step when the document is taken alone
"O" document referring to an oral disclosure use, exhibition, or other means	"Y" document of particular relevance; the claimed invention cannot be considered to involve an inventive step when the document is combined with one or more other documents, such combination being obvious to a person skilled in the art
"P" document published prior to the international filing date but later than the priority date claimed	
	"&" document member of the same patent family

Date of the actual completion of the international search

10.February.2010 (10.02.2010)

Date of mailing of the international search report

(22/02/2010)

Name and mailing address of the ISA/
O.E.P.M.

Paseo de la Castellana, 75 28071 Madrid, España.
Facsimile No. 34 91 3495304

Authorized officer

J.L. Vizán Arroyo

Telephone No. +34 91 349 85 73

INTERNATIONAL SEARCH REPORT

International application No.

PCT/ES 2009/070479

C (continuation).

DOCUMENTS CONSIDERED TO BE RELEVANT

Category*	Citation of documents, with indication, where appropriate, of the relevant passages	Relevant to claim No.
X	XU, X.L. et al., "Methylation profile of the promoter CpG islands of 31 genes that may contribute to colorectal carcinogenesis.", WORLD JOURNAL OF GASTROENTEROLOGY, 2004, Vol. 10, No. 23, pages 3441-3454, ISSN: 1007-9327, Materials and Methods, Table 3; Results, figures 1 and 2.	1-9
X	BELSHAW, N.J. et al., "Use of DNA from human stools to detect aberrant CpG island methylation of genes implicated in colorectal cancer.", CANCER, EPIDEMIOLOGY, BIOMARKERS & PREVENTION, 2004, Vol.13, pages 1495-501, ISSN: 1055-9965, Results, Tables 3 and 4.	1-9
X	LIND, G.E. et al., "A CpG island hypermethylation profile of primary colorectal carcinomas and colon cancer cell lines.", MOLECULAR CANCER, 2004, Vol. 3, No. 28, pages 1-11, ISSN: 1476-4598, Results, Table 2.	1-9
X	LEE, S. et al., "Aberrant CpG island hypermethylation of multiple genes in colorectal neoplasia.", LABORATORY INVESTIGATION, 2004, Vol. 84, No. 7, pages 884-893, ISSN: 0023-6837, Materials and Methods; Results.	1-9
X	ESTELLER, M. et al., "Analysis of adenomatous polyposis coli promoter hypermethylation in human cancer.", CANCER RESEARCH, 2000, Vol. 60, No. 16, pages 4366-4371, ISSN: 0008-5472, Materials and Methods; Results.	1-9
A	US 2007/0298431 A1 (MAI) 27.12.2007, the whole document.	1-9
A	WO 2006/119434 A2 (UNIV. SOUTHERN CALIFORNIA) 09.11.2006, the whole document.	1-9

INTERNATIONAL SEARCH REPORT

International application No.

PCT/ES 2009/070479

Box No. II Observations where certain claims were found unsearchable (Continuation of item 2 of first sheet)

This international search report has not been established in respect of certain claims under Article 17(2)(a) for the following reasons:

1. ☐ Claims Nos.:
because they relate to subject matter not required to be searched by this Authority, namely:
2. ☐ Claims Nos.:
because they relate to parts of the international application that do not comply with the prescribed requirements to such an extent that no meaningful international search can be carried out, specifically:
3. ☐ Claims Nos.:
because they are dependent claims and are not drafted in accordance with the second and third sentences of Rule 6.4(a).

Box No. III Observations where unity of invention is lacking (Continuation of item 3 of first sheet)

This International Searching Authority found multiple inventions in this international application, as follows:

SEE ADDITIONAL SHEET PCT/ISA/210

1. ☐ As all required additional search fees were timely paid by the applicant, this international search report covers all searchable claims.
2. ☐ As all searchable claims could be searched without effort justifying additional fees, this Authority did not invite payment of additional fees.
3. ☐ As only some of the required additional search fees were timely paid by the applicant, this international search report covers only those claims for which fees were paid, specifically claims Nos.:
4. ☒ No required additional search fees were timely paid by the applicant. Consequently, this international search report is restricted to the invention first mentioned in the claims; it is covered by claims Nos.: 1-9

Remark on Protest

- ☐ The additional search fees were accompanied by the applicant's protest and, where applicable, the payment of a protest fee.
- ☐ The additional search fees were accompanied by the applicant's protest but the applicable protest fee was not paid within the time limit specified in the invitation.
- ☐ No protest accompanied the payment of additional search fees.

Box III

The application does not meet the requirement of unity of invention as specified in PCT Article 3(4)(iii) and PCT Rule 13 and contains the following inventions or groups of inventions:

1) Invention 1: [claims 1-9 (all in part)], relating to an in vitro method for diagnosing colorectal cancer, involving determining in a biological sample the methylation state of the promoter of the APC gene (access n° NCBI: M74088.1) or of a set of promoters selected from the genes APC, RARB2 (access n° NCBI: Y00291.1) and p14 (access n° NCBI: L27211.1). Also relating to an in vitro method for diagnosing colorectal cancer involving determining in a biological sample the methylation state of the promoter of the APC gene or of a set of promoters selected from the genes APC, RARB2, p14, p16 (access n° NCBI: L27211.1) and MGMT (access n° NCBI: M29971.1). Also relating to a kit for diagnosing colorectal cancer, comprising a set of primers suitable for determining in a biological sample the state of methylation of the promoter of the APC gene or of a set of promoters selected from the genes APC, RARB2 and p14. Also relating to a kit for diagnosing colorectal cancer comprising a set of primers suitable for determining in a biological sample the state of methylation of the promoter of the APC gene or of a set of promoters selected from the genes APC, RARB2, p14, p16 and MGMT.

2) Invention 2: [claims 1-9 (all in part)], relating to an in vitro method for diagnosing colorectal cancer, involving determining in a biological sample the methylation state of the promoter of the RARB2 gene (access n° NCBI: Y00291.1) or of a set of promoters selected from the genes RARB2, APC (access n° NCBI: M74088.1) and p14 (access n° NCBI: L27211.1). Also relating to an in vitro method for diagnosing colorectal cancer involving determining in a biological sample the methylation state of the promoter of the RARB2 gene or of a set of promoters selected from the genes RARB2, APC, p14, p16 (access n° NCBI: L27211.1) and MGMT (access n° NCBI: M29971.1). Also relating to a kit for diagnosing colorectal cancer, comprising a set of primers suitable for determining in a biological sample the state of methylation of the promoter of the RARB2 gene or of a set of promoters selected from the genes RARB2, APC and p14. Also relating to a kit for diagnosing colorectal cancer comprising a set of primers suitable for determining in a biological sample the state of methylation of the promoter of the RARB2 gene or of a set of promoters selected from the genes RARB2, APC, p14, p16 and MGMT.

3) Invention 3: [claims 1-9 (all in part)], relating to an in vitro method for diagnosing colorectal cancer, involving determining in a biological sample the methylation state of the promoter of the p14 gene (access n° NCBI: L27211.1) or of a set of promoters selected from the genes p14, APC (access n° NCBI: M74088.1) and RARB2 (access n° NCBI: Y00291.1) and p14 (access n° NCBI: L27211.1). Also relating to an in vitro method for diagnosing colorectal cancer involving determining in a biological sample the methylation state of the promoter of the p14 gene or of a set of promoters selected from the genes p14, APC, RARB2, p16 (access n° NCBI: L27211.1) and MGMT (access n° NCBI: M29971.1). Also relating to a kit for diagnosing colorectal cancer, comprising a set of primers suitable for determining in a biological sample the state of methylation of the promoter of the p14 gene or of a set of promoters selected from the genes p14, APC and RARB2. Also relating to a kit for diagnosing colorectal cancer comprising a set of primers suitable for determining in a biological sample the state of methylation of the promoter of the p14 gene or of a set of promoters selected from the genes p14, APC, RARB2, p16 and MGMT.

INTERNATIONAL SEARCH REPORT

Information on patent family members

International application No.

PCT/ ES 2009/070479

Patent document cited in the search report	Publication date	Patent family member(s)	Publication date
US 2007298431 A	27.12.2007	NONE	-----
-----	-----	-----	-----
WO 2006119434 A	09.11.2006	EP 1885884 A	13.02.2008
		EP 20060759047	02.05.2006
		US 2009053706 A	26.02.2009
-----	-----	-----	-----

INFORME DE BÚSQUEDA INTERNACIONAL

Solicitud internacional N°

PCT/ ES 2009/070479

A. CLASIFICACIÓN DEL OBJETO DE LA SOLICITUD

C12Q 1/68 (2006.01)

De acuerdo con la Clasificación Internacional de Patentes (CIP) o según la clasificación nacional y CIP.

B. SECTORES COMPRENDIDOS POR LA BÚSQUEDA

Documentación mínima buscada (sistema de clasificación seguido de los símbolos de clasificación)

C12Q

Otra documentación consultada, además de la documentación mínima, en la medida en que tales documentos formen parte de los sectores comprendidos por la búsqueda

Bases de datos electrónicas consultadas durante la búsqueda internacional (nombre de la base de datos y, si es posible, términos de búsqueda utilizados)

INVENES, EPODOC, WPI, BIOSIS, EMBASE, MEDLINE, EMBL-EBI

C. DOCUMENTOS CONSIDERADOS RELEVANTES

Categoría*	Documentos citados, con indicación, si procede, de las partes relevantes	Relevante para las reivindicaciones N°
X	GRADY, W.M. et al., "Genomic and epigenetic instability in colorectal cancer pathogenesis.", GASTROENTEROLOGY, 2008 Oct, Vol. 135, No. 4, páginas 1079-1099, ISSN: 0016-5085, Epub: 04.09.2008, páginas 1091-1094, ('Epigenetic alterations and Epigenetic instability'), Conclusiones.	1-9
X	AHMED, F.E., "Colorectal cancer epigenetics: the role of environmental factors and the search for molecular biomarkers.", JOURNAL OF ENVIRONMENTAL SCIENCE AND HEALTH PART C ENVIRONMENTAL CARCINOGENESIS & ECOTOXICOLOGY REVIEWS, 2007, Vol. 25, No. 2, páginas 101-54, ISSN 1059-0501, páginas 105-116 ('Epigenetic modifications in colorectal cancer').	1-9

☒ En la continuación del Recuadro C se relacionan otros documentos ☒ Los documentos de familias de patentes se indican en el Anexo

* Categorías especiales de documentos citados:	"T" documento ulterior publicado con posterioridad a la fecha de presentación internacional o de prioridad que no pertenece al estado de la técnica pertinente pero que se cita por permitir la comprensión del principio o teoría que constituye la base de la invención.
"A" documento que define el estado general de la técnica no considerado como particularmente relevante.	"X" documento particularmente relevante; la invención reivindicada no puede considerarse nueva o que implique una actividad inventiva por referencia al documento aisladamente considerado.
"E" solicitud de patente o patente anterior pero publicada en la fecha de presentación internacional o en fecha posterior.	"Y" documento particularmente relevante; la invención reivindicada no puede considerarse que implique una actividad inventiva cuando el documento se asocia a otro u otros documentos de la misma naturaleza, cuya combinación resulta evidente para un experto en la materia.
"L" documento que puede plantear dudas sobre una reivindicación de prioridad o que se cita para determinar la fecha de publicación de otra cita o por una razón especial (como la indicada).	"&" documento que forma parte de la misma familia de patentes.
"O" documento que se refiere a una divulgación oral, a una utilización, a una exposición o a cualquier otro medio.	
"P" documento publicado antes de la fecha de presentación internacional pero con posterioridad a la fecha de prioridad reivindicada.	

Fecha en que se ha concluido efectivamente la búsqueda internacional.

10.Febrero.2010 (10.02.2010)

Fecha de expedición del informe de búsqueda internacional

22-FEBRERO-2010 (22/02/2010)

Nombre y dirección postal de la Administración encargada de la búsqueda internacional

O.E.P.M.

Paseo de la Castellana, 75 28071 Madrid, España.

N° de fax 34 91 3495304

Funcionario autorizado

J.L. Vizán Arroyo

N° de teléfono +34 91 349 85 73

INFORME DE BÚSQUEDA INTERNACIONAL

Solicitud internacional N°
PCT/ES 2009/070479

C (continuación). DOCUMENTOS CONSIDERADOS RELEVANTES		
Categoría*	Documentos citados, con indicación, si procede, de las partes relevantes	Relevante para las reivindicaciones N°
X	XU, X.L. et al., "Methylation profile of the promoter CpG islands of 31 genes that may contribute to colorectal carcinogenesis.", WORLD JOURNAL OF GASTROENTEROLOGY, 2004, Vol. 10, No. 23, páginas 3441-3454, ISSN: 1007-9327, Materiales y Métodos, Tabla 3; Resultados, Figuras 1 y 2.	1-9
X	BELSHAW, N.J. et al., "Use of DNA from human stools to detect aberrant CpG island methylation of genes implicated in colorectal cancer.", CANCER, EPIDEMIOLOGY, BIOMARKERS & PREVENTION, 2004, Vol.13, páginas 1495-501, ISSN: 1055-9965, Resultados, Tablas 3 y 4.	1-9
X	LIND, G.E. et al., "A CpG island hypermethylation profile of primary colorectal carcinomas and colon cancer cell lines.", MOLECULAR CANCER, 2004, Vol. 3, No. 28, páginas 1-11, ISSN: 1476-4598, Resultados, Tablas 2.	1-9
X	LEE, S. et al., "Aberrant CpG island hypermethylation of multiple genes in colorectal neoplasia.", LABORATORY INVESTIGATION, 2004, Vol. 84, No. 7, páginas 884-893, ISSN: 0023-6837, Materiales y Métodos; Resultados.	1-9
X	ESTELLER, M. et al., "Analysis of adenomatous polyposis coli promoter hypermethylation in human cancer.", CANCER RESEARCH, 2000, Vol. 60, No. 16, páginas 4366-4371, ISSN: 0008-5472, Materiales y Métodos; Resultados.	1-9
A	US 2007/0298431 A1 (MAI) 27.12.2007, todo el documento.	1-9
A	WO 2006/119434 A2 (UNIV. SOUTHERN CALIFORNIA) 09.11.2006, todo el documento.	1-9

INFORME DE BÚSQUEDA INTERNACIONAL

Solicitud internacional N°

PCT/ ES 2009/070479

Recuadro II Observaciones cuando se estime que algunas reivindicaciones no pueden ser objeto de búsqueda (continuación del punto 2 de la primera hoja)

Este informe de búsqueda internacional no se ha realizado en relación a ciertas reivindicaciones según el Artículo 17.2.a) por los siguientes motivos:

1. ☐ Las reivindicaciones N°s:
se refieren a un objeto con respecto al cual esta Administración no está obligada a proceder a la búsqueda, a saber:
2. ☐ Las reivindicaciones N°s:
se refieren a elementos de la solicitud internacional que no cumplen con los requisitos establecidos, de tal modo que no pueda efectuarse una búsqueda provechosa, concretamente:
3. ☐ Las reivindicaciones N°s:
son reivindicaciones dependientes y no están redactadas de conformidad con los párrafos segundo y tercero de la Regla 6.4.a).

Recuadro III Observaciones cuando falta unidad de invención (continuación del punto 3 de la primera hoja)

La Administración encargada de la búsqueda internacional ha detectado varias invenciones en la presente solicitud internacional, a saber:

VER HOJA ADICIONAL PCT/ISA/210

1. ☐ Dado que todas las tasas adicionales requeridas han sido satisfechas por el solicitante dentro del plazo, el presente informe de búsqueda de tipo internacional comprende todas las reivindicaciones que pueden ser objeto de búsqueda.
2. ☐ Dado que todas las reivindicaciones que pueden ser objeto de búsqueda podrían serlo sin realizar un esfuerzo que justifique tasas adicionales, esta Administración no requirió el pago de tasas adicionales.
3. ☐ Dado que tan sólo una parte de las tasas adicionales requeridas ha sido satisfecha dentro del plazo por el solicitante, el presente informe de búsqueda de tipo internacional comprende solamente aquellas reivindicaciones respecto de las cuales han sido satisfechas las tasas, concretamente las reivindicaciones N°s:
4. ☒ Ninguna de las tasas adicionales requeridas ha sido satisfecha por el solicitante dentro de plazo. En consecuencia, el presente informe de búsqueda de tipo internacional se limita a la invención mencionada en primer término en las reivindicaciones, cubierta por las reivindicaciones N°s: 1-9 (todas parcialmente)

Indicación en cuanto a la protesta

- ☐ Se acompañó a las tasas adicionales la protesta del solicitante y, en su caso, el pago de una tasa de protesta.
- ☐ Se acompañó a las tasas adicionales la protesta del solicitante, pero la tasa de protesta aplicable no se pagó en el plazo establecido en el requerimiento.
- ☐ El pago de las tasas adicionales no ha sido acompañado de ninguna protesta.

Continuación del Recuadro III:

La solicitud de patente no satisface el requerimiento de unidad de invención establecido en el Artículo 3(4)III y la Regla 13 PCT y abarca las siguientes invenciones o grupos de invenciones:

- 1) **Invención 1:** [Reivindicaciones: 1-9 (todas parcialmente)]. Relativa a un método *in vitro* para diagnosticar cáncer colorectal que comprende determinar en una muestra biológica el estado de metilación del promotor del gen APC (n° acceso NCBI: M74088.1) o de un conjunto de promotores elegido de los genes APC, RARB2 (n° acceso NCBI: Y00291.1) y p14 (n° acceso NCBI: L27211.1). A un método *in vitro* para diagnosticar cáncer colorectal que comprende determinar en una muestra biológica el estado de metilación del promotor del gen APC o de un conjunto de promotores elegido de los genes APC, RARB2, p14, p16 (n° acceso NCBI: L27211.1) y MGMT (n° acceso NCBI: M29971.1). Kit de diagnóstico de cáncer colorectal que comprende un conjunto de cebadores adecuado para la determinación en una muestra biológica del estado de metilación del promotor del gen APC o de un conjunto de promotores elegido de los genes APC, RARB2 y p14. Kit de diagnóstico de cáncer colorectal que comprende un conjunto de cebadores adecuado para la determinación en una muestra biológica del estado de metilación del promotor del gen APC o de un conjunto de promotores elegido de los genes APC, RARB2, p14, p16 y MGMT.
- 2) **Invención 2:** [Reivindicaciones: 1-9 (todas parcialmente)]. Relativa a un método *in vitro* para diagnosticar cáncer colorectal que comprende determinar en una muestra biológica el estado de metilación del promotor del gen RARB2 (n° acceso NCBI: Y00291.1) o de un conjunto de promotores elegido de los genes RARB2, APC (n° acceso NCBI: M74088.1) y p14 (n° acceso NCBI: L27211.1). A un método *in vitro* para diagnosticar cáncer colorectal que comprende determinar en una muestra biológica el estado de metilación del promotor del gen RARB2 o de un conjunto de promotores elegido de los genes RARB2, APC, p14, p16 (n° acceso NCBI: L27211.1) y MGMT (n° acceso NCBI: M29971.1). Kit de diagnóstico de cáncer colorectal que comprende un conjunto de cebadores adecuado para la determinación en una muestra biológica del estado de metilación del promotor del gen RARB2 o de un conjunto de promotores elegido de los genes RARB2, APC y p14. Kit de diagnóstico de cáncer colorectal que comprende un conjunto de cebadores adecuado para la determinación en una muestra biológica del estado de metilación del promotor del gen RARB2 o de un conjunto de promotores elegido de los genes RARB2, APC, p14, p16 y MGMT.
- 3) **Invención 3:** [Reivindicaciones: 1-9 (todas parcialmente)]. Relativa a un método *in vitro* para diagnosticar cáncer colorectal que comprende determinar en una muestra biológica el estado de metilación del promotor del gen p14 (n° acceso NCBI: L27211.1) o de un conjunto de promotores elegido de los genes p14, APC (n° acceso NCBI: M74088.1) y RARB2 (n° acceso NCBI: Y00291.1) y p14 (n° acceso NCBI: L27211.1). A un método *in vitro* para diagnosticar cáncer colorectal que comprende determinar en una muestra biológica el estado de metilación del promotor del gen p14 o de un conjunto de promotores elegido de los genes p14, APC, RARB2, p16 (n° acceso NCBI: L27211.1) y MGMT (n° acceso NCBI: M29971.1). Kit de diagnóstico de cáncer colorectal que comprende un conjunto de cebadores adecuado para la determinación en una muestra biológica del estado de metilación del promotor del gen p14 o de un conjunto de promotores elegido de los genes p14, APC y RARB2. Kit de diagnóstico de cáncer colorectal que comprende un conjunto de cebadores adecuado para la determinación en una muestra biológica del estado de metilación del promotor del gen p14 o de un conjunto de promotores elegido de los genes p14, APC, RARB2, p16 y MGMT.

_____xxxXXXXxx_____

INFORME DE BÚSQUEDA INTERNACIONAL

Información relativa a miembros de familias de patentes

Solicitud internacional N°

PCT/ES 2009/070479

Documento de patente citado en el informe de búsqueda	Fecha de Publicación	Miembro(s) de la familia de patentes	Fecha de Publicación
US 2007298431 A	27.12.2007	NINGUNO	-----
-----	-----	-----	-----
WO 2006119434 A	09.11.2006	EP 1885884 A	13.02.2008
		EP 20060759047	02.05.2006
		US 2009053706 A	26.02.2009
-----	-----	-----	-----