



República Federativa do Brasil
Ministério da Economia
Instituto Nacional da Propriedade Industrial

(21) BR 112020023274-2 A2



(22) Data do Depósito: 23/05/2019

(43) Data da Publicação Nacional: 23/02/2021

(54) **Título:** KIT PARA RASTREAMENTO DE CÂNCER COLORRETAL E ADENOMA AVANÇADO E SUA APLICAÇÃO

(51) **Int. Cl.:** C07H 21/04; C12N 15/09; C12N 15/11; C12P 19/34; C12Q 1/02; (...).

(30) **Prioridade Unionista:** 23/05/2018 CN 201810502359.7; 23/05/2018 CN 201810502387.9.

(71) **Depositante(es):** HANGZHOU NEW HORIZON HEALTH TECHNOLOGY CO. LTD..

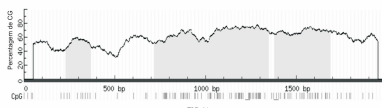
(72) **Inventor(es):** CUNYA LI; HUI LI; WEIXIAN ZHENG; JIAO YANG; GANG LIU; NING LU; YIYOU CHEN.

(86) **Pedido PCT:** PCT US2019033831 de 23/05/2019

(87) **Publicação PCT:** WO 2019/226942 de 28/11/2019

(85) **Data da Fase Nacional:** 13/11/2020

(57) **Resumo:** A presente invenção refere-se a combinações de iniciadores e sondas para a realização de PCRs quantitativas que podem ser usadas para determinar o estado e nível de metilação do gene BMP3 e de genes NDRG4 em um paciente com necessidade do mesmo, que resulta em especificidade diagnóstica surpreendentemente alta e sensibilidade para diagnosticar a presença ou a ausência de câncer colorretal (CRC) e/ou adenoma avançado (AA) em um paciente com necessidade do mesmo. A invenção apresenta composições e métodos para a realização do diagnóstico.



Relatório Descritivo da Patente de Invenção para “**KIT PARA RASTREAMENTO DE CÂNCER COLORRETAL E ADENOMA AVANÇADO E SUA APLICAÇÃO**”.

REFERÊNCIA CRUZADA A PEDIDOS DE PATENTE RELACIONADOS

[001] Este pedido reivindica prioridade do Pedido de Patente Chinês Série N° 201810502359,7, depositado em 23 de maio de 2018, e 201810502387,9, depositado em 23 de maio de 2018, cada um deles estando aqui incorporado em sua íntegra a título de referência para todos os fins.

CAMPO DA INVENÇÃO

[002] A presente invenção refere-se a composições e métodos para rastrear câncer colorretal e adenoma avançado, e outras aplicações.

DESCRIÇÃO DO ARQUIVO DE TEXTO APRESENTADO POR VIA ELETRÔNICA

[003] O teor do arquivo de texto apresentado por via eletrônica junto com este pedido encontra-se aqui incorporado em sua íntegra a título de referência: Uma cópia em formato legível em computador da Listagem de Sequências (nome do arquivo: NEWH-017_01WO_SeqList_ST25.txt, data de registro: 22 de maio de 2019, tamanho do arquivo: 22 kilobytes).

ANTECEDENTES DA INVENÇÃO

[004] Câncer colorretal (CRC) é o quarto câncer mais comum no mundo, com uma mortalidade inferior apenas ao câncer de pulmão, câncer de fígado e câncer de estômago. O número de mortes anuais causadas por CRC é de aproximadamente 700.000. O CRC é uma doença "modernizada" com incidência mais alta nos países desenvolvidos do que nos países em desenvolvimento. Nos Estados Unidos, o câncer colorretal continua sendo a segunda principal causa

de morte (Clinical Interventions in Aging 2016; 11:967–976). Com a melhora do padrão de vida das pessoas, a incidência e a mortalidade de CRC vêm aumentando na China desde 2000 (CA CANCER J CLIN 2016; 66:115–132). A expectativa de vida de 5 anos dos pacientes com a doença localizado em estágio inicial (estágio I e II) beira os 90%, enquanto que a expectativa de vida daqueles com CRC em estágio avançado é de apenas 13,1%. O custo de tratamento para pacientes com CRC em estágio avançado geralmente é enorme e só consegue aliviar os sintomas da doença (Clinical Interventions in Aging 2016; 11:967–976).

[005] O desenvolvimento de CRC é um processo lento que geralmente é assintomático e difícil de ser detectado no estágio inicial até que o tumor atinja alguns centímetros de comprimento, o que pode bloquear a passagem das fezes e resultar em cólicas, dor ou sangramento visível. O desenvolvimento de CRC passa por um processo de múltiplas etapas envolvendo uma série de alterações histológicas, morfológicas, e genéticas que se acumulam com o tempo: a saber, desde a saúde, hiperplasia, polipos pequenos, polipos grandes, e adenocarcinoma até câncer. Polipos são células anormais que crescem ou se acumulam localmente na mucosa intestinal. As células em divisão nos polipos podem acumular alterações genéticas suficientes para penetrar a parede intestinal e eventualmente evoluir para CRC. No entanto, somente um pequeno número de polipos evolui para CRC depois de mais de uma década de desenvolvimento. Dois tipos principais dos potenciais polipos malignos são adenomas pólipos serrilhados sésseis (SSPs), sendo que cada um deles se desenvolve em CRC com diferentes riscos. O risco de adenoma se desenvolver em CRC está relacionado com seu tamanho. Geralmente, os adenomas são maiores e apresentam um potencial maior para se desenvolver em CRC. Adenomas avançados (AA) referem-se a ≥ 1 cm

de tamanho ou com $\geq 25\%$ de componente viloso ou displasia de alto grau de qualquer tamanho. Embora apenas cerca de 10% da maioria dos AA se torne canceroso, 60%-70% dos CRC se desenvolvem a partir de adenomas, os 25%-35% restantes dos CRCs se desenvolvendo a partir de SSPs (Clinical Interventions in Aging 2016; 11:967–976). Por conseguinte, a descoberta precoce de CRC e AA, e a remoção das lesões, pode impedir efetivamente o progresso do CRC salvando a vida dos pacientes, melhorando significativamente a expectativa de vida de 5 anos dos pacientes, e reduzindo os altos custos de tratamento no estágio inicial do CRC, o que reduz bastante a carga econômica da família e da sociedade.

[006] Atualmente, existem vários exames para a detecção de CRC, incluindo principalmente colonoscopia, sigmoidoscopia, colonografia CT, exame de sangue oculto nas fezes (FOBT) e exame imunológico de fezes (FIT).

[007] A sensibilidade da colonoscopia para detectar CRC é de $> 95\%$. Seu intervalo de rastreamento é de 10 anos. A vantagem da colonoscopia é sua alta sensibilidade, que pode inspecionar o cólon inteiro e remover a lesão ao mesmo tempo. No entanto, cuja desvantagem é que o exame invasivo e o preparo do interno causam desconforto, e o paciente precisa ser sedado. Existe um risco de perfuração do intestino e hemorragia durante a colonoscopia. Estas limitações contribuem para a baixa colaboração do rastreamento por colonoscopia.

[008] A sensibilidade da sigmoidoscopia para investigar o cólon distal é de mais de 95%. O intervalo de rastreamento de CRC com sigmoidoscopia é de 5 anos combinado com FOBT. A vantagem do rastreamento de CRC por sigmoidoscopia é de alta sensibilidade, não precisa de sedação sistêmica, e a lesão pode ser removida simultaneamente durante o exame. Sua desvantagem é que o exame

é semi-invasivo, facilmente causando desconforto durante o exame e o custo de inspeção é alto.

[009] A colonografia CT usa radiação para visualizar o cólon, e sua sensibilidade é de >90% e ela é realizada a cada 5 anos. Sua vantagem é que ela é sua sensibilidade é tão alta que o cólon inteiro pode ser observado e não é necessário sedação. Sua desvantagem é que o ensaio é um exame semi-invasivo de modo que os pacientes podem facilmente sentirem-se desconfortáveis durante o processo de rastreamento. Além disso, as lesões não podem ser removidas ao mesmo tempo e a segurança da radiação deve ser levada em consideração.

[0010] Em geral, os exames para detectar CRC baseados em imagens apresentam alta sensibilidade, mas são caros e o preparo do intestino facilmente causa desconforto e outros efeitos colaterais. Como resultado, a colaboração do paciente é baixa. Adicionalmente, esses ensaios requerem equipamento profissional, e médicos capacitados e com bastante experiência, o que pode não estar disponível. Como consequência, a taxa geral de rastreamento/detecção é baixa. Além disso, alguns pacientes não são adequados para esses ensaios. Por exemplo, pacientes com diabetes têm um índice de sucesso mais baixo em termos de preparado do intestino e maior risco de efeitos colaterais (J Gastrointest Liver Dis 2010; 19: 369-372, World J Gastrointest Endosc 2013; 5: 39-46).

[0011] FOBT e FIT detectam hemoglobina nas fezes dos pacientes por meio de uma reação enzimática e um método imunológico, respectivamente, com uma sensibilidade de 33%-75% e 60%-85%, respectivamente, para detecção de CRC, e os exames são realizados anualmente. Embora seja fácil que o FOBT e o FIT se tornem populares, sejam não invasivos e de baixo custo, o índice de detecção de lesões pré-cancerosas é baixo (Clinical Interventions in Aging 2016;

11 967-976).

[0012] Durante o desenvolvimento de polipos em CRC, acumulam-se mutações e alterações por metilação em alguns genes tais como APC, KRAS, p53, BRAF, NDRG4, BMP3, etc. (Clinical Interventions in Aging 2016; 11:967-976). Por conseguinte, a detecção dessas mutações ou alterações por metilação ajuda a detectar CRC e lesões pré-cancerosas.

[0013] Zou et al. (Clinical Chemistry 2012; 58: 2375-383) usaram qPCR de metilação para detectar os níveis de metilação dos genes BMP3, NDRG4, VIM, e TFPI2 em amostras de tecido. No total, foram testados 37 casos de amostras de tecido de CRC, 25 amostras de tecido de adenoma e 29 amostras de tecido de humano saudável. Quando a especificidade foi de 95%, a sensibilidade dos genes BMP3, NDRG4, VIM e TFPI2 para detectar CRC foi de 84%, 92%, 86%, e 92%, respectivamente, e a sensibilidade para detectar adenoma foi de 68%, 76%, 76%, e 88%, respectivamente. Foi demonstrado que a detecção de metilação de genes em tecidos de câncer de cólon tem alta sensibilidade e especificidade. No entanto, o método de amostragem de tecido é difícil de ser amplamente usado, pois o processo de amostragem resulta em alguns danos ao corpo do paciente. Portanto, ele não é adequado para rastrear CRC e lesões pré-cancerosas na população em geral.

[0014] A testagem de DNA de fezes multialvo (mt-sDNA) inclui a detecção de metilação e mutação de células exfoliadas tumorais e a detecção de hemoglobina em amostras de fezes, que é realizada a cada 3 anos e apresenta as vantagens de ter alta sensibilidade, ser não invasivo e fácil de tornar popular (Clinical Interventions In Aging 2016;11:967–976). Como método de rastreamento, o mt-sDNA consegue detectar CRC e AA precocemente o que melhora bastante a expectativa de vida dos pacientes. Imperiale et al. (N Engl J Med 2014;

370:1287-97) estabeleceu um sistema baseado em mt-sDNA para detecção de metilação nos genes BMP3 e NDRG4, detecção de mutação pontual do gene KRAS e detecção de hemoglobina fecal, e então avaliação do risco de CRC e AA de acordo com uma fórmula de regressão logística. A sensibilidade de detecção de CRC e AA foi de 92,3% e 42,4%, respectivamente, e a especificidade foi de 86,6%.

[0015] Mt-sDNA é aplicado para rastrear CRC esporádico e AA com a vantagem de ser não invasivo em relação à colonoscopia e mais sensível que o FOBT e o FIT, mas a sensibilidade de detecção de AA ainda é muito mais baixa que a de detecção de CRC (Clinical Interventions in Aging 2016; 11:967-976).

[0016] Hoje em dia, os produtos baseados em mt-sDNA para detecção de CRC ou AA, tal como Cologuard®, são desenvolvidos principalmente para a população europeia e americana. Não existe nenhum produto para detecção de CRC e AA na população asiática. Particularmente, de acordo com “Summay of safety and effectiveness data (SSED)” of Cologuard® publicado pelo U.S. Food and Drug Administration (www.accessdata.fda.gov/cdrh_docs/pdf13/P130017b.pdf), a sensibilidade de detecção de AA usando Cologuard® na população branca e na população afro-americana é de 42,3% e 42,4%, respectivamente, mas a sensibilidade de detecção de AA usando o mesmo produto na população asiática é de apenas 30,8%. Por conseguinte, é ainda necessário desenvolver um sistema efetivo para detecção de CRC e/ou AA na população asiática para vencer o atual aumento na incidência e na mortalidade por câncer colorretal nos países da Ásia.

[0017] Embora existam muitos estudos sobre os métodos de detecção de metilação nos genes BMP3 e NDRG4 em amostras de fezes de pacientes com CRC e AA, não existem pesquisas detalhadas e abrangentes acerca dos sítios CpG hipermetilados nos genes BMP3 e NDRG4 da população asiática (ONCOLOGY LETTERS 2014;8:1751-

1756; ONCOLOGY LETTERS 2015;9:1383-1387). Além disso, devido ao tamanho limitado das amostras, os estudos anteriores sobre a metilação dos genes BMP3 e NDRG4 em pacientes asiáticos não foram úteis para identificar sítios de metilação que sejam mais relevantes para CRC e AA. Assim sendo, continua sendo necessário determinar a localização exata dos sítios CpG hipermetilados dos genes BMP3 e NDRG4 na população asiática, e desenhar e otimizar kits baseados nestes sítios CpG metilados, deixando a detecção de AA mais sensível.

SUMÁRIO DA INVENÇÃO

[0018] A presente invenção apresenta sequências de DNA compreendendo sítios CpG hipermetilados na região promotora dos genes BMP3 e NDRG4.

[0019] A presente invenção também apresenta iniciadores e sondas preferidos para detecção de metilação dos genes BMP3 ou NDRG4, e combinações dos mesmos para detecção de metilação tanto dos genes BMP3 quanto dos genes NDRG4.

[0020] A presente invenção apresenta ainda um kit para detecção de CRC e AA na população asiática. As sequências de DNA compreendendo sítios CpG hipermetilados na região promotora dos genes BMP3 e NDRG4 podem ser usadas como marcadores para detecção de CRC e/ou AA na população asiática.

[0021] Comparados com outros iniciadores e sondas, os pares de iniciadores e sondas preferidos para detectar os níveis de metilação dos genes BMP3 e/ou NDRG4 apresentam sensibilidade e especificidade surpreendentemente mais altas para detectar tecido tumoral, tal como CRC e AA, e principalmente AA. Além disso, as combinações desses iniciadores e sondas preferidos da presente invenção também atingem sensibilidade e especificidade surpreendentemente mais altas para detectar tecido tumoral, tal como

CRC e AA, e principalmente AA.

[0022] Também é apresentado um kit para detecção de CRC e AA na população asiática baseado nas combinações preferidas de iniciadores e sondas.

[0023] Em algumas modalidades, o kit compreende: (1) uma combinação preferida de pares de iniciadores e sonda e reagentes de qPCR correspondentes; (2) iniciadores e sondas para detecção de sete mutações () em uma região codificadora do gene KRAS e reagentes de qPCR correspondentes; (3) reagentes para detecção de hemoglobina nas fezes.

[0024] Em algumas modalidades, os resultados obtidos a partir de um ensaio usando o kit são corrigidos e analisados de acordo com uma fórmula de regressão logística. Em algumas modalidades, a fórmula é usada para calcular um valor para determinar a presença ou ausência de CRC e/ou AA. Em algumas modalidades, a fórmula é $P = \frac{e^K}{1 + e^K}$, onde P é um índice de abrangência, e $K = a \cdot Ct1 + b \cdot Ct2 + c \cdot Ct3 + d \cdot FIT + X$, onde e é uma constante natural, e a, b, c, d, X são constantes clínicas. Em algumas modalidades, quando o valor de P é maior ou igual a um limiar predeterminado, o resultado indica uma detecção positiva de CRC e/ou AA no paciente. Em algumas modalidades, quando o valor de P é inferior ao valor limítrofe, o resultado indica uma detecção negativa de CRC e/ou AA no paciente, e determina-se que o paciente é saudável.

[0025] A presente invenção apresenta um kit para detectar a presença ou a ausência de câncer colorretal (CRC) ou adenoma avançado (AA) em um paciente com necessidade do mesmo. Um paciente com necessidade do mesmo é um paciente com suspeita de ter CRC e/ou AA, tal como um paciente apresentando pelo menos um sinal de desenvolvimento de CRC e/ou AA, ou um paciente com risco de desenvolver CRC e/ou AA, ou um indivíduo com checkup médico

de rotina, mas que ao contrário não apresenta sinais nem risco.

[0026] Em algumas modalidades, o kit compreende a) um primeiro par de iniciadores e uma primeira sonda para detectar o estado ou nível de metilação de pelo menos um dinucleotídeo CpG do gene BMP3 em uma amostra biológica obtida do paciente. Em algumas modalidades, cada um do primeiro par de iniciadores e da primeira sonda compreende uma sequência contígua de pelo menos 16 nucleotídeos que é idêntica, complementar, ou hibridiza em condições de hibridização rigorosas para SEQ ID NO.: 1,

[0027] Em algumas modalidades, o kit compreende b) um segundo par de iniciadores e uma segunda sonda para detectar o estado ou nível de metilação de pelo menos um dinucleotídeo CpG do gene NDRG4 em uma amostra biológica obtida do paciente. Em algumas modalidades, cada um do segundo par de iniciadores e da segunda sonda compreende uma sequência contígua de pelo menos 16 nucleotídeos que é idêntica, complementar, ou hibridiza em condições de hibridização rigorosas para SEQ ID NO.: 2,

[0028] Em algumas modalidades, o primeiro par de iniciadores e a primeira sonda são selecionados do grupo que consiste em:

[0029] um iniciador direto compreendendo a SEQ ID NO.: 3, um iniciador reverso compreendendo a SEQ ID NO.: 4, e uma sonda compreendendo a SEQ ID NO.: 5;

[0030] um iniciador direto compreendendo a SEQ ID NO.: 9, um iniciador reverso compreendendo a SEQ ID NO.: 10, e uma sonda compreendendo a SEQ ID NO.: 11; e

[0031] um iniciador direto compreendendo a SEQ ID NO.: 15, um iniciador reverso compreendendo a SEQ ID NO.: 16, e uma sonda compreendendo a SEQ ID NO.: 17;

[0032] Em algumas modalidades, em que o segundo par de iniciadores e a segunda sonda são selecionados do grupo que

consiste em:

[0033] iv) um iniciador direto compreendendo a SEQ ID NO.: 6, um iniciador reverso compreendendo a SEQ ID NO.: 7, e uma sonda compreendendo a SEQ ID NO.: 8;

[0034] v) um iniciador direto compreendendo a SEQ ID NO.: 12, um iniciador reverso compreendendo a SEQ ID NO.: 13, e uma sonda compreendendo a SEQ ID NO.: 14; e

[0035] vi) um iniciador direto compreendendo a SEQ ID NO.: 18, um iniciador reverso compreendendo a SEQ ID NO.: 19, e uma sonda compreendendo a SEQ ID NO.: 20;

[0036] Em algumas modalidades, o kit compreende:

[0037] um iniciador direto compreendendo a SEQ ID NO.: 3, um iniciador reverso compreendendo a SEQ ID NO.: 4, e uma sonda compreendendo a SEQ ID NO.: 5, para detectar o estado ou nível de metilação de pelo menos um dinucleotídeo CpG do gene BMP3 na amostra biológica obtida do paciente, e

[0038] um iniciador direto compreendendo a SEQ ID NO.: 6, um iniciador reverso compreendendo a SEQ ID NO.: 7, e uma sonda compreendendo a SEQ ID NO.: 8, para detectar o estado ou nível de metilação de pelo menos um dinucleotídeo CpG do gene NDRG4 na amostra biológica obtida do paciente.

[0039] Em algumas modalidades, o kit compreende:

[0040] um iniciador direto compreendendo a SEQ ID NO.: 9, um iniciador reverso compreendendo a SEQ ID NO.: 10, e uma sonda compreendendo a SEQ ID NO.: 11, para detectar o estado ou nível de metilação de pelo menos um dinucleotídeo CpG do gene BMP3 na amostra biológica obtida do paciente, e

[0041] um iniciador direto compreendendo a SEQ ID NO.: 12, um iniciador reverso compreendendo a SEQ ID NO.: 13, e uma sonda compreendendo a SEQ ID NO.: 14, para detectar o estado ou nível de

metilação de pelo menos um dinucleotídeo CpG do gene NDRG4 na amostra biológica obtida do paciente.

[0042] Em algumas modalidades, o kit compreende:

[0043] um iniciador direto compreendendo a SEQ ID NO.: 15, um iniciador reverso compreendendo a SEQ ID NO.: 16, e uma sonda compreendendo a SEQ ID NO.: 17, para detectar o estado ou nível de metilação de pelo menos um dinucleotídeo CpG do gene BMP3 na amostra biológica obtida do paciente, e

[0044] um iniciador direto compreendendo a SEQ ID NO.: 18, um iniciador reverso compreendendo a SEQ ID NO.: 19, e uma sonda compreendendo a SEQ ID NO.: 20, para detectar o estado ou nível de metilação de pelo menos um dinucleotídeo CpG do gene NDRG4 na amostra biológica obtida do paciente.

[0045] Em algumas modalidades, tanto a primeira sonda quanto a segunda sonda compreendem um doador fluorescente e um fluoróforo aceptor.

[0046] Em algumas modalidades, a primeira sonda e a segunda sonda são sondas TAQMAN®.

[0047] Em algumas modalidades, o kit compreende ainda:

[0048] um meio para detectar a presença ou a ausência de pelo menos uma mutação no gene KRAS no paciente; e

[0049] um meio para detectar a presença ou a ausência de hemoglobina em uma amostra biológica obtida do paciente.

[0050] Em algumas modalidades, o meio para detectar a presença ou a ausência de pelo menos uma mutação no gene KRAS no paciente compreende pelo menos um par de iniciadores capazes de amplificar a região do Exon 12 e/ou do Exon 13 do gene KRAS em uma reação em cadeia da polimerase (PCR).

[0051] Em algumas modalidades, o meio para detectar a presença ou a ausência de hemoglobina na amostra biológica compreende um

anticorpo anti-hemoglobina.

[0052] Em algumas modalidades, os iniciadores são capazes de amplificar uma região do gene KRAS compreendendo pelo menos uma mutação em KRAS selecionada do grupo que consiste em G12D, G12V, G12C, G13D, G12A, G12R, G12S, e G13C.

[0053] Em algumas modalidades, o anticorpo é um anticorpo conjugado a ouro coloidal.

[0054] Em algumas modalidades, o kit compreende ainda um meio para amplificar um gene de controle de qualidade interno. Um controle interno pode detectar (1) inibição de contaminação da amostra ou do método de extração, (2) detectar mau funcionamento do instrumento, (3) falhas químicas (por exemplo, kit ou componentes expirados ou degradados, ou falsa combinação de reagentes), e (4) erro humano. Em algumas modalidades, o gene de controle interno é um controle positivo, tal como um gene em uma amostra controle positivo na qual foi determinado haver metilação. Em algumas modalidades, o gene de controle interno é um controle negativo, tal como um gene em uma amostra controle negativo na qual foi determinado não haver metilação.

[0055] Em algumas modalidades, o kit compreende ainda instruções de uso e/ou interpretação do resultado do exame obtido com o uso do kit.

[0056] Em algumas modalidades, o kit compreende ainda um meio para detectar um complexo formado pelo anticorpo e a hemoglobina na amostra biológica.

[0057] Em algumas modalidades, a amostra biológica obtida do paciente é uma amostra de fezes.

[0058] Em algumas modalidades, o kit compreende ainda um reagente bissulfito, e um recipiente adequado para misturar o reagente bissulfito e a amostra biológica do paciente, ou polinucleotídeos

obtidos da amostra biológica.

[0059] Em algumas modalidades, em vez de usar bissulfito, o kit compreende ainda um reagente do tipo enzima de restrição sensível à metilação.

[0060] Em algumas modalidades, o kit compreende ainda: (1) um padrão positivo e um padrão negativo para detectar metilação de BMP3 na amostra biológica, e (2) um padrão positivo e um padrão negativo para detectar metilação de NDRG4 na amostra biológica.

[0061] Em algumas modalidades, o padrão positivo para detectar metilação de BMP3 compreende uma sequência de polinucleotídeos de:

[0062] GTTAGTTTGGTCGGGTGTTTTTAAAAATAAAGCGAGGA
GGGAAGGTATAGATAGATTTTGAAAATATTCGGGTATATACGTCG
CGATTTATAGTTTTTTTTTAGCGTTGGAGTGGAGACGGCGTTCGTA
GCGTTTTGCGCGGGTGAGGTTTCGCGTAGTTGTTGGGGAAGAGTT
TATTTGTTAGGTTGCGTTGGGTTAGCGTAGTAAGTGGGGTTGGTC
GTTATTTTCGTTGTATTCGGTCGCGTTTTCGGGTTTTCGTGCGTTTTCG
TTTTAG (SEQ ID NO: 67);

[0063] Em algumas modalidades, o padrão negativo para detectar metilação de BMP3 compreende uma sequência de polinucleotídeos de:

[0064] GTTAGTTTGGTTGGGTGTTTTTAAAAATAAAGTGAGGAG
GGAAGGTATAGATAGATTTTGAAAATATTTGGGTTATATATGTTGT
GATTTATAGTTTTTTTTTAGTGTTGGAGTGGAGATGGTGTTTGTAG
TGTTTTGTGTGGGTGAGGTTTGTGTAGTTGTTGGGGAAGAGTTTAT
TTGTTAGGTTGTGTTGGGTTAGTGTAGTAAGTGGGGTTGGTTGTTA
TTTTGTTGTATTTGGTTGTGTTTTGGGTTTTGTGTGTTTTTGTTTTA
G (SEQ ID NO: 68);

[0065] Em algumas modalidades, o padrão positivo para detectar metilação de NDRG4 compreende uma sequência de polinucleotídeos de:

[0066] TGAGAAGTCGGCGGGGGCGCGGATCGATCGGGGTGT
TTTTAGGTTTCGCGTCGCGGTTTTCGTTTCGTTTTTCGTTTCGTTTA
TCGGGTATTTTAGTCGCGTAGAAGGCGGAAGTTACGCGCGAGGG
ATCGCGGTTTCGTTTCGGGATTAGTTTTAGGTTTCGGTATCGTTTCGC
GGGTCGAGCGTTTATATTCGTTAAATTTACGCGGGTACGTTTTTCGC
GGCGTATCGTTTTTAGTT (SEQ ID NO.: 69).

[0067] Em algumas modalidades, o padrão negativo para detectar metilação de NDRG4 compreende uma sequência de polinucleotídeos de:

[0068] TGAGAAGTTGGTGGGGGTGTGGATTGATTGGGGTGTTT
TTTAGGTTTTGTGTTGTGGTTTTTGTGTTTTTTTTGTTTGTTTATTG
GGTATTTTAGTTGTGTAGAAGGTGGAAGTTATGTGTGAGGGATTG
TGGTTTGTTTGGGATTAGTTTTAGGTTTGGTATTGTTTTGTGGGTT
GAGTGTTTATATTTGTTAAATTTATGTGGGTATGTTTTTGTGGTGTA
TTGTTTTTAGTT (SEQ ID NO.: 70).

[0069] Também é apresentado um método para detecção da presença ou ausência de câncer colorretal (CRC) ou adenoma avançado (AA) em um paciente com necessidade do mesmo.

[0070] Em algumas modalidades, o método compreende a) obter DNA genômico de uma amostra biológica do paciente.

[0071] Em algumas modalidades, o método compreende ainda b) tratar o DNA genômico de a), ou um fragmento do mesmo, com um ou mais reagentes para converter bases citosina não metiladas do mesmo em uracil ou outra base que é detectavelmente diferente da citosina em termos de propriedades de hibridização.

[0072] Em algumas modalidades, o método compreende ainda c) colocar o DNA genômico tratado, ou o fragmento tratado do mesmo, em contato com um primeiro par de iniciadores para detecção da presença ou ausência de sítios de metilação de um gene codificando a proteína morfogenética óssea 3 (BMP3) no paciente. Em algumas

modalidades, o método compreende ainda colocar o DNA genômico tratado, ou um fragmento do mesmo, em contato com um segundo par de iniciadores para detecção da presença ou ausência de sítios de metilação de um gene codificando a proteína do membro 4 da família de NDRG (NDRG4) no paciente.

[0073] Em algumas modalidades, o primeiro par de iniciadores compreende uma sequência contígua de pelo menos 9 nucleotídeos que é idêntica, complementar, ou hibridiza em condições de hibridização rigorosas para SEQ ID NO.: 1. Em algumas modalidades, o segundo par de iniciadores compreende uma sequência contígua de pelo menos 9 nucleotídeos que é complementar, ou hibridiza em condições de hibridização rigorosas para SEQ ID NO.: 2.

[0074] Em algumas modalidades, o DNA genômico tratado ou o fragmento do mesmo ou é amplificado para produzir pelo menos um amplificado pelo primeiro par de iniciadores e o segundo par de iniciadores, ou não é amplificado.

[0075] Em algumas modalidades, o método compreende ainda d) determinar a presença ou ausência de CRC ou AA no paciente, com base na presença ou ausência do referido amplificado, o estado ou nível de metilação de pelo menos um dinucleotídeo CpG do gene BMP3 e do gene NDRG4 no paciente.

[0076] Em algumas modalidades, uma PCR quantitativa é usada para amplificar o gene BMP3 metilado na amostra. Em algumas modalidades, uma PCR quantitativa é usada para amplificar o gene NDRG4 metilado na amostra.

[0077] Em algumas modalidades, o método também compreende o uso de iniciadores para amplificar a reference gene (também conhecido como normalizador, gene zelador, ou controle endógeno). Em algumas modalidades, uma PCR quantitativa é usada para amplificar o gene de referência na amostra.

[0078] Em algumas modalidades, o primeiro par de iniciadores e a primeira sonda são selecionados do grupo que consiste em:

[0079] um iniciador direto compreendendo a SEQ ID NO.: 3, um iniciador reverso compreendendo a SEQ ID NO.: 4, e uma sonda compreendendo a SEQ ID NO.: 5;

[0080] um iniciador direto compreendendo a SEQ ID NO.: 9, um iniciador reverso compreendendo a SEQ ID NO.: 10, e uma sonda compreendendo a SEQ ID NO.: 11; e

[0081] um iniciador direto compreendendo a SEQ ID NO.: 15, um iniciador reverso compreendendo a SEQ ID NO.: 16, e uma sonda compreendendo a SEQ ID NO.: 17.

[0082] Em algumas modalidades, o segundo par de iniciadores e a segunda sonda são selecionados do grupo que consiste em:

[0083] iv) um iniciador direto compreendendo a SEQ ID NO.: 6, um iniciador reverso compreendendo a SEQ ID NO.: 7, e uma sonda compreendendo a SEQ ID NO.: 8;

[0084] v) um iniciador direto compreendendo a SEQ ID NO.: 12, um iniciador reverso compreendendo a SEQ ID NO.: 13, e uma sonda compreendendo a SEQ ID NO.: 14; e

[0085] vi) um iniciador direto compreendendo a SEQ ID NO.: 18, um iniciador reverso compreendendo a SEQ ID NO.: 19, e uma sonda compreendendo a SEQ ID NO.: 20.

[0086] Em algumas modalidades, o método compreende o uso de

[0087] um iniciador direto compreendendo a SEQ ID NO.: 3, um iniciador reverso compreendendo a SEQ ID NO.: 4, e uma sonda compreendendo a SEQ ID NO.: 5, para detectar o estado ou nível de metilação de pelo menos um dinucleotídeo CpG do gene BMP3 na amostra biológica obtida do paciente, e

[0088] um iniciador direto compreendendo a SEQ ID NO.: 6, um iniciador reverso compreendendo a SEQ ID NO.: 7, e uma sonda

compreendendo a SEQ ID NO.: 8, para detectar o estado ou nível de metilação de pelo menos um dinucleotídeo CpG do gene NDRG4 na amostra biológica obtida do paciente.

[0089] Em algumas modalidades, o método compreende o uso de
[0090] um iniciador direto compreendendo a SEQ ID NO.: 9, um iniciador reverso compreendendo a SEQ ID NO.: 10, e uma sonda compreendendo a SEQ ID NO.: 11, para detectar o estado ou nível de metilação de pelo menos um dinucleotídeo CpG do gene BMP3 na amostra biológica obtida do paciente, e

[0091] um iniciador direto compreendendo a SEQ ID NO.: 12, um iniciador reverso compreendendo a SEQ ID NO.: 13, e uma sonda compreendendo a SEQ ID NO.: 14, para detectar o estado ou nível de metilação de pelo menos um dinucleotídeo CpG do gene NDRG4 na amostra biológica obtida do paciente.

[0092] Em algumas modalidades, o método compreende o uso de
[0093] um iniciador direto compreendendo a SEQ ID NO.: 15, um iniciador reverso compreendendo a SEQ ID NO.: 16, e uma sonda compreendendo a SEQ ID NO.: 17, para detectar o estado ou nível de metilação de pelo menos um dinucleotídeo CpG do gene BMP3 na amostra biológica obtida do paciente, e

[0094] um iniciador direto compreendendo a SEQ ID NO.: 18, um iniciador reverso compreendendo a SEQ ID NO.: 19, e uma sonda compreendendo a SEQ ID NO.: 20, para detectar o estado ou nível de metilação de pelo menos um dinucleotídeo CpG do gene NDRG4 na amostra biológica obtida do paciente.

[0095] Em algumas modalidades, tanto a primeira sonda quanto a segunda sonda compreendem um doador fluorescente e um fluoróforo aceptor. Em algumas modalidades, a primeira sonda e a segunda sonda são sondas TAQMAN®.

[0096] Em algumas modalidades, o método compreende ainda

uma etapa de detecção da presença ou ausência de pelo menos uma mutação no gene KRAS em uma amostra biológica obtida do paciente.

[0097] Em algumas modalidades, o método compreende ainda uma etapa de detecção da presença ou ausência de hemoglobina em uma amostra biológica obtida do paciente. Em algumas modalidades, a etapa de detecção da presença ou ausência de hemoglobina na amostra biológica compreende usar um anticorpo anti-hemoglobina. Em algumas modalidades, o anticorpo é um anticorpo conjugado a ouro coloidal.

[0098] Em algumas modalidades, a etapa de detecção da presença ou ausência de pelo menos uma mutação no gene KRAS no paciente compreende o uso de pelo menos um par de iniciadores capazes de amplificar a região do Exon 12 e/ou do Exon 13 do gene KRAS em uma reação em cadeia da polimerase (PCR). Em algumas modalidades, os iniciadores são capazes de amplificar uma região do gene KRAS compreendendo pelo menos uma mutação em KRAS selecionada do grupo que consiste em G12D, G12V, G12C, G13D, G12A, G12R, G12S, e G13C.

[0099] Em algumas modalidades, o gene KRAS mutante é amplificado por um ou mais pares de iniciadores selecionados do grupo que consiste em:

[00100] um iniciador direto G12D-F compreendendo a SEQ ID NO.: 35, e um iniciador reverso Kras-R compreendendo a SEQ ID NO.: 42;

[00101] um iniciador direto G13D-F compreendendo a SEQ ID NO.: 36, e um iniciador reverso Kras-R compreendendo a SEQ ID NO.: 42;

[00102] um iniciador direto G12V-F compreendendo a SEQ ID NO.: 37, e um iniciador reverso Kras-R compreendendo a SEQ ID NO.: 42;

[00103] um iniciador direto G12C-F compreendendo a SEQ ID NO.: 38, e um iniciador reverso Kras-R compreendendo a SEQ ID NO.: 42;

[00104] um iniciador direto G12S-F compreendendo a SEQ ID NO.:

- 39, e um iniciador reverso Kras-R compreendendo a SEQ ID NO.: 42;
- [00105] um iniciador direto G12A-F compreendendo a SEQ ID NO.: 40, e um iniciador reverso Kras-R compreendendo a SEQ ID NO.: 42; e
- [00106] um iniciador direto G12R-F compreendendo a SEQ ID NO.: 41, e um iniciador reverso Kras-R compreendendo a SEQ ID NO.: 42.
- [00107] Em algumas modalidades, a sonda KRAS para a qPCR compreende a SEQ ID NO.: 46.
- [00108] Em algumas modalidades, a amplificação do gene BMP3 é realizada em uma PCR quantitativa (qPCR), e o método compreende ainda amplificar um primeiro gene de referência (i.e., um primeiro gene de referência) para determinar o valor de Ct da amplificação de BMP3 como $\Delta Ct1$.
- [00109] Em algumas modalidades, a amplificação do gene NDRG4 é realizada em uma PCR quantitativa (qPCR), e o método compreende ainda amplificar um segundo gene de referência (i.e., um segundo gene de referência) para determinar o valor de Ct da amplificação de NDRG4 como $\Delta Ct2$.
- [00110] Em algumas modalidades, a amplificação do gene KRAS mutante é realizada em uma PCR quantitativa (qPCR), e o método compreende ainda amplificar um terceiro gene de referência (i.e., um terceiro gene de referência) para determinar o valor de Ct da amplificação de KRAS mutante como $\Delta Ct3$.
- [00111] Em algumas modalidades, o primeiro e o segundo genes de referência são os mesmos. Em algumas modalidades, o mesmo gene de referência é um gene B2M.
- [00112] Em algumas modalidades, o terceiro gene de referência é um gene ACTB. Em algumas modalidades, os iniciadores de qPCR para amplificar o gene ACTB compreendem as SEQ ID NOs.: 43 e 44, e a sonda compreende a SEQ ID NO.: 46.

[00113] Em algumas modalidades, o método compreende o uso de (1) um padrão positivo e um padrão negativo para detectar metilação de BMP3 na amostra, e (2) um padrão positivo e um padrão negativo para detectar metilação de NDRG4 na amostra.

[00114] Em algumas modalidades, o padrão positivo para detectar metilação de BMP3 compreende uma sequência de polinucleotídeos de:

[00115] GTTAGTTTGGTCGGGTGTTTTTAAAAATAAAGCGAGGA
GGGAAGGTATAGATAGATTTTAAAAATATTCGGGTTATATACGTCG
CGATTTATAGTTTTTTTTTAGCGTTGGAGTGGAGACGGCGTTCGTA
GCGTTTTGCGCGGGTGAGGTTTCGCGTAGTTGTTGGGGAAGAGTT
TATTTGTTAGGTTGCGTTGGGTTAGCGTAGTAAGTGGGGTTGGTC
GTTATTTGTTGTATTCGGTCGCGTTTCGGGTTTCGTGCGTTTTCG
TTTTAG (SEQ ID NO: 67);

[00116] Em algumas modalidades, o padrão negativo para detectar metilação de BMP3 compreende uma sequência de polinucleotídeos de

[00117] GTTAGTTTGGTTGGGTGTTTTTAAAAATAAAGTGAGGAG
GGAAGGTATAGATAGATTTTAAAAATATTTGGGTTATATATGTTGT
GATTTATAGTTTTTTTTTAGTGTTGGAGTGGAGATGGTGTGTTGTAG
TGTTTTGTGTGGGTGAGGTTTGTGTAGTTGTTGGGGAAGAGTTTAT
TTGTTAGGTTGTGTTGGGTTAGTGTAGTAAGTGGGGTTGGTTGTTA
TTTTGTTGTATTTGGTTGTGTTTTGGGTTTTGTGTGTTTTTGTTTTA
G (SEQ ID NO: 68);

[00118] Em algumas modalidades, o padrão positivo para detectar metilação de NDRG4 compreende uma sequência de polinucleotídeos de

[00119] TGAGAAGTCGGCGGGGGCGCGGATCGATCGGGGTGT
TTTTTAGGTTTCGCGTCGCGGTTTTCGTTTCGTTTTTCGTTTCGTTTA
TCGGGTATTTAGTCGCGTAGAAGGCGGAAGTTACGCGCGAGGG

ATCGCGGTTTCGTTCCGGGATTAGTTTTAGGTTCCGGTATCGTTTTCGC
GGGTCGAGCGTTTATATTCGTTAAATTTACGCGGGTACGTTTTTCGC
GGCGTATCGTTTTTAGTT (SEQ ID NO.: 69).

[00120] Em algumas modalidades, o padrão negativo para detectar metilação de NDRG4 compreende uma sequência de polinucleotídeos de

[00121] TGAGAAGTTGGTGGGGGTGTGGATTGATTGGGGTGTTT
TTTAGGTTTTGTGTTGTGGTTTTTTGTTTGTTTTTTTGTTTGTATTG
GGTATTTTAGTTGTGTAGAAGGTGGAAGTTATGTGTGAGGGATTG
TGGTTTGTGGGATTAGTTTTAGGTTTGGTATTGTTTTGTGGGT
GAGTGTTTATATTTGTTAAATTTATGTGGGTATGTTTTTTGTGGTGTA
TTGTTTTTAGTT (SEQ ID NO.: 70).

[00122] Em algumas modalidades, o método compreende amplificar um padrão de controle de qualidade.

[00123] Em algumas modalidades, um método para detecção da presença ou ausência de câncer colorretal (CRC) ou adenoma avançado (AA) em um paciente com necessidade do mesmo, compreendendo o uso de um kit da presente invenção.

[00124] A presente invenção apresenta ainda um método para detecção da presença ou ausência de câncer colorretal (CRC) ou adenoma avançado (AA) em um paciente com necessidade do mesmo, compreendendo:

[00125] obter um DNA genômico não tratado de uma amostra de fezes do paciente;

[00126] tratar o DNA genômico de a), ou um fragmento do mesmo, com um ou mais reagentes para converter bases citosina não metiladas do mesmo em uracil ou outra base que é detectavelmente diferente da citosina em termos de propriedades de hibridização;

[00127] realizar uma PCR quantitativa (qPCR) usando o DNA genômico não tratado de b) como gabarito, e determinar o valor de Ct

do gene BMP3 no paciente como ΔCt_1 ;

[00128] realizar uma qPCR usando o DNA genômico não tratado de b) como gabarito, e determinar o valor de Ct do gene NDRG4 no paciente como ΔCt_2 ;

[00129] realizar uma qPCR usando o DNA genômico não tratado como gabarito, e determinar o valor de Ct de um gene KRAS mutante no paciente como ΔCt_3 ;

[00130] realizar um exame imunoquímico de fezes da proteína hemoglobina na amostra de fezes e determinar um escore como FIT;

[00131] determinar o valor de K, onde $K = a \cdot \Delta Ct_1 + b \cdot \Delta Ct_2 + c \cdot \Delta Ct_3 + d \cdot FIT + X$, onde a, b, c, d, X são constantes clínicas; e

[00132] determinar o valor de um índice de abrangência P, onde $P = eK / (1 + eK)$, onde e é a constante natural.

[00133] As constantes clínicas a, b, c, d, e X podem ser determinadas por análise da distribuição dos dados clínicos entre uma população de pacientes.

[00134] Em algumas modalidades, quando P é maior ou igual a um valor limítrofe predeterminado, determina-se que o paciente tem CRC e/ou AA, e quando P é menor que o valor limítrofe predeterminado, determina-se que o paciente é saudável.

[00135] Em algumas modalidades, o valor limítrofe predeterminado é calculado a partir da distribuição dos dados clínicos, tal como os dados obtidos de pacientes que foram avaliados como tendo CRC e/ou AA, e pacientes que foram avaliados como não tendo CRC e/ou AA.

[00136] Em algumas modalidades, a qPCR para amplificar o gene BMP3 compreende um primeiro par de iniciadores e uma primeira sonda, em que o primeiro par de iniciadores e a primeira sonda são selecionados do grupo que consiste em:

[00137] um iniciador direto compreendendo a SEQ ID NO.: 3, um iniciador reverso compreendendo a SEQ ID NO.: 4, e uma sonda compreendendo a SEQ ID NO.: 5;

[00138] um iniciador direto compreendendo a SEQ ID NO.: 9, um iniciador reverso compreendendo a SEQ ID NO.: 10, e uma sonda compreendendo a SEQ ID NO.: 11; e

[00139] um iniciador direto compreendendo a SEQ ID NO.: 15, um iniciador reverso compreendendo a SEQ ID NO.: 16, e uma sonda compreendendo a SEQ ID NO.: 17.

[00140] Em algumas modalidades, a qPCR para amplificar o gene NDRG4 compreende um segundo par de iniciadores e uma segunda sonda, onde o segundo par de iniciadores e a segunda sonda são selecionados do grupo que consiste em:

[00141] iv) um iniciador direto compreendendo a SEQ ID NO.: 6, um iniciador reverso compreendendo a SEQ ID NO.: 7, e uma sonda compreendendo a SEQ ID NO.: 8;

[00142] v) um iniciador direto compreendendo a SEQ ID NO.: 12, um iniciador reverso compreendendo a SEQ ID NO.: 13, e uma sonda compreendendo a SEQ ID NO.: 14; e

[00143] vi) um iniciador direto compreendendo a SEQ ID NO.: 18, um iniciador reverso compreendendo a SEQ ID NO.: 19, e uma sonda compreendendo a SEQ ID NO.: 20.

[00144] Em algumas modalidades, o método compreende o uso de

[00145] um iniciador direto compreendendo a SEQ ID NO.: 3, um iniciador reverso compreendendo a SEQ ID NO.: 4, e uma sonda compreendendo a SEQ ID NO.: 5, para detectar o estado ou nível de metilação de pelo menos um dinucleotídeo CpG do gene BMP3 na amostra, e

[00146] um iniciador direto compreendendo a SEQ ID NO.: 6, um iniciador reverso compreendendo a SEQ ID NO.: 7, e uma sonda

compreendendo a SEQ ID NO.: 8, para detectar o estado ou nível de metilação de pelo menos um dinucleotídeo CpG do gene NDRG4 na amostra.

[00147] Em algumas modalidades, o método compreende o uso de [00148] um iniciador direto compreendendo a SEQ ID NO.: 9, um iniciador reverso compreendendo a SEQ ID NO.: 10, e uma sonda compreendendo a SEQ ID NO.: 11, para detectar o estado ou nível de metilação de pelo menos um dinucleotídeo CpG do gene BMP3 na amostra, e

[00149] um iniciador direto compreendendo a SEQ ID NO.: 12, um iniciador reverso compreendendo a SEQ ID NO.: 13, e uma sonda compreendendo a SEQ ID NO.: 14, para detectar o estado ou nível de metilação de pelo menos um dinucleotídeo CpG do gene NDRG4 na amostra.

[00150] Em algumas modalidades, o método compreende o uso de [00151] um iniciador direto compreendendo a SEQ ID NO.: 15, um iniciador reverso compreendendo a SEQ ID NO.: 16, e uma sonda compreendendo a SEQ ID NO.: 17, para detectar o estado ou nível de metilação de pelo menos um dinucleotídeo CpG do gene BMP3 na amostra, e

[00152] um iniciador direto compreendendo a SEQ ID NO.: 18, um iniciador reverso compreendendo a SEQ ID NO.: 19, e uma sonda compreendendo a SEQ ID NO.: 20, para detectar o estado ou nível de metilação de pelo menos um dinucleotídeo CpG do gene NDRG4 na amostra.

[00153] Em algumas modalidades, tanto a primeira sonda quanto a segunda sonda compreendem um doador fluorescente e um fluoróforo acceptor. Em algumas modalidades, a primeira sonda e a segunda sonda são TAQMAN® probes.

[00154] Em algumas modalidades, o gene KRAS mutante

compreendendo pelo menos uma mutação em KRAS selecionada do grupo que consiste em G12D, G12V, G12C, G13D, G12A, G12R, G12S, e G13C.

[00155] Em algumas modalidades, o examine imunológico de fezes compreende um anticorpo conjugado a ouro coloidal.

[00156] Em algumas modalidades, a etapa c) e a etapa d) do método compreendem o uso de B2M gene como um gene de referência.

[00157] Em algumas modalidades, o método compreende o uso de

[00158] um padrão positivo e um padrão negativo para detectar metilação de BMP3 na amostra, e

[00159] um padrão positivo e um padrão negativo para detectar metilação de NDRG4 na amostra.

[00160] Em algumas modalidades, o padrão positivo para detectar metilação de BMP3 compreende uma sequência de polinucleotídeos de

[00161] GTTAGTTTGGTCGGGTGTTTTTAAAATAAAGCGAGGA
GGGAAGGTATAGATAGATTTTGAAAATATTTCGGGTTATATACGTCCG
GATTTATAGTTTTTTTTTAGCGTTGGAGTGGAGACGGCGTTCGTA
GCGTTTTGCGCGGGTGAGGTTTCGCGTAGTTGTTGGGGAAGAGTT
TATTTGTTAGGTTGCGTTGGGTTAGCGTAGTAAGTGGGGTTGGTC
GTTATTTTCGTTGTATTCGGTCGCGTTTTTCGGGTTTCGTGCGTTTTTCG
TTTTAG (SEQ ID NO: 67).

[00162] Em algumas modalidades, o padrão negativo para detectar metilação de BMP3 compreende uma sequência de polinucleotídeos de

[00163] GTTAGTTTGGTTGGGTGTTTTTAAAATAAAGTGAGGAG
GGAAGGTATAGATAGATTTTGAAAATATTTGGGTTATATATGTTGT
GATTTATAGTTTTTTTTTAGTGTTGGAGTGGAGATGGTGTTTGTAG
TGTTTTGTGTGGGTGAGGTTTGTGTAGTTGTTGGGGAAGAGTTTAT

TTGTTAGGTTGTGTTGGGTTAGTGTAGTAAGTGGGGTTGGTTGTTA
TTTTGTTGTATTTGGTTGTGTTTTGGGTTTTGTGTGTTTTTGTTTTA
G (SEQ ID NO: 68).

[00164] Em algumas modalidades, o padrão positivo para detectar metilação de NDRG4 compreende uma sequência de polinucleotídeos de

[00165] TGAGAAGTCGGCGGGGGCGCGGATCGATCGGGGTGT
TTTTTAGGTTTCGCGTCGCGGTTTTCGTTCGTTTTTTCGTTTCGTTTA
TCGGGTATTTTAGTCGCGTAGAAGGCGGAAGTTACGCGCGAGGG
ATCGCGGTTTCGTTTCGGGATTAGTTTTAGGTTTCGGTATCGTTTCGC
GGGTTCGAGCGTTTATATTCGTTAAATTTACGCGGGTACGTTTTTCGC
GGCGTATCGTTTTTAGTT (SEQ ID NO.: 69).

[00166] Em algumas modalidades, o padrão negativo para detectar metilação de NDRG4 compreende uma sequência de polinucleotídeos de

[00167] TGAGAAGTTGGTGGGGGTGTGGATTGATTGGGGTGTTT
TTTAGGTTTTGTGTTGTGGTTTTTGTGTTTTTTTTGTTTGTTTATTG
GGTATTTTAGTTGTGTAGAAGGTGGAAGTTATGTGTGAGGGATTG
TGGTTTGTTTGGGATTAGTTTTAGGTTTGGTATTGTTTTGTGGGT
GAGTGTTTATATTTGTTAAATTTATGTGGGTATGTTTTTGTGGTGTA
TTGTTTTTAGTT (SEQ ID NO.: 70).

[00168] Em algumas modalidades, o método compreende amplificar um padrão de controle de qualidade na etapa c) e na etapa d).

[00169] Também é apresentado um método para o diagnóstico e o tratamento de um câncer colorretal (CRC) e/ou adenoma avançado (AA) em um paciente com necessidade do mesmo, compreendendo determinar a presença ou ausência de CRC e/ou AA no paciente usando um kit da presente invenção, e o tratamento do paciente depende da presença ou ausência de CRC e/ou AA no paciente.

[00170] Também é apresentado um método para o diagnóstico e o

tratamento de um câncer colorretal (CRC) e/ou adenoma avançado (AA) em um paciente com necessidade do mesmo, compreendendo determinar a presença ou ausência de CRC e/ou AA no paciente usando um método descrito neste pedido, e o tratamento do paciente depende da presença ou ausência de CRC e/ou AA no paciente.

BREVE DESCRIÇÃO DOS DESENHOS

[00171] A Figura 1A até a Figura 1D representam os resultados da previsão de ilhotas CpG e da posição relativa dos amplicons de dois genes, BMP3 e NDRG4. “Y”, “R” são bases degeneradas. Figura 1A - O resultado da previsão de ilhotas CpG da região promotora do gene BMP3s; Figura 1B - A posição relativa dos amplicons do gene BMP3; Figura 1C - O resultado da previsão de ilhotas CpG da região promotora do gene NDRG4s; Figura 1D - A posição relativa dos amplicons do gene NDRG4.

[00172] A Figura 2A representa a diferença nos sítios CpG de metilação de BMP nas populações branca e asiática. A Figura 2B representa a diferença nos sítios CpG de metilação do gene NDRG4 nas populações branca e asiática.

[00173] A Figura 3A representa a curva de amplificação da sensibilidade analítica de BMP3 com os iniciadores e as sondas do grupo preferido 1. A Figura 3B representa a curva de amplificação da sensibilidade analítica de NDRG4 com os iniciadores e as sondas do grupo preferido 1. A Figura 3C representa a curva de amplificação da sensibilidade analítica de BMP3 com os iniciadores e as sondas do grupo preferido 2. A Figura 3D representa a curva de amplificação da sensibilidade analítica de NDRG4 com os iniciadores e as sondas do grupo preferido 2. A Figura 3E representa a curva de amplificação da sensibilidade analítica de BMP3 com os iniciadores e as sondas do grupo preferido 3. A Figura 3F representa a curva de amplificação da sensibilidade analítica de NDRG4 com os iniciadores e as sondas do

grupo preferido 3. A Figura 3G representa a curva de amplificação da sensibilidade analítica de BMP3 com os iniciadores e as sondas do grupo comparativo 1. A Figura 3H representa a curva de amplificação da sensibilidade analítica de NDRG4 com os iniciadores e as sondas do grupo comparativo 1. A Figura 3I representa a curva de amplificação da sensibilidade analítica de BMP3 com os iniciadores e as sondas do grupo comparativo 2. A Figura 3J representa a curva de amplificação da sensibilidade analítica de NDRG4 com os iniciadores e as sondas do grupo comparativo 2. A Figura 3K representa a curva de amplificação da sensibilidade analítica de BMP3 com os iniciadores e as sondas do grupo comparativo 3. A Figura 3L representa a curva de amplificação da sensibilidade analítica de NDRG4 com os iniciadores e as sondas do grupo comparativo 3.

[00174] A Figura 4A representa a curva de amplificação da especificidade analítica de BMP3 com os iniciadores e as sondas do grupo preferido 1. A Figura 4B representa a curva de amplificação da especificidade analítica de NDRG4 com os iniciadores e as sondas do grupo preferido 1. A Figura 4C representa a curva de amplificação da especificidade analítica de BMP3 com os iniciadores e as sondas do grupo preferido 2. A Figura 4D representa a curva de amplificação da especificidade analítica de NDRG4 com os iniciadores e as sondas do grupo preferido 2. A Figura 4E representa a curva de amplificação da especificidade analítica de BMP3 com os iniciadores e as sondas do grupo preferido 3. A Figura 4F representa a curva de amplificação da especificidade analítica de NDRG4 com os iniciadores e as sondas do grupo preferido 3. A Figura 4G representa a curva de amplificação da especificidade analítica de BMP3 com os iniciadores e as sondas do grupo comparativo 1. A Figura 4H representa a curva de amplificação da especificidade analítica de NDRG4 com os iniciadores e as sondas do grupo comparativo 1. A Figura 4I representa a curva de

amplificação da especificidade analítica de BMP3 com os iniciadores e as sondas do grupo comparativo 2. A Figura 4J representa a curva de amplificação da especificidade analítica de NDRG4 com os iniciadores e as sondas do grupo comparativo 2. A Figura 4K representa a curva de amplificação da especificidade analítica de BMP3 com os iniciadores e as sondas do grupo comparativo 3. A Figura 4L representa a curva de amplificação da especificidade analítica de NDRG4 com os iniciadores e as sondas do grupo comparativo 3.

[00175] A Figura 5A até a Figura 5C representam as curvas de amplificação usando os iniciadores e as sondas do grupo preferido 1, grupo preferido 2, e grupo preferido 3, respectivamente, para detectar metilações de BMP3 na amostra clínica. A Figura 5D até a Figura 5F representam as curvas de amplificação usando os iniciadores e as sondas do grupo comparativo 1, grupo comparativo 2, e grupo comparativo 3, respectivamente, para detectar metilações de BMP3 no mesmo ensaio.

[00176] A Figura 6A até a Figura 6C representam as curvas de amplificação usando os iniciadores e as sondas do grupo preferido 1, grupo preferido 2, e grupo preferido 3, respectivamente, para detectar metilações de NDRG4 na amostra clínica. A Figura 6D até a Figura 6F representam as curvas de amplificação usando os iniciadores e as sondas do grupo comparativo 1, grupo comparativo 2, e grupo comparativo 3, respectivamente, para detectar metilações de NDRG4 no mesmo ensaio.

DESCRIÇÃO DETALHADA

Definições

[00177] As referências a “uma modalidade”, e “um exemplo” indicam que a modalidade ou o exemplo assim descrito pode incluir um atributo, estrutura, característica, propriedade, elemento ou limitação particular, mas nem toda modalidade ou exemplo inclui

necessariamente aquele atributo, estrutura, característica, propriedade, elemento ou limitação particular. Além disso, o uso repetido da frase “em uma modalidade” não se refere necessariamente à mesma modalidade, embora isto seja possível.

[00178] “Ácido nucleico” ou “oligonucleotídeo” ou “polinucleotídeo”, conforme usado neste pedido, significa pelo menos dois nucleotídeos covalentemente ligados. A descrição de um cordão simples também define a sequência do cordão de complementaridade. Assim sendo, um ácido nucleico também abrange o cordão de complementaridade de um cordão simples descrito. Muitas variantes de um ácido nucleico podem ser usadas para a mesma finalidade que um ácido nucleico dado. Assim sendo, um ácido nucleico também abrange ácidos nucleicos substancialmente idênticos e complementos dos mesmos. Um cordão simples oferece uma sonda que pode hibridizar para uma sequência alvo em condições de hibridização rigorosas. Assim sendo, um ácido nucleico também abrange uma sonda que hibridiza em condições de hibridização rigorosas. Os ácidos nucleicos podem ser de cordão simples ou de cordão duplo, ou podem conter porções tanto de sequências de cordão duplo como de sequências de cordão simples. O ácido nucleico pode ser DNA, tanto genômico quanto cDNA, RNA, ou um híbrido, onde o ácido nucleico pode conter combinações de desoxirribonucleotídeos e ribonucleotídeos, e combinações de bases incluindo uracila, adenina, timina, citosina, guanina, inosina, xantina, hipoxantina, isocitosina e isoguanina. Os ácidos nucleicos podem ser obtidos por métodos de síntese química ou por métodos recombinantes.

[00179] Conforme usado neste pedido a frase “indivíduo com necessidade do mesmo” refere-se um indivíduo animal ou humano que sabidamente tem câncer, apresenta o risco de ter câncer (por exemplo, um indivíduo geneticamente predisposto, um indivíduo com

histórico médico e/ou familiar de câncer, um indivíduo que fora exposto a carcinógenos, risco ocupacional, risco ambiental) e/ou um indivíduo que apresente sinais clínicos suspeitos de câncer r (por exemplo, sangue nas fezes ou melena, dor inexplicável, sudorese, febre inexplicável, perda de peso inexplicável até anorexia, mudanças nos hábitos intestinais (constipação e/ou diarreia), tenesmo (sensação de evacuação incompleta, especificamente para câncer retal), anemia e/ou fraqueza generalizada). Adicionalmente ou alternativamente, o indivíduo com necessidade do mesmo pode ser um ser humano saudável passando por um check-up de rotina.

[00180] Conforme usado neste pedido o termo “cerca de” refere-se a $\pm 10\%$.

[00181] A frase “consistindo essencialmente em” significa que a composição ou o método pode incluir ingredientes e/ou etapas adicionais, mas somente de os ingredientes e/ou etapas adicionais não alterarem materialmente as características básicas e novas da composição ou método reivindicado.

[00182] Conforme usado neste pedido, a forma singular “um”, “uma” e “o/a” incluem seus correspondentes no plural a menos que nitidamente indicado em contrário pelo contexto. Por exemplo, o termo “um composto” ou “pelo menos um composto” pode incluir uma pluralidade de compostos, inclusive misturas dos mesmos.

[00183] “Condições de hibridização rigorosas” conforme usado neste pedido significa as condições nas quais uma primeira sequência de ácidos nucleicos (por exemplo, sonda) vai hibridizar para uma segunda sequência de ácidos nucleicos (por exemplo, alvo), tal como em uma mistura complexa de ácidos nucleicos. As condições rigorosas são dependentes da sequência e serão diferentes em circunstâncias diferentes. As condições rigorosas podem ser selecionadas para serem de cerca de 5-10° C inferiores ao ponto de

fusão (T_m) da sequência específica a um pH e resistência iônica definidos. A T_m pode ser a temperatura (a uma resistência iônica, pH, e concentração de ácidos nucleicos definidos) à qual 50% das sondas complementares ao alvo hibridizam para a sequência alvo no equilíbrio (quando as sequências alvo estão presentes em excesso, à T_m , 50% das sondas são ocupadas no equilíbrio). As condições rigorosas podem ser aquelas nas quais a concentração de sal é inferior a uma concentração de cerca de 1,0 M de íon de sódio, tal como uma concentração de cerca de 0,01-1,0 M de íon de sódio (ou outros sais) a um de pH 7,0 a 8,3 e a temperatura é de pelo menos cerca de 30° C para sondas curtas (por exemplo, cerca de 10-50 nucleotídeos) e pelo menos cerca de 60° C para sondas compridas (por exemplo, maiores que cerca de 50 nucleotídeos). Condições rigorosas também podem ser atingidas com a adição de agentes desestabilizantes tal como formamida. Para hibridização seletiva ou específica, um sinal positivo pode ser pelo menos 2 a 10 vezes a hibridização de fundo. Condições de hibridização rigorosas exemplificativas incluem as seguintes: 50% formamida, 5×SSC, e 1% SDS, incubação a 42° C., ou, 5×SSC, 1% SDS, incubação a 65° C., com lavagem em 0,2×SSC, e 0,1% SDS a 65° C.

[00184] “Substancialmente complementar” conforme usado neste pedido significa que uma primeira sequência é pelo menos 60%, 65%, 70%, 75%, 80%, 85%, 90%, 95%, 97%, 98% ou 99% idêntica ao complemento de uma segunda sequência ao longo de uma região de 8, 9, 10, 11, 12, 13, 14, 15, 16, 17, 18, 19, 20, 21, 22, 23, 24, 25, 30, 35, 40, 45, 50, 55, 60, 65, 70, 75, 80, 85, 90, 95, 100 ou mais nucleotídeos, ou que as duas sequências hibridizam em condições de hibridização rigorosas.

[00185] “Substancialmente idêntica” conforme usado neste pedido significa que uma primeira e uma segunda sequências são pelo

menos 60%, 65%, 70%, 75%, 80%, 85%, 90%, 95%, 97%, 98% ou 99% idênticas ao longo de uma região de 8, 9, 10, 11, 12, 13, 14, 15, 16, 17, 18, 19, 20, 21, 22, 23, 24, 25, 30, 35, 40, 45, 50, 55, 60, 65, 70, 75, 80, 85, 90, 95, 100 ou mais nucleotídeos ou aminoácidos, ou no que diz respeito aos ácidos nucleicos, se a primeira sequência for substancialmente complementar ao complemento da segunda sequência.

[00186] Conforme usado neste pedido o termo “diagnosticar” refere-se a classificar a patologia, ou um sintoma, determinar a severidade da patologia (por exemplo, grau ou estágio), monitorar a progressão da patologia, prognostica um desfecho da patologia e/ou perspectivas de recuperação.

[00187] A frase “consistindo essencialmente em” significa que a composição ou o método pode incluir ingredientes e/ou etapas adicionais, mas somente de os ingredientes e/ou etapas adicionais não alterarem materialmente as características básicas e novas da composição ou método reivindicado.

Sequências de DNA compreendendo sítios CpG hipermetilados na região promotora dos genes BMP3 e NDRG4 na população chinesa com CRC e AA

[00188] Esta invenção apresenta sequências de DNA compreendendo sítios CpG hipermetilados detalhados na região promotora dos genes BMP3 e NDRG4 na população asiática (por exemplo, a população chinesa), que podem ser usados como marcadores para detecção de CRC e AA.

[00189] Em algumas modalidades, apresenta-se a sequência natural do gene BMP3 que é a seguinte (5' para 3'), mostrando sítios potencialmente metilados marcados pelo sobrescrito “m”:

[00190] GCCAGTTTGGCmCGGGTGTTC CCAAAAATAAAGmCGA
GGAGGGAAGGTACAGACAGATCTTGAAAACACCmCGGGCCACAC

AmCGCmCGmCGACCTACAGCTCTTTCTCAGmCGTTGGAGTGGAG
 AmCGGmCGCCCGCAGmCGCCCTGmCGmCGGGTGAGGTcmCGm
 CGCAGCTGCTGGGGAAGAGCCCACCTGTCAGGCTGmCGCTGGG
 TCAGmCGCAGCAAGTGGGGCTGGCmCGCTATCTmCGCTGCACC
 CGGcmCGmCGTCCmCGGGCTcmCGTGmCGCCCTmCGCCCCAG(
 SEQ ID NO.: 65).

[00191] Em algumas modalidades, apresenta-se a sequência natural do gene NDRG4 que é a seguinte (5' para 3'), mostrando sítios potencialmente metilados marcados pelo sobrescrito "m":

[00192] tgagaagtmcggmccggggmccgmccgatmccacmccgggtgtcccca
 ggctcmccmccgtmccmccggtcccmmccgtmccccctccmcccmcccccacmccgggca
 cccagcmccmccgcagaaggmccgaagccmccmccmccmccgagggacmccmccggtc
 mccgtmccgggactagcccagggccmccgacmcccccmmccmccgggcmccgagmccgc
 cacaccmccccaacccmccmccgggcamcccccmmccmccggmccgcacmccccc
 cagcc(SEQ ID NO.: 66).

[00193] Depois do tratamento do DNA genômico natural, ou um fragmento do mesmo, com um ou mais reagentes para converter as bases citosina não metiladas do mesmo em uracil (por exemplo, por bissulfito) ou outra base que seja detectavelmente diferente da citosina em termos de propriedades de hibridização, a sequência convertida do gene BMP3 é a seguinte (5' para 3'), mostrando sítios potencialmente metilados marcados pelo sobrescrito "m":

[00194] GTTAGTTTGGTmCGGGTGTTTTTAAAATAAAGmCGAG
 GAGGGAAGGTATAGATAGATTTTTGAAAATATTmCGGGTTATATAm
 CGTmCGmCGATTTATAGTTTTTTTTTAGmCGTTGGAGTGGAGAmC
 GGmCGTTmCGTAGmCGTTTTGmCGmCGGGTGAGGTTmCGmCGT
 AGTTGTTGGGGAAGAGTTTATTTGTTAGGTTGmCGTTGGGTTAGm
 CGTAGTAAGTGGGGTTGGTmCGTTATTTmCGTTGTATTmCGGTmC
 GmCGTTTmCGGGTTTmCGTGmCGTTTTmCGTTTTAG (SEQ ID
 NO.:1).

[00195] Depois do tratamento do DNA genômico natural, ou um fragmento do mesmo, com um ou mais reagentes para converter as bases citosina não metiladas do mesmo em uracila (por exemplo, por bissulfito) ou outra base que seja detectavelmente diferente da citosina em termos de propriedades de hibridização, a sequência convertida do gene NDRG4 é a seguinte (5' para 3'), mostrando sítios potencialmente metilados marcados pelo sobrescrito "m":

[00196] tgagaagtmcggmccggggmccgmccggatmccgaTmccgggtgtTTTTT
aggTtTmccgmccgtmccgmccgtTTTmccgTtTmccgTTTTtTTmccgTTmccgTTTtTmccg
ggTaTTTTtagTmccgmccgTagaaggmccggaagTTamccgmccgmccgagggaTmccg
mccggtTmccgtTmccgggaTtagTTTTaggTTmccggTaTmccgTTTmccgmccgggTm
ccgagmccgTTTaTaTTmccgTTaaaTTTmccgmccgggTmccgTTTTmccgmccggm
ccgTaTmccgTTTTTtagTT(SEQ ID NO.:2).

[00197] As sequências de DNA compreendendo sítios CpG hipermetilados detalhados na região promotora dos genes BMP3 e NDRG4 na população asiática da presente invenção são particularmente úteis para detectar CRC e/ou AA na população asiática. Por exemplo, os iniciadores e as sondas podem ser desenhados para visar um ou mais sítios de metilação específicos nos genes BMP3 e/ou NDRG4, como ferramentas para determinar o estado e o nível de metilação do BMP3 e/ou do NDRG4 e, assim determinar a condição do tumor em um paciente com necessidade do mesmo.

[00198] Três pares de iniciadores e sondas preferidos para detecção da metilação dos genes BMP3 e NDRG4, respectivamente, e reagentes correspondentes.

[00199] Esta invenção apresenta três pares de iniciadores e sondas preferidos para detecção dos níveis de metilação dos genes BMP3 e NDRG4, respectivamente. Esses iniciadores e sondas são desenhados para visar sítios CpG metilados de alta frequência na

população asiática (por exemplo, a população chinesa).

[00200] Estes pares de iniciadores e sondas específicos preferidos têm sensibilidade e especificidade surpreendentemente mais altas para detectar CRC e AA, principalmente para detectar AA na população asiática, comparados a produtos comerciais existentes tal como Cologuard®.

[00201] As sequências dos iniciadores e sondas são as seguintes:

Gene	Grupo	Iniciador/ Sonda	Sequência ID	Sequências (5' para 3')
BMP3	Preferido 1	Iniciador direto	SEQ ID NO.:3	TTTGAAAATATTCGGGTTATATACGTCGC
		Iniciador reverso	SEQ ID NO.:4	ATAAACTCTTCCCAACAACACTACGCGAA
		Sonda	SEQ ID NO.:5	AGCGTTGGAGTGGAGACGGCGTTCG
	Preferido 2	Iniciador direto	SEQ ID NO.:9	AATATTCGGGTTATATACGTCGCGA
		Iniciador reverso	SEQ ID NO.:10	GCAACCTAACAAATAAACTCTTCCCAAA
		Sonda	SEQ ID NO.:11	TGGAGTGGAGACGGCGTTCGTAGCGT
	Preferido 3	Iniciador direto	SEQ ID NO.:15	AATATTCGGGTTATATACGTCGCGATT
		Iniciador reverso	SEQ ID NO.:16	ACTTACTACGCTAACCCAACG
		Sonda	SEQ ID NO.:17	TAGCGTTGGAGTGGAGACGGCGTTCGTA
NDRG4	Preferido 1	Iniciador direto	SEQ ID NO.:6	ATCGATCGGGGTGTTTTTAGGTTTC
		Iniciador reverso	SEQ ID NO.:7	CCTTCTACGCGACTAAAATACCCGAT
		Sonda	SEQ ID NO.:8	CGTCGCGGTTTTTCGTTTCGTTTTTCGTTCT
	Preferido 2	Iniciador direto	SEQ ID NO.:12	GCGGGTGAGAAGTCGGC
		Iniciador reverso	SEQ ID NO.:13	GTAACCTCCGCTTCTACGC
		Sonda	SEQ ID NO.:14	TAGGTTTCGCGTCGCGTTTTTCGTT
	Preferido 3	Iniciador direto	SEQ ID NO.:18	CGGTTTTCGTTTCGTTTTTCG
		Iniciador reverso	SEQ ID NO.:19	AACCTAAAATAATCCCGAACGAACC
		Sonda	SEQ ID NO.:20	TCGTTTATCGGGTATTTTAGTCGCGTAG

[00202] Os oligonucleotídeos da presente invenção permitem vantajosamente a amplificação altamente específica dos sítios CpG hipermetilados na região promotora de BMP3 ou NDRG4 em uma amostra biológica obtida de um paciente asiático.

[00203] Em algumas modalidades, são apresentados oligonucleotídeos que são parcial ou completamente complementares a uma sequência de SEQ ID NOs: 3 a 20.

[00204] Em algumas modalidades, são apresentados oligonucleotídeos que têm uma ou mais modificações em relação a uma sequência de sonda, tal como as SEQ ID NOs: 5, 11, 17, 8, 14, e 20. Em algumas modalidades, a modificação pode ocorrer na extremidade 5' e/ou na extremidade 3' de uma das sequências de nucleotídeos mencionadas nas SEQ ID NO.: 5, 11, 17, 8, 14, e 20.

[00205] Exemplos de porções base modificadas que podem ser usadas para modificar nucleotídeos em qualquer posição de sua estrutura incluem, porém sem limitação: 5-fluorouracila, 5-bromouracila, 5-clorouracila, 5-iodouracila, hipoxantina, xantina, acetilcitosina, 5-(carbóxi-hidroxi)metila uracila, 5-carboximetilaminometil-2-tiouridina, 5-carboximetilaminometiluracila, di-hidrouracila, beta-D-galactosilqueosina, inosina, N-6-sopenteniladenina, 1-metilguanina, 1-metilinosina, 2,2-dimetilguanina, 2-metiladenina, 2-metilguanina, 3-metilcitosina, 5-metilcitosina, N6-adenina, 7-metilguanina, 5-metilaminometiluracila, metoxiarninometil-2-tiouracila, beta-D-masculinonossilqueosina, 5'-metoxycarboximetiluracila, 5-metoxiuracila, 2-metiltio-N6-isopenteniladenina, ácido uracil-5-oxiacético, pseudouracila, queosina, 2-tiocitosina, 5-metil-2-tiouracila, 2-tiouracila, 4-tiouracila, 5-metiluracila, éster metílico de ácido uracil-5-oxiacético, ácido uracil-S-oxiacético, 5-metil-2-tiouracila, 3-(3-amino-3-N-2-carboxipropila) uracila, e 2,6-diaminopurina entre outros.

[00206] Exemplos de porções açúcar modificadas que podem ser usadas para modificar nucleotídeos em qualquer posição de sua estrutura incluem, porém sem limitação: arabinose, 2-fluoroarabinose, xilose, e hexose, ou um componente modificado do esqueleto fosfato, tal como um fosforotioato, a fosforoditioato, um fosforamidotioato, um fosforamidato, um fosfordiamidato, um metilfosfonato, um alquil fosfotriéster, ou um formacetal ou um análogo dos mesmos.

[00207] Em algumas modalidades, um oligonucleotídeo em uma sequência de SEQ ID NOs: 5, 11, 17, 8, 14, e 20 é substituído por nucleotídeo não natural, tal como um ácido nucleico artificial. Ácidos nucleicos artificiais incluem, porém sem limitação, ácido nucleico peptídico (PNA), morfolino, ácido nucleico bloqueado (LNA), glicol ácido nucleico (GNA) e treose-ácido nucleico (TNA). Cada um destes distingue-se do DNA ou RNA de ocorrência natural por alterações no esqueleto da molécula.

[00208] Em algumas modalidades, uma sonda da presente invenção compreende um marcador na extremidade 5' e a sonda.

[00209] Em algumas modalidades, o marcador na extremidade de uma probe compreende um corante fluorescente, tal como um fluoróforo. Conforme usado neste pedido, fluoróforo é um composto químico fluorescente que pode reemitir luz mediante excitação de luz. Os fluoróforos tipicamente contêm diversos grupos aromáticos combinados, ou moléculas planas ou cíclicas com várias ligações π . Fluoróforos orgânicos não proteicos incluem, porém sem limitação, derivados de xanteno (por exemplo, fluoresceína, rodamina, verde do Oregon, eosina, e vermelho do Texas); derivados de cianina (por exemplo, cianina, indocarbocianina, oxacarbocianina, tiacarbocianina, e merocianina), derivados de esquaraína e esquaraínas substituídas no anel (por exemplo, corantes Seta, SeTau, e Square), derivados de naftaleno (por exemplo, derivados de dansil e prodan), derivados de coumarina; derivados de oxadiazol (por exemplo, piridiloxazol, nitrobenzoxadiazol e benzoxadiazol); derivados de antraceno (por exemplo, anthraquinonas, incluindo DRAQ5, DRAQ7 e Laranja CyTRAK); derivados de pireno (azul cascata, etc.), derivados de oxazina (por exemplo, vermelho do Nile, azul do Nile, cresil violeta, oxazina 170, etc.); derivados de acridina (por exemplo, proflavina, laranja de acridina, amarelo de acridina, etc.); derivados de arilmetina

(por exemplo, auramina, violeta cristal, verde malaquita); derivados de tetrapirrol (por exemplo, porfina, ftalocianina, bilirubina). Exemplos particulares incluem, porém sem limitação, VIC, PET, vermelho do Texas, Cy3, Cy5, FAM(6-carboxifluoresceína), HEX (6-carbóxi-2',4,4',5',7,7'-hexaclorofluoresceína), ROX (5(6)-carbóxi-X-rodamina), JOE (6-carbóxi-4',5'-dicloro-21,71-dimetoxifluoresceína), TET (5'-tetracloro-fluoresceína fosforamidita, NED (fluoresceína benzoxanteno), TAMRA (6-carbóxi-N,N,N,N-tetrametilrodamina), FITC (isotiocianato de fluoresceína). Exemplos de fluoróforos particulares que podem ser usados nas sondas reveladas neste pedido são conhecidos pelos especialistas na técnica e incluem aqueles apresentados na Patente US N° 5,866,366 de Nazarenko et al., tais como ácido 4-acetamido-4'-isotiocianatoestilbeno-2,2'-dissulfônico; acridina e derivados tais como acridina e isotiocianato de acridina, ácido 5-(2'-aminoetila)aminonaftaleno-1-sulfônico (EDANS), 4-amino-N-[3-vinilsulfonil]fenil]naftalimida-3,5 dissulfonato (Amarelo VS de Lucifer), N-(4-anilino-1-naftila)maleimida, antranilamida; Amarelo Brilhante; coumarina e derivados tais como coumarina, 7-amino-4-metilcoumarina (AMC, Coumarina 120), 7-amino-4-trifluorometilcoumarina (Coumarina 151); cianossina; 4',6-diaminidino-2-fenilindol (DAPI); 5',5''-dibromopirogalol-sulfoneftaleína (Vermelho de bromopirogalol); 7-dietilamino-3-(4'-isotiocianatofenil)-4-metilcoumarina; penta-acetato de dietilenotriamina; ácido 4,4'-diisotiocianatodi-hidro-estilbeno-2,2'-dissulfônico; ácido 4,4'-diisotiocianatoestilbeno-2,2'-dissulfônico; cloreto de 5-[dimetilamino]naftaleno-1-sulfonil (DNS, cloreto de dansila); 4-dimetilaminofenilazofenil-4'-isotiocianato (DABITC); eosina e derivados tais como eosina e isotiocianato de eosina; eritrosina e derivados tais como eritrosina B e isotiocianato de eritrosina; etídio; fluoresceína e derivados tais como 5-carboxifluoresceína (FAM), 5-(4,6-diclorotriazin-

2-ila)aminofluoresceína (DTAF), 2'7'-dimetoxi-4'5'-dicloro-6-carboxifluoresceína (JOE), fluoresceína, isotiocianato de fluoresceína (FITC), QFITC (XRITC), -6-carbóxi-fluoresceína (HEX), e TET (tetrametil fluoresceína); fluorescamina; IR144; IR1446; isotiocianato de verde de Malaquita; 4-metilumbeliferona; orto cresolftaleína; nitrotirosina; pararosanilina; Vermelho de fenol; B-ficoeritirina; o-ftaldialdeído; pireno e derivados tais como pireno, butirato de pireno e butirato de succinimidil 1-pireno, Vermelho Reativo 4 (CIBACRON™ Vermelho Brilhante 3B-A); rodamina e derivados tais como 6-carbóxi-X-rodamina (ROX), 6-carboxi-rodamina (R6G), lissamine rodamina B sulfonyl chloride, rodamina (Rhod), rodamina B, rodamina 123, rodamina X isotiocianato, N,N,N',N'-tetrametil-6-carboxi-rodamina (TAMRA), tetrametil rodamina, e isotiocianato de tetrametil rodamina (TRITC); sulforodamina B; sulforodamina 101 e derivado do tipo cloreto de sulfonila de sulforodamina 101 (Vermelho do Texas); riboflavina; derivados de ácido rosólico e quelato de térbio; Vermelho LightCycler 640; Cy5,5; e Cy56-carboxifluoresceína; difluoreto de boro dipirrometeno (BODIPY); acridina; estilbeno; 6-carbóxi-X-rodamina (ROX); Cy3; Cy3,5, Cy5, Cy5,5, VIC® (Applied Biosystems); Vermelho LC 640; Vermelho LC 705; OregonGreen™; CALRed™; Vermelho 640; e Amarelo Yakima; LighterCycler®Cyan500; LighterCycler®; Vermelho 610; Alexa 647; Alexa 555; ácido 5-(2-aminoetila)amino-1-naftaleno sulfônico (EDANS); tetrametil rodamina (TMR); isocianato de tetrametil rodamina (TMRITC), isocianato de fluoresceína (FITC), χ -rodamina, derivados dos mesmos, ou qualquer combinação dos mesmos, entre outros. Corantes fluorescentes adicionais estão descritos nas Patentes US N°: 5866366, 6818431, 6056859, 9140688, 9581587, 6165765, 6485909, 8158358, 7625723, 7560236, 7867701, 9150912, 7960543, 6555383, 6881570, 8198026, 5625081, 8445291, 9194801, 8835110, 7893227, 9243289, 7427674, 9512493, Publicação de Pedido de

Patente US N°: 20170152552, 20030170672, 20160281151, 20130084558, 20060281100, 20140234833, 20150072340, 20050089910, 20090081677, 2014002402220180171393, 20060188886, 20010018185, 20110151446, e WO/2000/017330A1, WO/2008/030071A1, WO/2013/049631A1, WO/2016/179090A1, WO/2016/123895A1, WO/2003/079022A1, cada uma delas estando aqui incorporada em sua íntegra a título de referência.

[00210] Em algumas modalidades, uma sonda da presente invenção compreende um doador fluorescente e um fluoróforo aceptor. Conforme usado neste pedido, um fluoróforo aceptor (por exemplo, um “extintor fluorescente”), é um fluoróforo que absorve energia de um fluoróforo doador, por exemplo, na faixa de cerca de 400 a 900 nm. Os fluoróforos aceptores geralmente absorvem luz em um comprimento de onda que normalmente é pelo menos 10 nm alto (tal como pelo menos 20 nm mais alto) que o comprimento de onda de absorvância máximo do fluoróforo doador. Os fluoróforos aceptores têm um espectro de excitação que se sobrepõe ao espectro de emissão do fluoróforo doador, de modo que a energia emitida pelo doador pode excitar o extintor. Quaisquer fluoróforos aceptores conhecidos no estado da técnica podem ser utilizados. Em um exemplo particular, um fluoróforo aceptor é um extingor escuro, tal como Dabcyl, QSY7 (Molecular Probes), QSY9 (Molecular Probes), QSY21 (Molecular Probes), QSY33 (Molecular Probes), BLACK HOLE QUENCHERS™ (Glen Research, por exemplo, BHQ-1, BHQ-2, BHQ-3), ECLIPSE™ Dark Quencher (Epoch Biosciences), DDQ-I, DDQ-II, Dabcyl, Eclipse, ou IOWA BLACK™ (Integrated DNA Technologies, por exemplo, Iowa Black FQ, Iowa Black RQ). Extintores fluorescentes adicionais estão descritos na Patente US N°: 9957546, US9274008, Publicação de Patente US N°: 20140295422, 20090042205, 20160281182, 20180142284, 20140147929, e WO/2009/009615A1,

WO/2016/160572A1, WO/2016/178953A1, WO/2018/229663A1, WO/2010/051544A2, WO/2013/152220A2, cada uma delas estando aqui incorporada em sua íntegra a título de referência. Um extintor pode reduzir ou extinguir a emissão de um fluoróforo doador. Neste exemplo, em vez de detectar um aumento no sinal de emissão do fluoróforo acceptor quando suficientemente próximo ao fluoróforo doador (ou detectar uma redução no sinal de emissão do fluoróforo acceptor quando a uma distância significativa do fluoróforo doador), um aumento no sinal de emissão do fluoróforo doador pode ser detectado quando o extintor está a uma distância significativa do fluoróforo doador (ou uma redução no sinal de emissão do fluoróforo doador quando suficientemente próximo ao fluoróforo acceptor do extintor).

[00211] Em algumas modalidades, os iniciadores e as sondas da presente invenção baseiam-se em transferência de energia de ressonância por fluorescência (FRET). Exemplos de oligonucleotídeos usando FRET que podem ser usados para detectar amplicons incluem oligossondas lineares, tais como HybProbes, oligossondas de 5' nuclease, tais como sondas TAQMAN®, oligossondas do tipo grampo de cabelo, tais como faróis moleculares, iniciadores de escorpião e UniPrimers, sondas de ligação de sulco menor, e amplicons auto-fluorescentes, tais como iniciadores de Sunrise.

[00212] Em algumas modalidades, os iniciadores e/ou as sondas da presente invenção são marcados com outras entidades funcionais, tal como biotina, haptenos, antígenos, grupos químicos, substâncias radioativas, marcadores enzimáticos, etc. A detecção de um produto de amplificação marcado pode ser efetuada, por exemplo, por métodos de fluorescência, métodos de quimioluminescência, métodos de densitometria, métodos de fotometria, reações de precipitação, reações enzimáticas incluindo reações enzimáticas de reforço, métodos de SPR (“ressonância de plasmon de superfície”), métodos

de elipsometria, medição do índice de refração, medição da reflectância e métodos similares.

[00213] Em algumas modalidades, os iniciadores e as sondas descritos neste pedido podem ser usados em uma PCR quantitativa para determinar o estado e o nível de metilação no gene BMP3 e/ou NDRG4 em um paciente. Em algumas modalidades, uma reação adicional pode ser incluída para amplificar um ou mais genes de referência. Em algumas modalidades, o gene de referência é um gene em um paciente cuja atividade não seria afetada pela presença ou ausência de CRC e AA, e não seria afetada pelo estado e nível de metilação do BMP3 e do NDRG4. Em algumas modalidades, os genes de referência incluem, porém sem limitação, β -globina (HBB), telomerase (TERT), gliceraldeído-3-fosfato desidrogenase (GAPDH), albumina (ALB), β -actina (ACTB), microglobulina Beta 2 (B2M), e receptor γ de células T (TRG).

[00214] Em algumas modalidades, o gene B2M é usado como um gene de referência na PCR quantitativa para detecção do estado e nível de metilação do BMP3/NDRG4.

[00215] Em algumas modalidades, é possível introduzir um ou mais outros controles, incluindo, porém sem limitação, controle sem gabarito (para detectar contaminação do reagente ou do equipamento e para confirmar resultados positivos); controle sem amplificação (para detectar fluorescência de fundo gerado por sondas marcadas degradadas), e controle positivo (para detectar inibidores ou mau funcionamento, e para confirmar que os reagentes e o equipamento estão funcionando).

[00216] Em algumas modalidades, usa-se uma qPCR para determinar se há metilação do gene BMP3 metilado ou do gene NDRG4 metilado na amostra. O sinal detectado a partir da sonda de BMP3 ou NDRG4 é quantificado seja em relação a uma curva padrão

ou por comparação dos valores de Ct com aquele de um gene de referência. Análise de genes zeladores geralmente é usada para normalizar os resultados. O limiar de ciclo (Ct) é definido como o número de ciclos necessários para o sinal fluorescente atravessar um limiar predeterminado (por exemplo, excedendo o nível de fundo, tal como excedendo o nível de amplificação em uma amostra controle negativo). Em algumas modalidades, o limiar é determinado automaticamente pelo software do instrumento de qPCR ou outros métodos adequados. Em algumas modalidades, o limiar é fixado logo acima (por exemplo, cerca de 0,01%, 0,1%, 1%, 5%, ou 10% maior) do valor fluorescente terminal em uma amostra controle negativo.

[00217] Em algumas modalidades, quando o valor Ct associado à amplificação de BMP3 ou de NDRG4 em uma amostra de teste não é maior que (\leq) cerca de 35, 34, 33, 32, 31, 30, ou menos, determina-se que a amostra contém BMP3 ou NDRG4 metilado, e o paciente tem CRC e/ou AA (resultado positivo), do contrário, determina-se que a amostra não contém BMP3 ou NDRG4 metilado, e o paciente não tem CRC ou AA (resultado negativo). Para a amplificação do gene de referência, quando o valor de Ct associado à amplificação de um gene de controle na amostra não é maior que (\leq) cerca de 34, 33, 32, 31, 30, 29 ou menos, determina-se que a amplificação do gene de referência é positiva, do contrário, determina-se que a amplificação do gene de referência é negativa. Quando se determina que a amplificação do gene de referência é negativa, o resultado do exame é invalidado.

[00218] Em algumas modalidades, a diferença entre o valor de Ct associado ao BMP3 é comparada com o valor de Ct associado à amplificação do gene de referência ($\Delta Ct = Ct_{\text{gene de interesse}} - Ct_{\text{gene de referência}}$) e representada por $\Delta Ct1$. Em algumas modalidades, quando $\Delta Ct1$ não é maior que um valor crítico predeterminado (\leq o valor

crítico), determina-se então que a amostra tem metilação de BMP3 (resultado positivo), e determina-se que o paciente tem CRC ou AA. Em algumas modalidades, quando $\Delta Ct1$ é maior que um valor crítico predeterminado ($>$ o valor crítico), e determina-se então que a amostra não tem metilação de BMP3 (resultado negativo), e determina-se que o paciente é saudável. Em algumas modalidades, o valor crítico é o valor de ΔCt correspondente para uma amostra compreendendo 5ng/ μ L de sequência de nucleotídeos com um índice de metilação de 1%, tal como cerca de 8, 9, ou 10.

[00219] Em algumas modalidades, a diferença entre o valor de Ct associado ao NDRG4 é comparada com o valor de Ct associado à amplificação do gene de referência ($\Delta Ct = Ct_{\text{gene de interesse}} - Ct_{\text{gene de referência}}$) e representada por $\Delta Ct2$. Em algumas modalidades, quando $\Delta Ct2$ não é maior que um valor crítico predeterminado (\leq o valor crítico), determina-se então que a amostra tem metilação de NDRG4 (resultado positivo), e determina-se que o paciente tem CRC ou AA. Em algumas modalidades, quando $\Delta Ct2$ é maior que um valor crítico predeterminado ($>$ o valor crítico), determina-se então que a amostra não tem metilação de NDRG4 (resultado negativo), e determina-se que o paciente é saudável. Em algumas modalidades, o valor crítico é o valor de ΔCt correspondente para uma amostra compreendendo 5ng/ μ L de sequência de nucleotídeos com um índice de metilação de 1%, tal como cerca de 8, 9, ou 10.

[00220] Iniciadores e sondas preferidos da presente invenção apresentam sensibilidade e especificidade surpreendentemente altas para detectar CRC e AA na população asiática, principalmente para detecção de AA, em comparação com produtos comerciais existentes tal como Cologuard®.

[00221] Conforme usado neste pedido, o termo “sensibilidade” refere-se ao índice quando pacientes tendo efetivamente CRC e/ou AA

em uma dada população são corretamente detectados. Em algumas modalidades, a sensibilidade é de pelo menos cerca de 65%, pelo menos cerca de 70%, pelo menos cerca de 75%, pelo menos cerca de 80%, pelo menos cerca de 85%, pelo menos cerca de 86%, pelo menos cerca de 87%, pelo menos cerca de 88%, pelo menos cerca de 89%, pelo menos cerca de 90%, pelo menos cerca de 91%, pelo menos cerca de 92%, pelo menos cerca de 93%, pelo menos cerca de 94%, pelo menos cerca de 95%, pelo menos cerca de 96%, pelo menos cerca de 97%, pelo menos cerca de 98%, pelo menos cerca de 99%, ou mais, ou 100%. Em algumas modalidades, o tamanho da população é de pelo menos cerca de 50, 100, 200, 300, 400, 500, 600, 700, 800, 900, 1000, 2000, 3000, 4000, 5000, 6000, 7000, 8000, 9000, 10.000, ou mais.

[00222] Conforme usado neste pedido, o termo “especificidade” refere-se ao índice quando pacientes não tendo efetivamente CRC ou AA em uma dada população são corretamente diagnosticados como não tendo a condição. Em algumas modalidades, a especificidade é de pelo menos cerca de 85%, pelo menos cerca de 86%, pelo menos cerca de 87%, pelo menos cerca de 88%, pelo menos cerca de 89%, pelo menos cerca de 90%, pelo menos cerca de 91%, pelo menos cerca de 92%, pelo menos cerca de 93%, pelo menos cerca de 94%, pelo menos cerca de 95%, pelo menos cerca de 96%, pelo menos cerca de 97%, pelo menos cerca de 98%, pelo menos cerca de 99%, ou mais, ou 100%. Em algumas modalidades, o tamanho da população é de pelo menos cerca de 50, 100, 200, 300, 400, 500, 600, 700, 800, 900, 1000, 2000, 3000, 4000, 5000, 6000, 7000, 8000, 9000, 10.000, ou mais.

[00223] Como demonstrado nos Exemplos, os iniciadores e sondas preferidos apresentam sensibilidade e especificidade surpreendentemente altas para detectar metilação dos genes BMP3 e

NDRG4, e, portanto, resultam em sensibilidade e especificidade surpreendentemente altas para detectar CRC e/ou AA. Por exemplo, a sensibilidade para detecção de CRC com os três pares de iniciadores e sondas preferidos do gene BMP3 é de pelo menos 85%; a sensibilidade para detecção de CRC com os três pares de iniciadores e sondas preferidos do gene NDRG4 é de pelo menos 90%; a sensibilidade para detecção de AA com os três pares de iniciadores e sondas preferidos do gene BMP3 é de pelo menos 66%; a sensibilidade para detecção de AA detection com os três pares de iniciadores e sondas preferidos do gene NDRG4 é de pelo menos 73%. Ainda, a especificidade para detecção de CRC e AA com os três pares de iniciadores e sondas preferidos do gene BMP3 é de cerca de 97%-100% (por exemplo, pelo menos cerca de 97,8%); a especificidade para detecção de CRC e AA com os três pares de iniciadores e sondas preferidos do gene NDRG4 também é de cerca de 97%-100% (por exemplo, pelo menos cerca de 97,8%).

Três grupos de combinações preferidas de iniciadores-sonda para detecção de CRC e/ou AA nos pacientes.

[00224] A presente invenção também apresenta três grupos de combinações preferidas de iniciadores e sonda para detectar os níveis de metilação dos genes BMP3 e NDRG4, a fim de determinar a presença ou ausência de CRC or AA em um paciente. Estas combinações específicas têm sensibilidade e especificidade surpreendentemente mais altas para detectar CRC e AA na população asiática, principalmente para detectar AA, quando comparadas aos produtos comerciais existentes tal como Cologuard®.

[00225] As sequências dos três grupos de iniciadores e sondas preferidos são as seguintes:

Combinação N°	Gene	Grupo	Iniciadores/Sondas	Sequência ID	Sequência (5' para 3')
4	BMP3	Preferido 1	Iniciador direto	SEQ ID NO.:3	TTTGAAAATATTCGGGTTATATACGTC GC
			Iniciador reverso	SEQ ID NO.:4	ATAAACTCTTCCCCAACAACTACGCGA A
			Sonda	SEQ ID NO.:5	AGCGTTGGAGTGGAGACGGCGTTTCG
	NDRG 4	Preferido 1	Iniciador direto	SEQ ID NO.:6	ATCGATCGGGGTGTTTTTAGGTTTC
			Iniciador reverso	SEQ ID NO.:7	CCTTCTACGCGACTAAAATACCCGAT
			Sonda	SEQ ID NO.:8	CGTCGCGGTTTTTCGTTCTTTTTTCGT TCGT
5	BMP3	Preferido 1	Iniciador direto	SEQ ID NO.:3	TTTGAAAATATTCGGGTTATATACGTC GC
			Iniciador reverso	SEQ ID NO.:4	ATAAACTCTTCCCCAACAACTACGCGA A
			Sonda	SEQ ID NO.:5	AGCGTTGGAGTGGAGACGGCGTTTCG
	NDRG 4	Preferido 2	Iniciador direto	SEQ ID NO.:12	GCGGGTGAGAAGTCGGC
			Iniciador reverso	SEQ ID NO.:13	GTAACCTCCGCCTTCTACGC
			Sonda	SEQ ID NO.:14	TAGGTTTCGCGTCGCGGTTTTTCGTT
7	BMP3	Preferido 2	Iniciador direto	SEQ ID NO.:9	AATATTCGGGTTATATACGTCGCGA
			Iniciador reverso	SEQ ID NO.:10	GCAACCTAACAAATAAACTCTTCCCCA A
			Sonda	SEQ ID NO.:11	TGGAGTGGAGACGGCGTTTCGTAGCG T
	NDRG 4	Preferido 1	Iniciador direto	SEQ ID NO.:6	ATCGATCGGGGTGTTTTTAGGTTTC
			Iniciador reverso	SEQ ID NO.:7	CCTTCTACGCGACTAAAATACCCGAT
			Sonda	SEQ ID NO.:8	CGTCGCGGTTTTTCGTTCTTTTTTCGT TCGT

[00226] Como demonstrado nos Exemplos, as combinações preferidas de grupos de iniciadores-sonda de BMP3 e NDRG4 apresentam sensibilidade e especificidade surpreendentemente altas para detectar metilação de BMP3 e NDRG4, e, por conseguinte, resultam em sensibilidade e especificidade surpreendentemente altas para detectar CRC e/ou AA. Em algumas modalidades, esta sensibilidade e especificidade são obtidas quando o mesmo ensaio também inclui análise do gene KRAS e exame de hemoglobina, como explicado no Exemplo 5. por exemplo, a sensibilidade geral de detecção de CRC com as três combinações preferidas de iniciadores e

sondas dos genes BMP3 e NDRG4 combinada com análise do gene KRAS e com o exame de hemoglobina é de pelo menos 95%; a sensibilidade de detecção de AA com as três combinações preferidas de iniciadores e sondas dos genes BMP3 e NDRG4 combinada com análise do gene KRAS e com o exame de hemoglobina é de pelo menos 93%; a sensibilidade de detecção de CRC + AA com as três combinações preferidas de iniciadores e sondas dos genes BMP3 e NDRG4 combinada com análise do gene KRAS e com o exame de hemoglobina é de pelo menos 97%; a especificidade de detecção de CRC+ AA com as três combinações preferidas de iniciadores e sondas dos genes BMP3 e NDRG4 combinada com análise do gene KRAS e com o exame de hemoglobina é de pelo menos 97%.

Kit para detecção de CRC e AA

[00227] A presente invenção apresenta kits para detecção de metilação do BMP3/NDRG4, e/ou para detecção de CRC/AA em um paciente com necessidade do mesmo. Em algumas modalidades, os kits são particularmente adequados para pacientes asiáticos, tais como pacientes chineses.

[00228] Em algumas modalidades, este kit compreende: (1) pelo menos um dos três grupos de combinações preferidas de iniciadores e sonda para detecção de CRC e AA (Combination Nos. 4, 5, e 7 na Tabela 20), e reagentes de qPCR correspondentes; (2) um meio para detectar sete mutações na região codificadora do gene KRAS (i.e., G12D, G13D, G12V, G12C, G12S, G12A e G13R), tais como iniciadores e sondas adequados, e reagentes de qPCR correspondentes; (3) um meio para detectar hemoglobina em uma amostra de fezes, tal como reagentes baseados na tecnologia FIT (por exemplo, um anticorpo anti-hemoglobina, e reagentes para detectar o complexo formado pelo anticorpo e hemoglobina na amostra de fezes).

[00229] Em algumas modalidades, o kit compreende pelo menos

um grupo da combinação iniciador-sonda preferida abaixo:

Os três grupos de combinações preferidas de iniciadores e sonda são os seguintes:

NO.	Gene	Grupo	Iniciador/Sonda	Sequência ID	Sequência (5' para 3')
4	BMP3	Preferido 1	Iniciador direto	SEQ ID NO.:3	TTTGAAAATATTCGGGTTATATACGTCGC
			Iniciador reverso	SEQ ID NO.:4	ATAAACTCTCCCAACAACACTACGCGAA
			Sonda	SEQ ID NO.:5	AGCGTTGGAGTGGAGACGGCGTTCG
	NDRG 4	Preferido 1	Iniciador direto	SEQ ID NO.:6	ATCGATCGGGGTGTTTTTAGGTTTC
			Iniciador reverso	SEQ ID NO.:7	CCTTCTACGCGACTAAAATACCCGAT
			Sonda	SEQ ID NO.:8	CGTCGCGGTTTTTCGTTCTTTTTTCGTTCT
5	BMP3	Preferido 1	Iniciador direto	SEQ ID NO.:3	TTTGAAAATATTCGGGTTATATACGTCGC
			Iniciador reverso	SEQ ID NO.:4	ATAAACTCTCCCAACAACACTACGCGAA
			Sonda	SEQ ID NO.:5	AGCGTTGGAGTGGAGACGGCGTTCG
	NDRG 4	Preferido 2	Iniciador direto	SEQ ID NO.:12	GCGGGTGAGAAAGTCGGC
			Iniciador reverso	SEQ ID NO.:13	GTAACCTCCGCCTTCTACGC
			Sonda	SEQ ID NO.:14	TAGGTTTCGCGTCGCGGTTTTTCGTT
7	BMP3	Preferido 2	Iniciador direto	SEQ ID NO.:9	AATATTCGGGTTATATACGTCGCGA
			Iniciador reverso	SEQ ID NO.:10	GCAACCTAACAATAAACTCTTCCCAAA
			Sonda	SEQ ID NO.:11	TGGAGTGGAGACGGCGTTCGTAGCGT
	NDRG 4	Preferido 1	Iniciador direto	SEQ ID NO.:6	ATCGATCGGGGTGTTTTTAGGTTTC
			Iniciador reverso	SEQ ID NO.:7	CCTTCTACGCGACTAAAATACCCGAT
			Sonda	SEQ ID NO.:8	CGTCGCGGTTTTTCGTTCTTTTTTCGTTCT

Reagentes para PCR quantitativa triplex para detecção do nível de metilação dos genes BMP3 e NDRG4.

[00230] Em algumas modalidades, os kits compreendem reagentes para a realização de uma PCR multiplex para detectar metilação de BMP3 e NDRG4 ao mesmo tempo. Em algumas modalidades, a PCR multiplex é uma PCR quantitativa.

[00231] Em algumas modalidades, os reagentes incluem Taq DNA polimerase. Em algumas modalidades, a concentração final de Taq

DNA polimerase é de cerca de 2U/reacção. Em algumas modalidades, os reagentes incluem $MgCl_2$. Em algumas modalidades, a concentração final de $MgCl_2$ na reacção é de 2mM. Em algumas modalidades, os reagentes incluem dNTPs. Em algumas modalidades, a dNTP tem uma concentração final de 0,2mM. Em algumas modalidades, os reagentes incluem cerca de 0,5mM a 0,75mM de iniciadores de amplificação dos genes BMP3, NDRG4 e de referência. Em algumas modalidades, os reagentes incluem cerca de 0,1mM a 0,25mM de sondas hibridizadas para sequências de DNA dos genes BMP3, NDRG4 e de referência. Em algumas modalidades, os reagentes incluem ainda tampão de PCR, tal como tampão de PCR concentrado (por exemplo, 5x ou 10x), que pode ser diluído até a concentração final de 1x. Em algumas modalidades, B2M é o gene de referência e é amplificado para controle de qualidade em uma PCR quantitativa.

Iniciadores e sondas para detecção de sete mutações na região codificadora do gene KRAS.

[00232] Em algumas modalidades, os kits compreendem um meio para detectar mutações no gene KRAS. Em algumas modalidades, os kits compreendem iniciadores e sondas que são desenhados para amplificar e detectar sete pontos mutantes no Exon 12 e no Exon 13 na região de leitura aberta do gene KRAS, que são G12D, G13D, G12V, G12C, G12S, G12A, e G13R. Em algumas modalidades, as sequências dos iniciadores e sondas são as seguintes:

Nome	Iniciador/Sonda	Sequência ID	Sequências (5' para 3')
G12D-F	Iniciador direto	SEQ ID NO.:35	AACTTGTGGTAGTTGGAGGTGA
G13D-F	Iniciador direto	SEQ ID NO.:36	AACTTGTGGTAGTTGGAGCTGGGGA
G12V-F	Iniciador direto	SEQ ID NO.:37	AACTTGTGGTAGTTGGAGTTGT
G12C-F	Iniciador direto	SEQ ID NO.:38	AAACTTGTGGTAGTTGGGCTT
G12S-F	Iniciador direto	SEQ ID NO.:39	AAACTTGTGGTAGTTGGTGCTA
G12A-F	Iniciador direto	SEQ ID NO.:40	AACTTGTGGTAGTTGGAGCAGC
G12R-F	Iniciador direto	SEQ ID NO.:41	AAACTTGTGGTAGTTGGAGCTC

Nome	Iniciador/Sonda	Sequência ID	Sequências (5' para 3')
Kras-R	Iniciador reverso	SEQ ID NO.:42	GAATGGTCCTGCACCAGTAATATG
ACTB-F	Iniciador direto	SEQ ID NO.:43	AGGGCTTCTTGTCTTTCCTT
ACTB-R	Iniciador reverso	SEQ ID NO.:44	CGTGCTCGATGGGGTACTTC
KRAS-P	Sonda	SEQ ID NO.:45	AGGCAAGAGTGCCCTTGACGATACAGC
ACTB-P	Sonda	SEQ ID NO.:46	CGTGATGGTGGGCATGGGTCAGAAGGA

Reagentes para PCR quantitativa multiplex para detecção de mutações em códons do gene KRAS.

[00233] Também é apresentado um sistema de PCR quantitativa multiplex para detecção de todas as sete mutações do gene KRAS. Em algumas modalidades, uma reação de PCR quantitativa multiplex compreende Taq DNA polimerase com uma concentração final de 2,5U/reação, MgCl₂ com uma concentração final de 1mM, dNTPs com uma concentração final de 0,1mM, 0,3-0,9µM de iniciadores para amplificação dos genes KRAS e ACTB, 0,05-0,1µM de sondas hibridizadas para sequências de DNA dos genes KRAS e ACTB, e 1× tampão de PCR buffer. ACTB é um gene de referência e é amplificado para controle de qualidade em PCR quantitativa.

Kit de detecção de hemoglobina nas fezes

[00234] Em algumas modalidades, os kits compreendem reagentes para detectar hemoglobina. Em algumas modalidades, a hemoglobina é testada qualitativamente pelo ensaio imunoabsorvente ligado à enzima (ELISA).

Modelo de regressão logística

[00235] Em algumas modalidades, depois de ter os resultados do exame de metilação de BMP3/NDRG4, do exame de mutação KRAS, e do exame de hemoglobina, todos os resultados são compilados e submetidos a um modelo de regressão logística, a fim de determinar a presença ou ausência de CRC e/ou AA nos pacientes.

[00236] Em algumas modalidades, o método compreende calcular o valor de um índice de abrangência de câncer P, onde $P = e^k / (1 + e^k)$, onde e é a constante natural.

[00237] Em algumas modalidades, K é definido como $K=a*\Delta Ct1+b*\Delta Ct2+c*\Delta Ct3+d*FIT+X$, onde a, b, c, d, X são constantes clínicas. $\Delta Ct1$, $\Delta Ct2$ e $\Delta Ct3$ são valores de Ct de BMP3, NDRG4 e KRAS subtraído do valor dos genes de referência.

[00238] Em algumas modalidades, quando o valor de P é maior ou igual ao limiar predeterminado, o resultado do exame é positivo, do contrário, é negativo. Um resultado positivo indica que é possível que a pessoa tenha CRC ou AA, do contrário, ela é saudável.

Métodos de tratamento

[00239] Os métodos da presente invenção em algumas modalidades compreendem tratar os pacientes com necessidade do mesmo depois de os pacientes serem classificados como tendo câncer colorretal e/ou adenoma. Em algumas modalidades, o tratamento inclui, porém sem limitação, cirurgia, quimioterapia, radioterapia, imunoterapia, cuidado paliativo, exercício.

[00240] Conforme usado neste pedido a frase “regime de tratamento” refere-se a um plano de tratamento que especifica o tipo de tratamento, a dosagem, o cronograma e/ou a duração de um tratamento oferecido a um indivíduo com necessidade do mesmo (por exemplo, um indivíduo diagnosticado com uma patologia). O regime de tratamento selecionado pode ser um regime agressivo que se espera resultar no melhor desfecho clínico (por exemplo, cura completa da patologia) ou uma cura mais moderada que pode aliviar sintomas da patologia e ainda resultar em cura incompleta da patologia. Perceber-se-á que em certos casos o regime de tratamento pode ser associado a algum desconforto para o indivíduo ou a efeitos colaterais adversos (por exemplo, danos às células ou tecido saudáveis). O tipo de tratamento pode incluir uma intervenção cirúrgica (por exemplo, remoção da lesão, das células doentes, do tecido, ou do órgão), uma terapia de reposição celular, a administração de uma droga terapêutica

(por exemplo, agonistas de receptores, antagonistas, hormônios, agentes quimioterapêuticos) de forma local ou sistêmica, uma exposição à radioterapia usando uma fonte externa (por exemplo, raios externos) e/ou uma fonte interna (por exemplo, braquiterapia) e/ou qualquer combinação destes. A dosagem, o cronograma e a duração do tratamento podem variar, dependendo da severidade da patologia e do tipo de tratamento selecionado, e os especialistas na técnica conseguem ajustar o tipo de tratamento à dosagem, cronograma e duração do tratamento.

[00241] Em algumas modalidades, os tratamentos incluem, porém sem limitação, fluorouracila, capecitabina, oxaliplatina, irinotecano, UFT, FOLFOX, FOLFOXIRI, e FOLFIRI, drogas antiangiogênicas tais como bevacizumab, e inibidores do receptor do fator de crescimento epidérmico (por exemplo, cetuximab e panitumumab).

Vantagens da presente invenção

[00242] Sem querermos nos ater a qualquer teoria em particular, a presente invenção apresenta pelo menos as seguintes vantagens:

[00243] Os sítios CpG metilados detalhados das regiões promotoras dos genes BMP3 e NDRG4 na população chinesa são apresentados e podem servir como biomarcador para detectar CRC e/ou AA.

[00244] O kit é mais adequado para detecção de CRC e AA na população chinesa do que outros produtos similares à base de on mt-sDNA, tal como Cologuard®, uma vez que a presente invenção visa sítios CpG metilados específicos da população chinesa, ao passo que os produtos anteriores são voltados para a população caucasiana.

[00245] A sensibilidade e a especificidade para detecção de CRC são mais altas em comparação com outros produtos similares à base de mt-sDNA.

[00246] A sensibilidade e a especificidade para detecção de AA são

significativamente mais altas em comparação com outros produtos similares à base de mt-sDNA.

[00247] O método é não invasivo e de fácil amostragem em casa, levando, portanto, à boa aceitação do paciente, de modo que ele pode ser amplamente usado como um método de rastreamento CRC e AA. O método reduces the incidence and mortality due to CRC na população asiática.

EXEMPLOS

Exemplo 1

Descoberta de sítios CpG metilados nas regiões promotoras dos genes BMP3 e NDRG4, respectivamente, na população chinesa com CRC e AA.

Coleta de amostras

[00248] Um total de 191 amostras de tecido de FFPE de cólon foram coletadas de pacientes com CRC e AA confirmados por colonoscopia, incluindo 50 tecidos de câncer colorretal e 49 tecidos normais adjacentes pareados, 46 tecidos de adenoma e 46 tecidos normais adjacentes pareados.

Extração de DNA

[00249] DNAs genômicos foram extraídos de amostras de FFPE com o kit de extração de DNA de FFPE TaKaRa MiniBEST t (catálogo número: 9782). As etapas operacionais detalhadas estão descritas a seguir:

[00250] Raspar 30 mg de tecido da seção com parafina com um bisturi estéril e remover o excesso de parafina.

[00251] Colocar o tecido da seção com parafina em um tubo de centrifuga de 1,5 mL, e acrescentar 500 µL de tampão DP, misturar e incubar em água a 80°C por 1 minuto, e então agitar por 10 segundos. Acrescentar 180 µL do tampão GL e agitar.

[00252] A mistura foi centrifugada a 12.000 rpm por 1 minuto à

temperatura ambiente, e em seguida a solução transformou-se em duas camadas (fase oleosa superior, fase aquosa inferior). Acrescentar 20 µL de Proteinase K (20 mg/mL) e 10µL de RNase (10 mg/mL) à fase aquosa inferior, e misturar cautelosamente com uma pipeta para cima e para baixo. Atenção para não perturbar as camadas. E então um banho de água a 56°C por 1 hora.

[00253] A solução da etapa anterior foi incubada a 90°C por 30 minutos e resfriada para a temperatura ambiente. Adicionar então 200 µL de tampão GB e 200 µL de etanol 100% à solução, agitar por 10 segundos. Centrifugar a 12.000 rpm por 1 minuto à temperatura ambiente, e a solução transformou-se em duas camadas (fase oleosa superior, fase aquosa inferior)

[00254] Colocar uma coluna giratória em um tubo de coleta, e introduzir a fase aquosa inferior da etapa anterior na coluna giratória. Atenção para não perturbar as camadas, e centrifugar a 12.000 rpm por 2 minutos à temperatura ambiente, e então descartar os resíduos.

[00255] Acrescentar 500 µL de tampão WA à coluna giratória, e centrifugar a 12.000 rpm por 1 minuto à temperatura ambiente, e então descartar os resíduos.

[00256] Acrescentar 500 µL de tampão WB à coluna giratória, e centrifugar a 12.000 rpm por 1 minuto à temperatura ambiente, e então descartar os resíduos. E repetir uma vez mais.

[00257] Colocar a coluna giratória no tubo de coleta, centrifugar a 12.000 rpm por 2 minutos à temperatura ambiente.

[00258] Colocar a coluna giratória em outro tubo de centrifuga de 1,5 mL, acrescentar 50-100 µL de água esterilizada ou de tampão de eluição ao centro da membrana da coluna giratória, e em seguida colocá-la à temperatura ambiente por 5 minutos.

[00259] Centrifugar a 12.000 rpm por 2 minutos à temperatura ambiente, e o DNA é eluído.

[00260] O DNA eluído é quantificado com o fluorômetro Nanodrop 2000, e armazenado a -20°C para uso.

Previsão de ilhotas CpG nas regiões promotoras dos genes BMP3 e NDRG4 e desenho de iniciadores para sequenciamento de amplicons.

[00261] Previsão de ilhotas CpG das regiões promotoras dos genes BMP3 e NDRG4.

[00262] As sequências promotoras dos genes BMP3 e NDRG4 foram baixadas, incluindo sequências de DNA de aproximadamente 1000-1500 bp a montante do sítio de início de transcrição (TSS) e a região 5'UTR. As ilhotas CpG das sequências foram previstas com o software MethPrimer (www.urogene.org/methprimer/). Como mostrado na Figura 1A até a Figura 1D, as duas maiores das três ilhotas CpG do gene BMP3 estão localizadas a aproximadamente 400 bp a montante do TSS e de toda a região 5'UTR (chr4: 81951752-81952760), e somente uma ilha de CpG do gene NDRG4 fica localizada aproximadamente 500 bp a montante do TSS e de parte da região 5'UTR (chr16:58497061-58497938). A construção do genoma de referência humano é GRCh37/hg19.

[00263] Desenho de iniciadores para amplificar a sequência das ilhotas CpG previstas dos genes BMP3 e NDRG4.

[00264] Com base no comprimento das sequências a serem amplificadas e no comprimento da leitura de sequenciamento, foram desenhados quatro e cinco pares de iniciadores para os genes BMP3 e NDRG4, respectivamente. Há tanta sobreposição quanto possível entre amplicons adjacente de modo que as ilhotas CpG dos dois genes podem ser completamente sequenciadas. Os iniciadores dos dois genes estão listados na Tabela 1, e a posição relativa dos amplicons dos dois genes está mostrada na Figura 1A até a Figura 1D.

Tabela 1 Iniciadores para sequenciamento dos amplicons dos

genes BMP3 e NDRG4

Gene	Amplicon	Iniciador	Sequência ID	Sequência (5' para 3')
BMP3	Amplicon 1	Iniciador direto 1	SEQ ID NO.:47	AGTTTGGTGAAGTTAAGAG
BMP3		Iniciador reverso 1	SEQ ID NO.:48	CTAACTCTATTTTAAACRCCA
BMP3	Amplicon 2	Iniciador direto 2	SEQ ID NO.:49	GTTTTAATTTTTGGAAAAGGTAA
BMP3		Iniciador reverso 2	SEQ ID NO.:50	ACCTAACAAATAAACTCTTCC
BMP3	Amplicon 3	Iniciador direto 3	SEQ ID NO.:51	GAAGGTATAGATAGATTTTGAA
BMP3		Iniciador reverso 3	SEQ ID NO.:52	CACCTAACACAACCTTACRAAACT
BMP3	Amplicon 4	Iniciador direto 4	SEQ ID NO.:53	GTATTTAGTTATGGTTGGGGYGAGTA
BMP3		Iniciador reverso 4	SEQ ID NO.:54	CTCACCTACTACTACCGCCCR
NDRG4	Amplicon 1	Iniciador direto 1	SEQ ID NO.:55	AGGTTTTTGAGTTTTTGGTTTTTTT
NDRG4		Iniciador reverso 1	SEQ ID NO.:56	CCCTCCAAACCCCTATAAC
NDRG4	Amplicon 2	Iniciador direto2	SEQ ID NO.:57	GGATGGGGATGTTTTGTAG
NDRG4		Iniciador reverso 2	SEQ ID NO.:58	RGRGAAACCTAAAAACACC
NDRG4	Amplicon 3	Iniciador direto 3	SEQ ID NO.:59	GYGGAGYGGGTGAGAAGT
NDRG4		Iniciador reverso 3	SEQ ID NO.:60	CRAACAACCAAAAACCCCTC
NDRG4	Amplicon 4	Iniciador direto 4	SEQ ID NO.:61	GTTYGTTYGGGATTAGTTTTAGG
NDRG4		Iniciador reverso 4	SEQ ID NO.:62	CRCAAACRAAAAACRAAAC
NDRG4	Amplicon 5	Iniciador direto 5	SEQ ID NO.:63	GYGGYGTTTTYGTTTTTG
NDRG4		Iniciador reverso 5	SEQ ID NO.:64	CRACRACTAAAAATCCCCAA

[00265] Amostras de DNA foram submetidas a tratamento com bissulfito como descrito abaixo.

Tratamento com bissulfito

[00266] O DNA extraído é colocado à temperatura ambiente para descongelar, e a concentração de DNA é diluída até 20 ng/μL. Acrescentar 40 μL do DNA diluído a um tubo de centrifuga de 1,5 mL, e então acrescentar 4 μL da solução de NaOH 3M, incubar a 42°C por 20 minutos.

[00267] Acrescentar 400 μL of a conversion solution, mix, e incubar

a 50°C por 16 horas no escuro.

[00268] Acrescentar 550 µL de solução de ligação, misturar, e transferir a solução para uma coluna de purificação de DNA. Centrifugar a 13.000 rpm por 90 segundos e descartar os resíduos. Centrifugar mais uma vez por 3 minutos e descartar os resíduos.

[00269] Acrescentar 600 µL de etanol 90% à coluna de purificação de DNA, Centrifugar a 13.000 rpm por 90 segundos, e descartar os resíduos. Centrifugar mais uma vez a 13.000 rpm por 15 segundos.

[00270] Acrescentar 300 µL de solução de dessulfurização (0,3 M NaOH de solução de etanol 90%) à coluna de purificação de DNA, colocar a mesma à temperatura ambiente por 30 minutos. Centrifugar a 13.000 rpm por 90 segundos e descartar os resíduos.

[00271] Acrescentar 600 µL de etanol 90%, centrifugar a 13.000 rpm por 90 segundos, e descartar os resíduos. Repetir esta etapa mais uma vez, e centrifugar mais uma vez a 13.000 rpm por 3 minutos.

[00272] Colocar a coluna de purificação de DNA em outro tubo de centrifuga de 1,5 mL, e acrescentar 40 µL de eluato. Incubar o tubo a 50°C por 30 minutos, e centrifugar a 13.000 rpm por 90 segundos. Armazenar a solução de DNA convertido a -20°C para uso.

Preparação da biblioteca e sequenciamento de amplicons amplificação por PCR multiplex

[00273] Preparar a mistura mestre de PCR da seguinte maneira:

Tabela 2

N°	reagentes	Concentração final
1	2×Mistura Mestre de PCR Multiplex QIAGNE (QIAGEN, Catálogo N°: 206143)	1×
2	10×mistura de iniciadores (2 µM cada)	0,2 µM
3	Água livre de RNase	até 40 µL

[00274] Agitar a mistura delicadamente e pipetar 40 µL da mesma em cada um dos tubos de PCR, e então acrescentar 10 µL de DNA tratado com bissulfato.

[00275] Agitar delicadamente e a amplificação por PCR foi realizada da seguinte maneira: um ciclo de desnaturação a 95°C por 15 minutos, 35 ciclos de desnaturação a 94°C por 30 segundos, têmpera a 55°C por 90 segundos, e alongação a 72°C por 90 segundos, um ciclo de alongação a 72°C por 10 minutos, e por fim manter a 4°C até o fim.

[00276] 5 µL de produtos de PCR foram misturados com 6X tampão de carga (TakaRa, catálogo N°:9156) e carregados em agarose gel 1% (p/v) com um controle de marcador de DNA DL2000 (TakaRa, catálogo N°: 3427Q), e eletroforese a 120V por 40 minutos.

[00277] Se houvesse alguma amplificação inespecífica, era necessário recuperar os 45 µL restantes dos produtos de PCR depois de eletroforese de acordo com as instruções do kit (QIAGEN, catálogo N°: 28704).

(b) Purificação e quantificação dos produtos de PCR

[00278] O produto de PCR foi purificado com o kit de purificação de PCR MinElute PCR de acordo com as instruções do kit (QIAGEN, Catálogo N°: 28004). O produto de PCR purificado foi quantificado com o kit de ensaio Qubit™ dsDNA BR (Catálogo N°: Q32850).

(c) Ligação do adaptador

[00279] Adaptadores foram ligados aos produtos de PCR purificados com o módulo de ligação rápida NEBNext (NEB, Catálogo número: E6056L), e a mistura reacional foi preparada da seguinte maneira:

Tabela 3. Mistura reacional para ligação de adaptadores

N°	Reagentes	Volume (µL)/reação
1	Tampão de reação de ligação rápida NEBNext (5×)	10
2	Adaptador	5
3	Quick T4 DNA Ligase	5
4	Água livre de RNase	10

[00280] Acrescentar 30 µL de mistura a cada um dos tubos de PCR e em seguida acrescentar 20 µL de produtos de PCR purificados,

respectivamente. A solução foi misturada delicadamente, incubada a 20°C por 15 minutos e mantida a 4°C por 10 minutos.

(d) Purificação dos produtos de ligação

[00281] Colocar contas Agencourt AMPure XP (Beckman, Catálogo número: A63882) à temperatura ambiente para uso.

[00282] Centrifugar os tubos de PCR a 280g por 1 minuto a 20°C, e transferir os 50 µL de produtos de ligação para outra placa de PCR de 96 poços.

[00283] Agitar as contas AMPure XP por 30 segundos para dispersarem uniformemente, e acrescentar 56 µL de contas a cada um dos poços da placa de PCR. Pipetar a mistura delicadamente 10 vezes para misturar, e manter em repouso à temperatura ambiente por 5 minutos.

[00284] Colocar a placa de PCR de 96 poços sobre uma placa magnética de 96 poços, e manter a mesma em repouso por 2 minutos até o sobrenadante ficar límpido. Manter a placa de PCR de 96 poços sobre a placa magnética de 96 poços e remover o sobrenadante, e em seguida acrescentar 200 µL de etanol 80% recém-preparado a cada poço, e incubar à temperatura ambiente por 30 segundos, e remover o sobrenadante.

[00285] Manter a placa de PCR de 96 poços sobre a placa magnética de 96 poços e acrescentar 200 µL de etanol 80% recém-preparado a cada poço. Em seguida, incubar à temperatura ambiente por 30 segundos. Descartar o sobrenadante e remover o etanol residual com uma pipeta de 10 µL.

[00286] Manter a placa de PCR de 96 poços sobre a placa magnética e deixar as contas secarem naturalmente por 10 minutos.

[00287] Remover a placa de PCR de 96 poços da placa magnética e acrescentar 27,5 µL de Tris 10mM (pH 8,5) a cada poço da placa de 96 poços. Pipetar para cima e para baixo delicadamente para misturar

as contas e o Tris 10 vezes até que as contas dispersem completamente. Manter a placa em repouso à temperatura ambiente por 2 minutos.

[00288] Colocar a placa de PCR de 96 poços sobre a placa magnética e manter em repouso por 2 minutos até o sobrenadante ficar límpido. Pipetar 25 μ L do sobrenadante em outro tubo de PCR e armazenar o mesmo a -20°C para uso.

(e) Amplificação por PCR e purificação dos produtos

[00289] A mistura mestre de PCR foi preparada da maneira que se segue e misturada delicadamente. Acrescentar 40 μ L da mistura a cada tubo de PCR e então acrescentar 5 μ L de produtos de ligação purificados.

Tabela 4. Mistura reacional da PCR

N°	Reagentes	Concentração final
1	NEBNext Ultra Q5 Master Mix (NEB, catálogo número: M0544)	1×
2	Iniciador direto (10 μ M)	1 μ M
3	Iniciador reverso (10 μ M)	1 μ M
4	Nuclease-livre de água	até 40 10 μ L

[00290] Agitar os tubos de PCR delicadamente e centrifugar brevemente, e realizar a reação de PCR da seguinte maneira: um ciclo de desnaturação a 98°C por 30 segundos, 8 a 15 ciclos de desnaturação a 98°C por 10 segundos e alongação a 65°C por 75 segundos, um ciclo de desnaturação a 65°C por 5 minutos, e por fim manter a 4°C . Os produtos de PCR foram purificados de acordo com o item (d) Purificação dos produtos de ligação.

(f) Detecção e sequenciamento da biblioteca

[00291] A concentração e a distribuição de tamanhos dos produtos de PCR purificados foram analisadas com o kit de ensaio QubitTM dsDNA BR (catálogo número: Q32850) e o Instrumento Bioanalisador Agilent 2100, respectivamente. As bibliotecas foram agrupadas com concentração molar igual e sequenciadas no Illumina HiSeq2500 com

comprimento de leitura de PE125.

(g) Análise dos dados de sequenciamento

[00292] Os dados brutos foram desmultiplexados de acordo com os índices da amostra e as leituras de sequenciamento foram mapeadas em relação à sequência do gene de referência do BMP3 e NDRG4 com o software SHRiMP V2.04. Os sítios CpG metilados foram identificados com base nos resultados do mapeamento. E por fim, foi constatado que 26 e 39 sítios CpG dos genes BMP3 e NDRG4 eram hipermetilados nos tecidos de CRC e AA em comparação com tecidos normais adjacentes ($p < 0,05$), o que indicava que estes sítios CpG metilados podem ser um biomarcador de DNA para o diagnóstico precoce de CRC e AA.

Tabela 5 Frequência de sítios CpG metilados do gene BMP3 em tecidos de CRC e tecidos normais adjacentes.

Sítios CpG	Coordenada do cromossoma (hg19)	Localização o no sítio de início da transcrição (NM_001201.3)	Número de amostras metiladas dividido pelo número total de amostras-CRC	Porcentagem de metilação - CRC	Número de amostras metiladas dividido pelo número total de amostras -Normal	Porcentagem de metilação - Normal	Valor de P-
#1	81952078	-41	34/50	0,68	2/49	0,04	<0,01
#2	81952099	-20	38/50	0,76	2/49	0,04	<0,01
#3	81952135	17	33/50	0,66	1/49	0,02	<0,01
#4	81952146	28	34/50	0,68	2/49	0,04	<0,01
#5	81952149	31	34/50	0,68	1/49	0,02	<0,01
#6	81952151	33	35/50	0,7	2/49	0,04	<0,01
#7	81952172	54	33/50	0,66	0/49	0,00	<0,01
#8	81952186	68	33/50	0,66	1/49	0,02	<0,01
#9	81952189	71	36/50	0,72	1/49	0,02	<0,01
#10	81952193	75	37/50	0,74	0/49	0,00	<0,01
#11	81952198	80	34/50	0,68	1/49	0,02	<0,01
#12	81952205	87	37/50	0,74	2/49	0,04	<0,01
#13	81952207	89	37/50	0,74	2/49	0,04	<0,01
#14	81952218	100	34/50	0,68	1/49	0,02	<0,01
#15	81952220	102	37/50	0,74	2/49	0,04	<0,01
#16	81952255	137	35/50	0,7	0/49	0,00	<0,01
#17	81952266	148	33/50	0,66	1/49	0,02	<0,01
#18	81952285	167	38/50	0,76	1/49	0,02	<0,01
#19	81952293	175	36/50	0,72	1/49	0,02	<0,01
#20	81952302	184	35/50	0,7	1/49	0,02	<0,01
#21	81952306	188	33/50	0,66	1/49	0,02	<0,01
#22	81952308	190	36/50	0,72	0/49	0,00	<0,01
#23	81952313	195	35/50	0,7	0/49	0,00	<0,01
#24	81952320	202	35/50	0,7	2/49	0,04	<0,01
#25	81952324	206	38/50	0,76	2/49	0,04	<0,01
#26	81952330	212	33/50	0,66	2/49	0,04	<0,01

Tabela 6 Frequência de sítios CpG metilados do gene BMP3 em tecidos de AA e tecidos normais adjacentes.

Sítios CpG	Coordenada do cromossoma (hg19)	Localização no sítio de início da transcrição (NM_001201.3)	Número de amostras metiladas dividido pelo número total de amostras-AA	Porcentagem de metilação-AA	Número de amostras metiladas dividido pelo número total de amostras-AA	Porcentagem de metilação-Normal	Valor de P
#1	81952078	-41	30/50	0,60	2/49	0,04	<0,01
#2	81952099	-20	29/50	0,58	1/49	0,02	<0,01
#3	81952135	17	32/50	0,64	2/49	0,04	<0,01
#4	81952146	28	29/50	0,58	2/49	0,04	<0,01
#5	81952149	31	30/50	0,60	2/49	0,04	<0,01
#6	81952151	33	32/50	0,64	0/49	0,00	<0,01
#7	81952172	54	32/50	0,64	2/49	0,04	<0,01
#8	81952186	68	32/50	0,64	2/49	0,04	<0,01
#9	81952189	71	28/50	0,56	0/49	0,00	<0,01
#10	81952193	75	29/50	0,58	1/49	0,02	<0,01
#11	81952198	80	29/50	0,58	0/49	0,00	<0,01
#12	81952205	87	31/50	0,62	1/49	0,02	<0,01
#13	81952207	89	29/50	0,58	0/49	0,00	<0,01
#14	81952218	100	32/50	0,64	1/49	0,02	<0,01
#15	81952220	102	28/50	0,56	1/49	0,02	<0,01
#16	81952255	137	29/50	0,58	0/49	0,00	<0,01
#17	81952266	148	31/50	0,62	0/49	0,00	<0,01
#18	81952285	167	32/50	0,64	1/49	0,02	<0,01
#19	81952293	175	33/50	0,66	0/49	0,00	<0,01
#20	81952302	184	32/50	0,64	1/49	0,02	<0,01
#21	81952306	188	30/50	0,60	0/49	0,00	<0,01
#22	81952308	190	31/50	0,62	1/49	0,02	<0,01
#23	81952313	195	29/50	0,58	1/49	0,02	<0,01
#24	81952320	202	32/50	0,64	1/49	0,02	<0,01
#25	81952324	206	31/50	0,62	2/49	0,04	<0,01
#26	81952330	212	32/50	0,64	1/49	0,02	<0,01

Tabela 7 Frequência de sítios CpG metilados do gene NDRG4 em tecidos de CRC e tecidos normais adjacentes.

Sítios CpG	Coordenada do cromossoma (hg19)	Localização no sítio de início da transcrição (NM_020465.3)	Número de amostras metiladas dividido pelo número total de amostras-CRC	Percentage m de metilação-CRC	Número de amostras metiladas dividido pelo número total de amostras-normal tissue	Percentage m de metilação-Normal	Valor de P
#1	chr16:58497349	-200	38/50	0,75	1/49	0,02	<0,01
#2	chr16:58497352	-197	35/50	0,70	2/49	0,04	<0,01
#3	chr16:58497358	-191	35/50	0,70	2/49	0,04	<0,01
#4	chr16:58497360	-189	39/50	0,78	1/49	0,03	<0,01
#5	chr16:58497365	-184	39/50	0,78	1/49	0,03	<0,01
#6	chr16:58497369	-180	39/50	0,77	1/49	0,02	<0,01
#7	chr16:58497388	-161	37/50	0,74	1/49	0,02	<0,01
#8	chr16:58497390	-159	37/50	0,73	1/49	0,03	<0,01
#9	chr16:58497393	-156	40/50	0,79	1/49	0,03	<0,01
#10	chr16:58497395	-154	37/50	0,74	1/49	0,02	<0,01
#11	chr16:58497402	-147	38/50	0,76	1/49	0,03	<0,01
#12	chr16:58497406	-143	39/50	0,78	1/49	0,02	<0,01
#13	chr16:58497414	-135	37/50	0,74	1/49	0,03	<0,01
#14	chr16:58497418	-131	36/50	0,72	0/49	0,00	<0,01
#15	chr16:58497425	-124	36/50	0,72	1/49	0,02	<0,01
#16	chr16:58497438	-111	36/50	0,72	2/49	0,04	<0,01
#17	chr16:58497440	-109	36/50	0,71	1/49	0,02	<0,01
#18	chr16:58497449	-100	37/50	0,73	2/49	0,04	<0,01
#19	chr16:58497458	-91	39/50	0,77	2/49	0,04	<0,01
#20	chr16:58497460	-89	37/50	0,74	1/49	0,03	<0,01
#21	chr16:58497462	-87	38/50	0,75	1/49	0,03	<0,01
#22	chr16:58497470	-79	35/50	0,70	1/49	0,02	<0,01
#23	chr16:58497472	-77	36/50	0,71	2/49	0,04	<0,01
#24	chr16:58497477	-72	36/50	0,72	1/49	0,03	<0,01
#25	chr16:58497481	-68	37/50	0,74	1/49	0,02	<0,01
#26	chr16:58497499	-50	37/50	0,73	1/49	0,02	<0,01
#27	chr16:58497505	-44	40/50	0,79	2/49	0,04	<0,01
#28	chr16:58497510	-39	40/50	0,79	1/49	0,02	<0,01
#29	chr16:58497512	-37	40/50	0,79	2/49	0,04	<0,01
#30	chr16:58497517	-32	35/50	0,70	1/49	0,02	<0,01
#31	chr16:58497521	-28	39/50	0,77	1/49	0,02	<0,01
#32	chr16:58497531	-18	38/50	0,76	1/49	0,03	<0,01
#33	chr16:58497542	-7	36/50	0,71	1/49	0,02	<0,01
#34	chr16:58497544	-5	37/50	0,74	1/49	0,03	<0,01
#35	chr16:58497550	2	37/50	0,74	0/49	0,00	<0,01

Sítios CpG	Coordenada do cromossoma (hg19)	Localização no sítio de início da transcrição (NM_020465.3)	Número de amostras metiladas dividido pelo número total de amostras-CRC	Porcentagem de metilação-CRC	Número de amostras metiladas dividido pelo número total de amostras-normal tissue	Porcentagem de metilação-Normal	Valor de P
#36	chr16:58497556	8	38/50	0,75	1/49	0,03	<0,01
#37	chr16:58497558	10	39/50	0,78	2/49	0,04	<0,01
#38	chr16:58497561	13	36/50	0,71	2/49	0,04	<0,01
#39	chr16:58497566	18	35/50	0,70	1/49	0,03	<0,01

Tabela 8 Frequência de sítios CpG metilados do gene NDRG4 em tecidos de AA e tecidos normais adjacentes.

Sítios CpG	Coordenada do cromossoma (hg19)	Localização no sítio de início da transcrição (NM_020465.3)	Número de amostras metiladas dividido pelo número total de amostras-AA	Porcentagem de metilação-AA	Número de amostras metiladas dividido pelo número total de amostras-normal tissue	Porcentagem de metilação-Normal	Valor de P
#1	chr16:58497349	-200	28/46	0,60	1/46	0,02	<0,01
#2	chr16:58497352	-197	28/46	0,60	1/46	0,02	<0,01
#3	chr16:58497358	-191	27/46	0,59	1/46	0,03	<0,01
#4	chr16:58497360	-189	29/46	0,62	1/46	0,03	<0,01
#5	chr16:58497365	-184	30/46	0,65	2/46	0,04	<0,01
#6	chr16:58497369	-180	28/46	0,61	2/46	0,04	<0,01
#7	chr16:58497388	-161	29/46	0,64	1/46	0,03	<0,01
#8	chr16:58497390	-159	29/46	0,64	1/46	0,03	<0,01
#9	chr16:58497393	-156	30/46	0,65	1/46	0,02	<0,01
#10	chr16:58497395	-154	28/46	0,60	2/46	0,04	<0,01
#11	chr16:58497402	-147	29/46	0,62	1/46	0,03	<0,01
#12	chr16:58497406	-143	29/46	0,62	1/46	0,03	<0,01
#13	chr16:58497414	-135	28/46	0,61	1/46	0,02	<0,01
#14	chr16:58497418	-131	30/46	0,65	1/46	0,02	<0,01
#15	chr16:58497425	-124	29/46	0,64	2/46	0,04	<0,01
#16	chr16:58497438	-111	29/46	0,64	1/46	0,02	<0,01
#17	chr16:58497440	-109	29/46	0,62	2/46	0,04	<0,01
#18	chr16:58497449	-100	29/46	0,64	1/46	0,03	<0,01
#19	chr16:58497458	-91	29/46	0,62	1/46	0,02	<0,01
#20	chr16:58497460	-89	27/46	0,59	1/46	0,03	<0,01

Sítios CpG	Coordenada do cromossoma (hg19)	Localização no sítio de início da transcrição (NM_020465.3)	Número de amostras metiladas dividido pelo número total de amostras-AA	Percentage m de metilação-AA	Número de amostras metiladas dividido pelo número total de amostras-normal tissue	Percentage m de metilação-Normal	Valor de P
#21	chr16:58497462	-87	29/46	0,62	1/46	0,02	<0,01
#22	chr16:58497470	-79	29/46	0,64	1/46	0,02	<0,01
#23	chr16:58497472	-77	30/46	0,65	2/46	0,04	<0,01
#24	chr16:58497477	-72	30/46	0,65	2/46	0,04	<0,01
#25	chr16:58497481	-68	28/46	0,60	2/46	0,04	<0,01
#26	chr16:58497499	-50	29/46	0,63	1/46	0,02	<0,01
#27	chr16:58497505	-44	28/46	0,61	1/46	0,02	<0,01
#28	chr16:58497510	-39	27/46	0,59	1/46	0,02	<0,01
#29	chr16:58497512	-37	30/46	0,65	2/46	0,04	<0,01
#30	chr16:58497517	-32	29/46	0,62	2/46	0,04	<0,01
#31	chr16:58497521	-28	29/46	0,64	1/46	0,02	<0,01
#32	chr16:58497531	-18	29/46	0,62	2/46	0,04	<0,01
#33	chr16:58497542	-7	29/46	0,64	1/46	0,02	<0,01
#34	chr16:58497544	-5	29/46	0,63	1/46	0,02	<0,01
#35	chr16:58497550	2	29/46	0,62	1/46	0,02	<0,01
#36	chr16:58497556	8	28/46	0,61	1/46	0,03	<0,01
#37	chr16:58497558	10	30/46	0,65	1/46	0,03	<0,01
#38	chr16:58497561	13	29/46	0,63	1/46	0,02	<0,01
#39	chr16:58497566	18	30/46	0,65	1/46	0,02	<0,01

EXEMPLO 2

Comparação de sítios CpG de metilação diferenciais dos genes BMP3 e NDRG4 relacionados com CRC entre diferentes raças.

[00293] Analisamos os dados do microarranjo de metilação dos genes BMP3 e NDRG4 no banco de dados TCGA (Illumina Human Methylation 450 data) e constatamos que existem cinco sítios CpG de metilação significativamente diferentes na região promotora dos genes NDRG4 entre a população branca e a população asiática (Figura 2 e Tabela 9). Para verificar ainda os sítios CpG de metilação diferenciais, amostras de tecido e de sangue foram coletadas de 106 pacientes com CRC e AA na China. Os DNAs foram extraídos e tratados com

bissulfato. As regiões promotoras dos genes BMP3 e NDRG4 foram amplificadas e sequenciadas. Analisados os dados de sequenciamento e constatamos que de fato os sítios CpG de hipermetilação da população asiática são diferentes daquelas da população branca no banco de dados TCGA, e os sítios CpG de hipermetilação são diferentes entre as amostras de tecido de CRC e de AA. De acordo com estes sítios CpG de metilação diferentes, desenvolvemos um kit de detecção especificamente para rastreamto de CRC e de AA na população asiática (por exemplo, população chinesa).

Tabela 9 Diferença nos sítios CpG de metilação dos genes BMP3 e NDRG4 na população branca e na população asiática

N°	Gene	Sítio de metilação	Anova unilateral	Coordenada (hg19)	Região do gene	Porcentagem de metilação (Branca>Asiática)
1	BMP3	cg19675063	p = 0,001735, (f = 4,408)	81975265	Exon3	Y
2	NDRG4	cg27147718	p = 0,00004290, (f = 6,558)	58496542	promotor	Y
3	NDRG4	cg04190807	p = 0,01761, (f = 3,036)	58497230	promotor	N
4	NDRG4	cg00687686	p = 0,01657, (f = 3,072)	58497236	promotor	N
5	NDRG4	cg04942472	p = 0,01955, (f = 2,973)	58497239	promotor	N
6	NDRG4	cg01466678	p = 0,02327, (f = 2,867)	58497395	promotor	N
7	NDRG4	cg05469759	p = 0,03612, (f = 2,599)	58498456	Intron1	N
8	NDRG4	cg00262031	p = 0,02585, (f = 2,803)	58498574	Intron1	N
9	NDRG4	cg06650115	p = 0,01221, (f = 3,256)	58498585	Intron1	N
10	NDRG4	cg04005075	p = 0,01938, (f = 2,978)	58498636	Intron1	N
11	NDRG4	cg09324514	p = 0,0004509, (f = 5,194)	58498710	Intron1	N

N°	Gene	Sítio de metilação	Anova unilateral	Coordenada (hg19)	Região do gene	Porcentagem de metilação (Branca>Asiática)
12	NDRG4	cg16812519	p = 0,01862, (f = 3,002)	58498754	Intron1	N
13	NDRG4	cg26824423	p = 0,007544, (f = 3,543)	58498818	Intron1	N
14	NDRG4	cg05333442	p = 0,003665, (f = 3,970)	58533743	Intron3	N
15	NDRG4	cg01343363	p = 0,01099, (f = 3,319)	58533808	Intron3	Y
16	NDRG4	cg27113419	p = 0,006302, (f = 3,649)	58533979	Intron3	Y
17	NDRG4	cg05725404	p = 0,01145, (f = 3,294)	58534157	Intron3	N

EXEMPLO 3

Rastreamento de iniciadores e sondas para os genes BMP3 e NDRG4

Desenho e seleção de iniciadores e sondas dos genes BMP3 e NDRG4.

[00294] Iniciadores e sondas de qPCR foram desenhados com base nos sítios CpG metilados dos genes BMP3 e NDRG4. Foram identificados três pares de iniciadores e sondas preferidos. Os iniciadores e sondas preferidos são comparados com vários outros iniciadores e sondas candidados dos genes BMP3 e NDRG4 com controles positivos e controles negativos. As informações sobre os iniciadores e sondas estão mostradas na Tabela 10.

Tabela 10 informações sobre os iniciadores e sondas preferidos e demais iniciadores e sondas

Gene	Grupo	Iniciador/ Sonda	Iniciador/ Sonda ID	Sequência (5' para 3')
BMP3	Preferido 1	Iniciador direto	SEQ ID NO.:3	TTTGAAAATATTCGGGTTATATACGTCCG
BMP3	Preferido 1	Iniciador reverso	SEQ ID NO.:4	ATAAACTCTTCCCCAACAACTACGCGAA
BMP3	Preferido 1	Sonda	SEQ ID NO.:5	AGCGTTGGAGTGGAGACGGCGTTCCG

Gene	Grupo	Iniciador/ Sonda	Iniciador/ Sonda ID	Sequência (5' para 3')
NDRG4	Preferido 1	Iniciador direto	SEQ ID NO.:6	ATCGATCGGGGTGTTTTTAGGTTTC
NDRG4	Preferido 1	Iniciador reverso	SEQ ID NO.:7	CCTTCTACGCGACTAAAATACCCGAT
NDRG4	Preferido 1	Sonda	SEQ ID NO.:8	CGTCGCGGTTTTTCGTTCTTTTTTCGTT GT
BMP3	Preferido 2	Iniciador direto	SEQ ID NO.:9	AATATTCGGGTTATATACGTCGCGA
BMP3	Preferido 2	Iniciador reverso	SEQ ID NO.:10	GCAACCTAACAATAAACTCTTCCCCAA
BMP3	Preferido 2	Sonda	SEQ ID NO.:11	TGGAGTGGAGACGGCGTTCGTAGCGT
NDRG4	Preferido 2	Iniciador direto	SEQ ID NO.:12	GCGGGTGAGAAGTCGGC
NDRG4	Preferido 2	Iniciador reverso	SEQ ID NO.:13	GTAACCTCCGCCTTCTACGC
NDRG4	Preferido 2	Sonda	SEQ ID NO.:14	TAGGTTTCGCGTCGCGGTTTTCGTT
BMP3	Preferido 3	Iniciador direto	SEQ ID NO.:15	AATATTCGGGTTATATACGTCGCGATT
BMP3	Preferido 3	Iniciador reverso	SEQ ID NO.:16	ACTTACTACGCTAACCCAACG
BMP3	Preferido 3	Sonda	SEQ ID NO.:17	TAGCGTTGGAGTGGAGACGGCGTTCGTA
NDRG4	Preferido 3	Iniciador direto	SEQ ID NO.:18	CGGTTTTCGTTCTTTTTTCG
NDRG4	Preferido 3	Iniciador reverso	SEQ ID NO.:19	AACCTAAACTAATCCCGAACGAACC
NDRG4	Preferido 3	Sonda	SEQ ID NO.:20	TCGTTTATCGGGTATTTTAGTCGCGTAG
BMP3	Controle 1	Iniciador direto	SEQ ID NO.:21	GAGTGGAGACGGCGTTCGTA
BMP3	Controle 1	Iniciador reverso	SEQ ID NO.:22	CCACTTACTACGCTAACCCAACG
BMP3	Controle 1	Sonda	SEQ ID NO.:23	CGGGTGAGGTTTCGCGTAGTTGTTGGG
NDRG4	Controle 1,	Iniciador	SEQ ID	GGGTGTTTTTAGGTTTCGCGTC

Gene	Grupo	Iniciador/ Sonda	Iniciador/ Sonda ID	Sequência (5' para 3')
	Controle 2, Controle 3	direto	NO.:24	
NDRG4	Controle 1	Iniciador reverso	SEQ ID NO.:25	CGTAACTCCGCCTTCTACGC
NDRG4	Controle 1, Controle 2, Controle 3	Sonda	SEQ ID NO.:26	ACGCGACTAAAATACCCGATAAACGAAC GAAAAACGAAC
BMP3	Controle 2	Iniciador direto	SEQ ID NO.:27	TTAGGTTGCGTTGGGTTAGCG
BMP3	Controle 2	Iniciador reverso	SEQ ID NO.:28	ACTCCGAAAACGCAAAAAACCG
BMP3	Controle 2	Sonda	SEQ ID NO.:29	ATTCGGTCGCGTTTCGGTTTCGTGC
NDRG4	Controle 2	Iniciador reverso	SEQ ID NO.:30	GACCCGCGAAACGATACCG
BMP3	Controle 3	Iniciador direto	SEQ ID NO.:31	TATTCGGTTATATACGTCCG
BMP3	Controle 3	Iniciador reverso	SEQ ID NO.:32	CTTACTACGCTAACCCAACG
BMP3	Controle 3	Sonda	SEQ ID NO.:33	CCCAACAACCTACGCGAACCTCACCCG
NDRG4	Controle 3	Iniciador reverso	SEQ ID NO.:34	TCGCGCGTAACTCCGCCTT

Comparação de iniciadores e sondas preferidos com controles com controles positivos e negativos dos genes BMP3 e NDRG4.

[00295] Amostras padrão com razões de metilação diferentes foram formadas por inoculação de DNAs de controle positivo em DNAs de controle negativo dos genes BMP3 e NDRG4, respectivamente, em diferentes razões (Tabela 11). A sensibilidade analítica foi comparada por amplificação do DNA das amostras padrão com os iniciadores e sondas preferidos e de controle dos genes BMP3 e NDRG4, respectivamente. A especificidade analítica foi comparada por amplificação do DNA de controle negativo dos genes BMP3 e NDRG4

com os iniciadores e sondas preferidos e de controle dos genes BMP3 e NDRG4, respectivamente, e a quantidade DNAs de controle negativo é de 10^4 cópias, 10^5 cópias, 10^6 cópias, 10^7 cópias e 10^8 cópias por reação.

Tabela 11 amostra padrão dos genes BMP3 e NDRG4

Razão de metilação	Número de cópias de DNA metilado	Número de cópias de DNA total
1	10^5	10^5
1/10	10^4	10^5
1/10 ²	10^3	10^5
1/10 ³	10^2	10^5
1/10 ⁴	10	10^5

[00296] A mistura mestre foi preparada como mostrado na Tabela 5 e as condições reacionais de PCR quantitativa são, primeiro, desnaturação a 95°C por 1 minuto, e em seguida 50 ciclos de desnaturação a 95°C por 20 segundos e alongação a 60°C por 1 minuto.

Tabela 12 concentração final de reagentes de qPCR de metilação

N°	Reagentes	Concentração Final
1	10×tampão de PCR	1×
2	MgCl ₂	2mM
3	dNTPs	0,2mM
4	Taq DNA polimerase	2U
5	Cada iniciador	0,75mM
6	Cada sonda	0,25 mM
7	Gabarito de DNA	2 µL
8	Água ultrapura	até 50µL

[00297] Como mostrado na Tabela 13 e na Figura 3A até a Figura 3L, foi possível detectar 1/10⁴ de DNA metilado usando os três pares de iniciadores e sondas preferidos, mas os três pares de controles não conseguiram detectar.

[00298] Como mostrado na Tabela 13 e na Figura 3A até a Figura 3L, os três pares preferidos de iniciadores e sondas de BMP3 e NDRG4 da presente invenção são capazes de detectar de forma estável níveis de metilação tão baixos quanto um e dez mil, ao passo

que os três pares de iniciadores e sondas comparativos são incapazes de detectar um em dez mil níveis de metilação.

Tabela 13 comparação da sensibilidade analítica dos iniciadores e sondas preferidos e dos iniciadores e sondas de controle dos genes BMP3 e NDRG4.

Gene	Razão de metilação	Número de cópias de DNA metilado	Número de cópias de DNA total	Iniciadores e sondas preferidos			Iniciadores e sondas de controle		
				Preferido 1	Preferido 2	Preferido 3	Controle 1	Controle 2	Controle 3
BMP3	1	10 ⁵	10 ⁵	Y	Y	Y	Y	Y	Y
	1/10	10 ⁴	10 ⁵	Y	Y	Y	Y	Y	Y
	1/10 ²	10 ³	10 ⁵	Y	Y	Y	Y	Y	Y
	1/10 ³	10 ²	10 ⁵	Y	Y	Y	Y	N	N
	1/10 ⁴	10	10 ⁵	Y	Y	Y	N	N	N
NDRG4	1	10 ⁵	10 ⁵	Y	Y	Y	Y	Y	Y
	1/10	10 ⁴	10 ⁵	Y	Y	Y	Y	Y	Y
	1/10 ²	10 ³	10 ⁵	Y	Y	Y	Y	Y	Y
	1/10 ³	10 ²	10 ⁵	Y	Y	Y	N	N	Y
	1/10 ⁴	10	10 ⁵	Y	Y	Y	N	N	N

[00299] Y : detectado, N : indeterminado

[00300] As curvas de amplificação da sensibilidade analítica de BMP3 e NDRG4 estão mostradas na Figura 3A até a Figura 3L para cada uma das combinações preferidas, comparadas aos grupos de controle.

Iniciadores e sondas	BMP3	NDRG4
Preferido 1	Figura 3A	Figura 3B
Preferido 2	Figura 3C	Figura 3D
Preferido 3	Figura 3E	Figura 3F
Controle 1	Figura 3G	Figura 3H
Controle 2	Figura 3I	Figura 3J
Controle 3	Figura 3K	Figura 3L

[00301] Como mostrado na Tabela 14 e na Figura 4A até Figura 4L, os três pares de iniciadores e sondas preferidos para os genes BMP3 e NDRG4 não apresentam sinais de amplificação para diferentes

concentrações de DNA não metilado, enquanto que os iniciadores e sondas comparativos apresentam diferentes graus de amplificação inespecífica.

Tabela 14 Comparação da especificidade analítica entre iniciadores e sondas preferidos e iniciadores e sondas de controle.

BMP3 (Cópias por reação)	NDRG4 (Cópias por reação)	Iniciadores e sondas preferidos			Iniciadores e sondas de controle		
		Preferido 1	Preferido 2	Preferido 3	Controle 1	Controle 2	Controle 3
10 ⁸	10 ⁸	N	N	N	Y	Y	Y
10 ⁷	10 ⁷	N	N	N	N	Y	Y
10 ⁶	10 ⁶	N	N	N	N	N	N
10 ⁵	10 ⁵	N	N	N	N	N	N
10 ⁴	10 ⁴	N	N	N	N	N	N

[00302] Y: sem amplificação, N: amplificação inespecífica

Curvas de amplificação da especificidade analítica de BMP3 e NDRG4

Iniciadores e sonda	BMP3	NDRG4
Preferido 1	Figura 4A	Figura 4B
Preferido 2	Figura 4C	Figura 4D
Preferido 3	Figura 4E	Figura 4F
Controle 1	Figura 4G	Figura 4H
Controle 2	Figura 4I	Figura 4I
Controle 3	Figura 4K	Figura 4L

Exemplo 4

A validação dos iniciadores e sondas metilados preferidos e comparativos é feita com amostras de fezes dos genes BMP3 e NDRG4.

[00303] O nível de metilação dos genes BMP3 e NDRG4 em 81 amostras de fezes foi detectado com os três pares de iniciadores e sondas preferidos e comparativos. Os três iniciadores e sondas comparativos são:

[00304] Comparativo 1: iniciador direto BMP3 SEQ ID NO.:21,

iniciador reverso BMP3 SEQ ID NO.: 22, e sonda BMP3 SEQ ID NO.: 23; iniciador direto NDRG4 SEQ ID NO.: 24, iniciador reverso NDRG4 SEQ ID NO.: 25, e sonda NDRG4 SEQ ID NO.: 26;

[00305] Comparativo 2: iniciador direto BMP3 SEQ ID NO.:27, iniciador reverso BMP3 SEQ ID NO.: 28, e sonda BMP3 SEQ ID NO.: 29; iniciador direto NDRG4 SEQ ID NO.: 24, iniciador NDRG4 reverso SEQ ID NO.: 30, e sonda NDRG4 SEQ ID NO.: 26;

[00306] Comparativo 3: iniciador direto BMP3 SEQ ID NO.:31, iniciador reverso BMP3 SEQ ID NO.: 32, e sonda BMP3 SEQ ID NO.: 33; iniciador direto NDRG4 SEQ ID NO.: 24, iniciador reverso NDRG4 SEQ ID NO.: 34, e sonda NDRG4 SEQ ID NO.: 26.

[00307] As informações sobre as amostras de fezes estão mostradas na Tabela 15.

Tabela 15 estatística de oitenta e amostras de fezes

Colonoscopia	Números
Normal	46
adenomas	15
Câncer colorretal	20
total	81

[00308] DNAs fecais foram extraídos das amostras seguindo o método descrito abaixo.

Extração de DNA fecal

[00309] Acrescentar 40 mL de lisado a 4-6 g de amostras de fezes, e agitar vigorosamente, e em seguida incubar a 50°C por 16 horas.

[00310] Centrifugar então a 5000 rpm por 10 minutos. Prestar atenção à balança de pesagem antes da centrifugação. Depois de terminada a centrifugação, remover cautelosamente os tubos da centrífuga e não agitar a mesma vigorosamente.

[00311] Pipetar 9 mL de sobrenadante em outro tubo de centrífuga de 50 mL, e então acrescentar 1 mL de adjuvante de extração, 60 µL de contas magnéticas e 10 mL de isopropanol. Agitar por 10

segundos, e incubar a 65°C por 20 minutos. Misturar para cima e para baixo uma vez por 5 minutos durante a incubação.

[00312] Depois da incubação, colocar o tubo de centrífuga de 50 mL em um suporte magnético e manter o mesmo em repouso por 3 minutos até o sobrenadante ficar límpido e descartar o sobrenadante.

[00313] Remover o tubo de centrífuga de 50 mL do suporte magnético e acrescentar 12 mL de solução de lavagem. Agitar até as contas magnéticas se desprenderem do tubo, e manter em repouso por 3 minutos, e colocar o tubo de centrífuga de 50 mL de volta no suporte magnético por 3 minutos até o sobrenadante ficar límpido e descartar o sobrenadante.

[00314] Acrescentar 15 mL de solução de etanol 80%, agitar até as contas se desprenderem do tudo, e manter em repouso por 3 minutos. Colocar o tubo de volta no suporte magnético e manter em repouso por 3 minutos até o sobrenadante ficar límpido e descartar o sobrenadante.

[00315] Repetir a etapa anterior uma vez.

[00316] Pipetar o líquido residual do fundo, manter o tubo aberto, e incubar a 65°C por 5 minutos. Remover o tubo do suporte magnético até que as contas estejam secas e acrescentar 1,5 mL de eluente I pré-aquecido. Pipetar as contas do tubo até o eluente com uma pipeta de 1000 µL, e transferir a mistura para um tubo de centrífuga de 2 mL e fechar a tampa, e então incubar a 65°C por 5 minutos.

[00317] Centrifugar a 13000 rpm por 3 minutos, pipetar 600 µL de sobrenadante para outro tubo de 1,5 mL, e então acrescentar 600 µL de solução de ligação e agitar vigorosamente.

[00318] Transferir 600 µL da mistura acima para uma coluna de purificação de DNA, centrifugar a 13.000 rpm por 1 minuto, e descartar os resíduos.

[00319] Tratar o restante da mistura como na etapa anterior, e

centrifugar a 13.000 por 2 minutos.

[00320] Acrescentar 600 µL de solução de etanol 90% à coluna de purificação de DNA, centrifugar a 13.000 rpm por 1 minuto e descartar os resíduos.

[00321] Repetir a etapa anterior 2 vezes.

[00322] Centrifugar a 13.000 rpm por 3 minutos, e colocar a coluna de purificação de DNA em outro tubo de centrífuga de 1,5 mL. Abrir a coluna de purificação de DNA e incubar a 65°C por 5 minutos até secar.

[00323] Pingar 100 µL de eluato II pré-aquecido no meio da coluna de purificação de DNA, fechar a tampa, e em seguida incubar a 65°C por 5 minutos. Centrifugar a 13.000 rpm por 2 minutos. Obter a solução de DNA eluído e armazenar a mesma a 2-8°C para uso. O armazenamento prolongado deve ser mantido a uma temperatura de -25°C a -15°C.

Tratamento com bissulfito

[00324] As etapas operacionais detalhadas são aquelas do exemplo 3.

qPCR

[00325] A mistura mestre de qPCR foi preparada da seguinte maneira:

[00326] Tabela 16

N°	Reagente	Concentração final
1	10×tampão PCR	1×
2	MgCl ₂	2 mM
3	dNTP s	0,2 mM
4	Taq DNA Polimerase	2 U
5	Cada iniciador	0,75 µM
6	Cada sonda	0,25 µM
7	Gabarito de DNA	2 µL
8	Água ultrapura	até 50 µL

[00327] As condições reacionais de qPCR são um ciclo de

desnaturação a 95°C por 2 minutos, e 50 ciclos de desnaturação a 95°C por 20 segundos e alongação a 95°C por 1 minuto. O gene B2M é um gene de referência para controle de qualidade da reação de qPCR.

Resultados

[00328] Como mostrado na Tabela 17, a sensibilidade de detecção de CRC e AA nas 81 amostras de fezes com os três pares de iniciadores e sondas preferidos dos genes BMP3 e NDRG4 é de até 85,0%-95,0% (CRC por metilação de BMP3), 66,7%-73,3% (AA por metilação de BMP3), e 90,0%-95,0% (CRC por metilação de NDRG4) e 73,3%-86,7% (AA por metilação de NDRG4), respectivamente. Adicionalmente, a especificidade para detecção de CRC e AA usando seja os dados de metilação de BMP3 ou os dados de metilação de NDRG4 é, em ambos os casos, de cerca de 97,8%-100,0%.

[00329] No entanto, a sensibilidade de detecção de CRC e AA nas 81 amostras de fezes com os três pares de iniciadores e sondas comparativos dos genes BMP3 e NDRG4 é de 85,0%-90,0% (CRC por metilação de BMP3), 46,7%-60,0% (AA por metilação de BMP3), e 90,0%-95,0% (CRC por metilação de NDRG4) e 66,7%-73,3% (AA por metilação de NDRG4), respectivamente. Ainda, a especificidade geral de detecção de CRC e AA usando seja os dados de metilação de BMP3 ou os dados de metilação de NDRG4 é de cerca de 91,3%-93,5% e 93,5%-95,7%, respectivamente.

[00330] Pode-se observar que os iniciadores e sondas preferidos são superiores aos iniciadores e sondas comparativos na detecção das amostras clínicas, especialmente para detecção de AA.

[00331] Tabela 17 a estatística dos resultados de detecção em amostras clínicas

BMP3									
Item	Preferido 1			Preferido 2			Preferido 3		
Grupo de amostras	CRC	AA	Normal	CRC	AA	Normal	CRC	AA	Normal
Número de amostras positivas detectadas	19/20	11/15	0/46	18/20	11/15	1/46	17/20	10/15	1/46
Sensibilidade	95,0%	73,3%	/	90,0%	73,3%	/	85,0%	66,7%	/
Especificidade	100,0%			97,8%			97,8%		
Índice total de aceitação	93,8%			91,4%			88,9%		
Curva de amplificação	Figura 5A			Figura 5B			Figura 5C		
Item	Comparativo 1			Comparativo 2			Comparativo 3		
Grupo de amostras	CRC	AA	Normal	CRC	AA	Normal	CRC	AA	Normal
Número de amostras positivas detectadas	18/20	9/15	3/46	17/20	8/15	4/46	17/20	7/15	4/46
Sensibilidade	90,0%	60,0%	/	85,0%	53,3%	/	85,0%	46,7%	/
Especificidade	93,5%			91,3%			91,3%		
Índice total de aceitação	86,4%			82,7%			81,5%		
Curva de amplificação	Figura 5D			Figura 5E			Figura 5F		
NDRG4									
Item	Preferido 1			Preferido 2			Preferido 3		
Grupo de amostras	CRC	AA	Normal	CRC	AA	Normal	CRC	AA	Normal
Número de amostras positivas detectadas	19/20	13/15	0/46	19/20	12/15	0/46	18/20	11/15	1/46
Sensibilidade	95,0%	86,7%	/	95,0%	80,0%	/	90,0%	73,3%	/

Especificidade	100,0%			100,0%			97,8%		
Índice total de aceitação	96,3%			95,1%			91,4%		
Curva de amplificação	Figura 6A			Figura 6B			Figura 6C		
Item	Comparativo 1			Comparativo 2			Comparativo 3		
Grupo de amostras	CRC	AA	Normal	CRC	AA	Normal	CRC	AA	Normal
Número de amostras positivas detectadas	18/20	10/15	2/46	18/20	10/15	3/46	19/20	11/15	3/46
Sensibilidade	90,0%	66,7%	/	90,0%	66,7%	/	95,0%	73,3%	/
Especificidade	95,7%			93,5%			93,5%		
Índice total de aceitação	88,9%			87,7%			90,1%		
Curva de amplificação	Figura 6D			Figura 6E			Figura 6F		

Tabela 18 resultados de detecção das 81 amostras fecais

No.	Sexo	Idade	Colonoscopia	Ct BMP3						NDRG4					
				Iniciadores e sondas preferidas			Iniciadores e sondas comparativas			Iniciadores e sondas preferidas			Iniciadores e sondas comparativas		
				1	2	3	1	2	3	1	2	3	1	2	3
1	Masculino	50	CRC- estágio I	33,9	32,1	37,5	32,7	35,8	36,2	U	33,6	35	33,9	38,8	40,1
2	Masculino	51	CRC-estágio II	34,9	32,2	29,1	41,3	37,6	39,9	39,4	38,4	33,8	34	38,1	40,3
3	Feminino	56	CRC-estágio III	35,1	33,1	31,4	34,9	41,2	35,1	30,7	30,4	33,2	34,2	42,6	35
4	Masculino	72	CRC-estágio I	35,7	U	U	33,4	40,1	36	37,2	38,9	U	U	U	36,7
5	Feminino	75	CRC-estágio II	31,9	36,6	32,7	37,9	36,3	34,5	35,4	37,4	34,5	36,4	33	40,5
6	Feminino	55	CRC-estágio II	37,5	35,1	29,5	43	39,8	39,7	34,4	35,9	35,6	35,1	37,4	42
7	Feminino	50	CRC-estágio II	36,2	32,2	38,8	39,7	37,2	37,3	33,6	37,4	38,8	42,3	36,4	37,5
8	Masculino	62	CRC-estágio IV	U	U	U	U	U	U	36,1	34,5	39,9	41	41,8	40,4
9	Feminino	74	CRC-estágio I	35,7	37,7	29,3	38	36	44	29,6	32,3	36,6	42,6	36,8	33
10	Feminino	73	CRC-estágio II	31,7	29,7	33,9	32,6	42	32,1	36,5	35,7	39,7	39,3	33,5	31,8
11	Masculino	52	CRC-estágio II	34	40	35,9	39,5	38,1	42,4	36,9	U	36,5	42,6	37,8	36,6
12	Feminino	57	CRC-estágio II	34,5	29,1	29,3	34,6	42,6	41,3	37,7	31,8	35,6	42,3	39	42,6
13	Masculino	51	CRC-estágio	37,6	34	33,2	38,8	U	U	31,9	35,4	35,9	39,1	35,1	34,6
14	Masculino	60	CRC-estágio I	36,2	31,7	35,6	40,1	42,2	33,1	29,6	31,7	29,1	33,8	36,4	36,5
15	Feminino	49	CRC-estágio III	31,1	37	29,4	41,9	35,8	34,3	34,4	33,6	35,6	40,3	39,2	39

No.	Sexo	Idade	Colonoscopia	Ct BMP3						NDRG4					
				Iniciadores e sondas preferidas			Iniciadores e sondas comparativas			Iniciadores e sondas preferidas			Iniciadores e sondas comparativas		
				1	2	3	1	2	3	1	2	3	1	2	3
16	Masculino	49	CRC-estágio IV	34	35,5	U	41,8	35,9	37,5	37,6	32,3	32,3	38,1	U	31,3
17	Masculino	48	CRC-estágio I	38,1	37,1	35,8	39	40,7	38,3	29,4	30,7	U	U	37,1	U
18	Masculino	54	CRC-estágio II	36,1	33,7	35,2	U	U	U	29,4	37	33,5	34,7	34	41,5
19	Feminino	60	CRC-estágio III	29,2	36,4	33,6	38,4	36,5	33,7	32,9	30,1	35,1	33,5	38,5	41,3
20	Feminino	62	CRC-estágio IV	36,4	34,7	38,5	39,5	37,9	38,9	36,4	29,4	33,1	35,8	43,1	42,8
21	Feminino	50	AA	38,7	U	U	35,3	U	U	34,6	37	U	U	U	40,9
22	Feminino	56	AA	U	35,6	30	40,9	38,6	35	34,6	U	29,3	42,7	33,4	U
23	Masculino	58	AA	U	U	29,6	39,3	38	41,1	39,3	35,1	39,5	39,4	U	37,4
24	Masculino	67	AA	36,3	32,8	34,2	U	U	U	33,9	33	32,7	36	35,5	U
25	Masculino	51	AA	35,9	33,7	33,9	36,4	38	39	32,7	33,9	U	U	35,8	40,4
26	Feminino	71	AA	29,3	30	35,4	40,3	37,7	34,4	30,7	34,9	38,3	33,8	41,1	33
27	Masculino	65	AA	U	30,3	U	U	U	U	34,8	34	36,8	41,9	42,7	36,1
28	Masculino	62	AA	37,5	29,2	U	U	U	U	U	U	36,8	43,1	43,9	32,8
29	Feminino	45	AA	31	37,6	37,4	37,2	38,5	37,8	30,8	31,7	30,8	U	U	U
30	Masculino	67	AA	29,7	34,3	29,8	31,3	U	U	33,9	U	U	U	U	U
31	Feminino	53	AA	36,3	U	U	U	35,4	34,6	29,5	34,9	37,7	39,6	40	42,9
32	Feminino	68	AA	38,4	37,3	30,4	U	U	U	U	37,2	U	U	U	35,1
33	Feminino	50	AA	36,9	39	32,1	36,6	U	U	39,5	29,1	30,7	37,1	37,6	36,6
34	Feminino	48	AA	U	U	U	U	37,3	35,8	38,3	32,2	32,4	36,2	36	43,9
35	Masculino	50	AA	35,5	29,1	32,7	39,4	42,7	U	29,8	33,8	32,9	36,4	38,2	42
36	Masculino	45	Normal	U	U	U	U	U	U	U	U	U	U	U	U

No.	Sexo	Idade	Colonoscopia	Ct BMP3						NDRG4					
				Iniciadores e sondas preferidas			Iniciadores e sondas comparativas			Iniciadores e sondas preferidas			Iniciadores e sondas comparativas		
				1	2	3	1	2	3	1	2	3	1	2	3
37	Feminino	50	Normal	U	U	U	U	U	U	U	U	U	U	U	U
38	Masculino	59	Normal	U	U	U	U	U	U	U	U	U	U	U	U
39	Masculino	73	Normal	U	U	U	U	U	U	U	U	U	U	U	U
40	Masculino	47	Normal	U	U	U	U	U	U	U	U	U	U	U	U
41	Masculino	71	Normal	U	U	U	U	U	U	U	U	U	U	U	U
42	Feminino	45	Normal	U	U	U	U	U	U	U	U	U	U	U	U
43	Feminino	62	Normal	U	U	U	U	U	U	U	U	U	U	U	U
44	Masculino	55	Normal	U	U	U	U	U	U	U	U	U	U	U	U
45	Feminino	54	Normal	U	U	U	U	U	U	U	U	U	U	U	U
46	Masculino	63	Normal	U	U	U	39,4	U	U	U	U	U	U	U	U
47	Feminino	53	Normal	U	U	U	U	U	U	U	U	U	41,2	U	U
48	Masculino	67	Normal	U	U	U	U	37,2	41,2	U	U	U	U	U	U
49	Masculino	69	Normal	U	U	U	U	U	U	U	U	U	U	U	U
50	Masculino	54	Normal	U	U	U	U	U	U	U	U	U	U	U	U
51	Masculino	50	Normal	U	U	U	U	U	U	U	U	U	U	U	U
52	Feminino	65	Normal	U	U	U	U	U	U	U	U	U	U	40,3	41
53	Feminino	56	Normal	U	U	U	U	U	U	U	U	U	U	U	U
54	Masculino	67	Normal	U	35,6	U	U	41,3	U	U	U	U	U	U	U
55	Masculino	70	Normal	U	U	U	U	U	U	U	U	U	U	U	U
56	Feminino	75	Normal	U	U	U	U	U	U	U	U	U	U	U	U
57	Feminino	50	Normal	U	U	U	U	U	U	U	U	U	U	U	U
58	Feminino	66	Normal	U	U	U	U	U	U	U	U	U	U	U	U
59	Masculino	49	Normal	U	U	U	U	U	41,6	U	U	U	U	U	U

No.	Sexo	Idade	Colonoscopia	Ct BMP3						NDRG4					
				Iniciadores e sondas preferidas			Iniciadores e sondas comparativas			Iniciadores e sondas preferidas			Iniciadores e sondas comparativas		
				1	2	3	1	2	3	1	2	3	1	2	3
60	Masculino	71	Normal	U	U	U	40,8	U	U	U	U	U	U	U	U
61	Masculino	70	Normal	U	U	U	U	U	U	U	U	U	U	40,5	U
62	Masculino	73	Normal	U	U	U	U	U	U	U	U	U	U	U	U
63	Masculino	48	Normal	U	U	U	U	38,5	U	U	U	U	U	U	U
64	Masculino	52	Normal	U	U	U	U	U	U	U	U	U	U	U	39,6
65	Masculino	71	Normal	U	U	U	U	U	U	U	U	U	U	U	U
66	Feminino	60	Normal	U	U	U	U	U	41,9	U	U	35,9	39,4	U	U
67	Feminino	65	Normal	U	U	U	U	U	U	U	U	U	U	U	U
68	Feminino	74	Normal	U	U	U	U	U	U	U	U	U	U	U	U
69	Masculino	71	Normal	U	U	U	U	U	U	U	U	U	U	U	U
70	Feminino	73	Normal	U	U	U	U	U	U	U	U	U	U	U	U
71	Masculino	49	Normal	U	U	U	U	U	U	U	U	U	U	U	U
72	Feminino	69	Normal	U	U	U	U	U	U	U	U	U	U	U	U
73	Masculino	59	Normal	U	U	U	42,7	41,9	42,5	U	U	U	U	U	U
74	Masculino	71	Normal	U	U	37,1	U	U	U	U	U	U	U	U	U
75	Feminino	54	Normal	U	U	U	U	U	U	U	U	U	U	38,9	35,2
76	Masculino	71	Normal	U	U	U	U	U	U	U	U	U	U	U	U
77	Feminino	63	Normal	U	U	U	U	U	U	U	U	U	U	U	U
78	Masculino	74	Normal	U	U	U	U	U	U	U	U	U	U	U	U
79	Masculino	62	Normal	U	U	U	U	U	U	U	U	U	U	U	U
80	Feminino	75	Normal	U	U	U	U	U	U	U	U	U	U	U	U
81	Masculino	48	Normal	U	U	U	U	U	U	U	U	U	U	U	U

Notes U: indeterminado

Exemplo 5

Rastreamento das combinações de iniciador de metilação e sonda de genes BMP3 e NDRG4**Extração de DNA fecal**

[00332] DNA fecal é extraído de acordo com o protocolo do exemplo 3.

Detecção de metilação de genes BMP3 e NDRG4

[00333] As combinações de iniciador e sonda de genes BMP3 e NDRG4 está mostrada abaixo. qPCR foi realizada com as nove combinações, respectivamente, de acordo com as etapas do exemplo 3.

Tabela 19. Combinações de iniciador e sonda

Combinação N°	BMP3	NDRG4
1	Preferido 3	Preferido 1
2	Preferido 3	Preferido 2
3	Preferido 3	Preferido 3
4	Preferido 1	Preferido 1
5	Preferido 1	Preferido 2
6	Preferido 1	Preferido 3
7	Preferido 2	Preferido 1
8	Preferido 2	Preferido 2
9	Preferido 2	Preferido 3

[00334] As sequências dos iniciadores e sondas das nove combinações de genes BMP3 e NDRG4 são as seguintes:

[00335] Tabela 20. Sequências dos iniciadores e sondas nas combinações

Combinação N°	Gene	Grupo	Iniciador/Sonda	Sequência ID	Sequência (5' para 3')
1	BMP3	Preferido 3	Iniciador direto	SEQ ID NO.:15	AATATTCGGGTTATATACGTCGCGAT
			Iniciador reverso	SEQ ID NO.:16	ACTTACTACGCTAACCCAACG

Combinação N°	Gene	Grupo	Iniciador/Sonda	Sequência ID	Sequência (5' para 3')
			Sonda	SEQ ID NO.:17	TAGCGTTGGAGTGGAGACGGCGTTC GTA
			Iniciador direto	SEQ ID NO.:6	ATCGATCGGGGTGTTTTTAGGTTTC
			Iniciador reverso	SEQ ID NO.:7	CCTTCTACGCGACTAAAATACCCGAT
			Sonda	SEQ ID NO.:8	CGTCGCGGTTTTCGTTCTTTTTTCG TTCGT
2	BMP3	Preferido 3	Iniciador direto	SEQ ID NO.:15	AATATTCGGGTTATATACGTCGCGAT T
			Iniciador reverso	SEQ ID NO.:16	ACTTACTACGCTAACCCAACG
			Sonda	SEQ ID NO.:17	TAGCGTTGGAGTGGAGACGGCGTTC GTA
	NDRG 4	Preferido 2	Iniciador direto	SEQ ID NO.:12	GCGGGTGAGAAGTCGGC
			Iniciador reverso	SEQ ID NO.:13	GTAACCTCCGCCTTCTACGC
			Sonda	SEQ ID NO.:14	TAGGTTTCGCGTCGCGGTTTTTCGTT
3	BMP3	Preferido 3	Iniciador direto	SEQ ID NO.:15	AATATTCGGGTTATATACGTCGCGAT T
			Iniciador reverso	SEQ ID NO.:16	ACTTACTACGCTAACCCAACG
			Sonda	SEQ ID NO.:17	TAGCGTTGGAGTGGAGACGGCGTTC GTA
	NDRG 4	Preferido 3	Iniciador direto	SEQ ID NO.:18	CGGTTTTCGTTCTTTTTTCG
			Iniciador reverso	SEQ ID NO.:19	AACCTAAACTAATCCCGAACGAACC
			Sonda	SEQ ID NO.:20	TCGTTTATCGGGTATTTTAGTCGCGT AG
4	BMP3	Preferido 1	Iniciador direto	SEQ ID NO.:3	TTTGAAAATATTCGGGTTATATACGTC GC
			Iniciador reverso	SEQ ID NO.:4	ATAAACTCTCCCAACAACACTACGCG AA
			Sonda	SEQ ID	AGCGTTGGAGTGGAGACGGCGTTTCG

Combinação N°	Gene	Grupo	Iniciador/Sonda	Sequência ID	Sequência (5' para 3')
	NDRG 4	Preferido 1		NO.:5	
			Iniciador direto	SEQ ID NO.:6	ATCGATCGGGGTGTTTTTAGGTTTC
			Iniciador reverso	SEQ ID NO.:7	CCTTCTACGCGACTAAAATACCCGAT
			Sonda	SEQ ID NO.:8	CGTCGCGGTTTTCGTTCTTTTTTCGTTCT
5	BMP3	Preferido 1	Iniciador direto	SEQ ID NO.:3	TTTGAAAATATTCGGGTATATACGTCGC
			Iniciador reverso	SEQ ID NO.:4	ATAAACTCTTCCCCAACAACTACGCGAA
			Sonda	SEQ ID NO.:5	AGCGTTGGAGTGGAGACGGCGTTTCG
	NDRG 4	Preferido 2	Iniciador direto	SEQ ID NO.:12	GCGGGTGAGAAGTCGGC
			Iniciador reverso	SEQ ID NO.:13	GTAACCTCCGCTTCTACGC
			Sonda	SEQ ID NO.:14	TAGGTTTCGCGTCGCGGTTTTTCGTT
6	BMP3	Preferido 1	Iniciador direto	SEQ ID NO.:3	TTTGAAAATATTCGGGTATATACGTCGC
			Iniciador reverso	SEQ ID NO.:4	ATAAACTCTTCCCCAACAACTACGCGAA
			Sonda	SEQ ID NO.:5	AGCGTTGGAGTGGAGACGGCGTTTCG
	NDRG 4	Preferido 3	Iniciador direto	SEQ ID NO.:18	CGGTTTTCGTTCTTTTTTCG
			Iniciador reverso	SEQ ID NO.:19	AACCTAAAATAATCCCGAACGAACC
			Sonda	SEQ ID NO.:20	TCGTTTATCGGGTATTTTAGTCGCGTAG
7	BMP3	Preferido 2	Iniciador direto	SEQ ID NO.:9	AATATTCGGGTATATACGTCGCGA
			Iniciador reverso	SEQ ID NO.:10	GCAACCTAACAAATAAACTCTTCCCCAA
			Sonda	SEQ ID NO.:11	TGGAGTGGAGACGGCGTTCTAGCGT

Combinação N°	Gene	Grupo	Iniciador/Sonda	Sequência ID	Sequência (5' para 3')
	NDRG 4	Preferido 1	Iniciador direto	SEQ ID NO.:6	ATCGATCGGGGTGTTTTTAGGTTTC
			Iniciador reverso	SEQ ID NO.:7	CCTTCTACGCGACTAAAATACCCGAT
			Sonda	SEQ ID NO.:8	CGTCGCGGTTTTCGTTCGTTTTTCGTTTCGT
8	BMP3	Preferido 2	Iniciador direto	SEQ ID NO.:9	AATATTCGGGTTATATACGTCGCGA
			Iniciador reverso	SEQ ID NO.:10	GCAACCTAACAAATAAACTCTTCCCCAA
			Sonda	SEQ ID NO.:11	TGGAGTGGAGACGGCGTTCGTAGCGT
	NDRG 4	Preferido 2	Iniciador direto	SEQ ID NO.:12	GCGGGTGAGAAGTCGGC
			Iniciador reverso	SEQ ID NO.:13	GTAACCTCCGCCTTCTACGC
			Sonda	SEQ ID NO.:14	TAGGTTTCGCGTCGCGGTTTTTCGTT
9	BMP3	Preferido 2	Iniciador direto	SEQ ID NO.:9	AATATTCGGGTTATATACGTCGCGA
			Iniciador reverso	SEQ ID NO.:10	GCAACCTAACAAATAAACTCTTCCCCAA
			Sonda	SEQ ID NO.:11	TGGAGTGGAGACGGCGTTCGTAGCGT
	NDRG 4	Preferido 3	Iniciador direto	SEQ ID NO.:18	CGGTTTTCGTTCGTTTTTTTCG
			Iniciador reverso	SEQ ID NO.:19	AACCTAAAATAATCCCGAACGAACC
			Sonda	SEQ ID NO.:20	TCGTTTATCGGGTATTTTAGTCGCGTAG

A mistura mestre de qPCR usada na reação é a seguinte:

Tabela 21. Mistura mestre de QPCR para BMP3/NDRG4

N°	Reagentes	Concentração Final
1	10× PCR tampão	1×
2	MgCl ₂	2 mM
3	dNTP s	0,2 mM
4	Taq DNA	2 U
5	Cada iniciador	0,75 µM
6	Cada sonda	0,25 µM
7	DNA gabarito	2 µL
8	Água Ultrapura	até 50 µL

[00336] As condições reacionais de qPCR são um ciclo de desnaturação a 95°C por 2 minutos, e 50 ciclos de desnaturação a 95°C por 20 segundos e alongação a 60°C por 1 minuto.

Deteção de variantes do gene KRAS

[00337] Foram detectados sete pontos de mutação nos códons 12 e 13 do gene KRAS. Os sete mutantes são G12D, G13D, G12V, G12C, G12S, G12A e G13R e as seqüências dos respectivos iniciadores de sondas estão mostradas na Tabela 22.

Tabela 22 Iniciadores e sondas para detectar sete mutações do gene KRAS

Nome do iniciador	Iniciador/Sonda	Seqüência ID	Seqüência (5' para 3')
G12D-F	Iniciador direto	SEQ ID NO.:35	AACTTGTGGTAGTTGGAGGTGA
G13D-F	Iniciador direto	SEQ ID NO.:36	AACTTGTGGTAGTTGGAGCTGGGGA
G12V-F	Iniciador direto	SEQ ID NO.:37	AACTTGTGGTAGTTGGAGTTGT
G12C-F	Iniciador direto	SEQ ID NO.:38	AACTTGTGGTAGTTGGGGCTT
G12S-F	Iniciador direto	SEQ ID NO.:39	AACTTGTGGTAGTTGGTGCTA
G12A-F	Iniciador direto	SEQ ID NO.:40	AACTTGTGGTAGTTGGAGCAGC
G12R-F	Iniciador direto	SEQ ID	AACTTGTGGTAGTTGGAGCTC

Nome do iniciador	Iniciador/Sonda	Sequência ID	Sequência (5' para 3')
		NO.:41	
Kras-R	Iniciador reverso	SEQ ID NO.:42	GAATGGTCCTGCACCAGTAATATG
ACTB-F	Iniciador direto	SEQ ID NO.:43	AGGGCTTCTTGTCTTTCCTT
ACTB-R	Iniciador reverso	SEQ ID NO.:44	CGTGCTCGATGGGGTACTTC
KRAS-P	Sonda	SEQ ID NO.:45	AGGCAAGAGTGCCTTGACGATACAGC
ACTB-P	Sonda	SEQ ID NO.:46	CGTGATGGTGGGCATGGGTCAGAAGGA

[00338] A mistura mestre de qPCR usada na reação é a seguinte:

[00339] Tabela 23. Mistura mestre de qPCR para KRAS

N°	Reagentes	Concentração final
1	G12A-F	0,72 µM
2	G12C-F	0,60 µM
3	G12D-F	0,72 µM
4	G12R-F	0,48 µM
5	G12S-F	0,90 µM
6	G12V-F	0,72 µM
7	G13D-F	0,48 µM
8	Kras-R	0,90 µM
9	Kras-P	0,10 µM
10	ACTB-F	0,30 µM
11	ACTB -R	0,30 µM
12	ACTB -P	0,05 µM
13	5×PCR tampão,-Mg ²⁺	1×
14	MgCl ₂	1,0 mM
15	dNTPs	0,1 mM
16	Taq DNA Polimerase	2,5 U
17	DNA gabarito	2 µL
18	Água ultrapura	até 50 µL

[00340] As condições reacionais de qPCR são um ciclo de desnaturação a 95°C por 5 minutos e 45 ciclos de desnaturação a

95°C por 15 segundos, têmpera a 71°C por 60 segundos, e então alonga o a 55°C por 50 segundos.

[00341] O controle de qualidade da rea o de qPCR foi realizado usando ACTB como um gene de referência.

(4) Exame de hemoglobina fecal

[00342] Hemoglobina fecal foi detectada com o exame imunoc mico de fezes (FIT), e o resultado   positivo ou negativo.

(5) Gerar um escore com uma fórmula

[00343] Colocar o valor de Ct da detec o por qPCR dos genes BMP3, NDRG4 e KRAS, e resultado positivo e negativo do exame de hemoglobina fecal na seguinte fórmula de regressão logística:

$$P=e^k/(1+e^k)$$

[00344] onde: P   um  ndice de abrangência, $K=a*\Delta Ct1+b*\Delta Ct2+c*\Delta Ct3+d*FIT+X$, e   uma constante natural, a, b, c, d, X são constantes clínicas. $\Delta Ct1$, $\Delta Ct2$, e $\Delta Ct3$ são valores de Ct dos genes alvo subtraídos daquele dos genes de referência.

[00345] O resultado do exame   positivo se o valor de P for maior ou igual a um limiar predeterminado, do contrário   negativo. O resultado positivo indica que   possível que o indivíduo tenha CRC ou AA.

(6) Resultado do exame

[00346] As oitenta e uma amostras de fezes do exemplo 3 foram analisadas e os resultados de diferentes combina es de iniciadores e sondas dos genes BMP3 e NDRG4 estão mostrados na Tabela 24.

Tabela 24 resultados da detecção de 81 amostras de fezes

Combinação N°	BMP3	NDRG4	Sensibilidade (CRC+AA)	Especificidade (CRC+AA)	Número de amostras que testaram positivo em CRC	Número de amostras que testaram positivo em AA	Número de amostras que testaram negativo em normal	Sensibilidade (CRC)	Sensibilidade (AA)
1	Preferido 3	Preferido 1	94,3%	97,8%	19/20	14/15	45/46	95,0%	93,3%
2	Preferido 3	Preferido 2	91,4%	97,8%	18/20	14/15	45/46	90,0%	93,3%
3	Preferido 3	Preferido 3	80,0%	95,6%	16/20	12/15	44/46	80,0%	80,0%
4	Preferido 1	Preferido 1	97,1%	100,0%	20/20	14/15	46/46	100,0%	93,3%
5	Preferido 1	Preferido 2	97,1%	97,8%	20/20	14/15	45/46	100,0%	93,3%
6	Preferido 1	Preferido 3	88,6%	95,6%	19/20	12/15	44/46	95,0%	80,0%
7	Preferido 2	Preferido 1	97,1%	97,8%	19/20	15/15	45/46	95,0%	100,0%
8	Preferido 2	Preferido 2	94,3%	97,8%	19/20	14/15	45/46	95,0%	93,3%
9	Preferido 2	Preferido 3	85,7%	95,6%	19/20	11/15	44/46	95,0%	73,3%

[00347] É possível observar que: (1) As combinações n° 4, 5 e 7 são superiores às outras seis combinações. Considerando que todos os iniciadores e sondas são iniciadores e sondas preferidoe e são superiores aos outros iniciadores e sondas (vide Exemplo 3), as três combinações particulares são superiores a todas as combinações conhecidas de iniciadores/sondas de BMP3 e NDRG4. (2) A sensibilidade e a especificidade do kit para detecção de CRC e AA compreendendo genes BMP3, NDRG4, KRAS e detecção de hemoglobina fecal são significativamente melhores que aquelas da detecção de metilação de gene BMP3 ou NDRG4 único. (3) A sensibilidade e a especificidade do kit para detecção de CRC na população asiática (por exemplo, na população chinesa) são obviamente superiores às dos produtos similares existentes, tal como Cologuard®. (4) A sensibilidade e a especificidade do kit para detecção de AA na população asiática (por exemplo, na população chinesa) são significativamente melhores que as dos produtos similares existentes, tal como Cologuard®.

[00348] As descrições, incluindo as reivindicações, figuras e/ou desenhos, de toda e qualquer patente, pedido de patente, e publicação citada neste pedido estão aqui incorporadas em sua íntegra a título de referência.

[00349] A menos que definido em contrário, todos os termos técnicos e científicos neste pedido têm o mesmo significado que aquele comumente conhecido pelo especialista na técnica à qual esta invenção pertence. Embora quaisquer métodos e materiais, similares ou equivalentes àqueles descritos neste pedido, possam ser usados na prática ou testagem da presente invenção, os métodos e materiais preferidos estão descritos neste relatório. Todas as publicações, patentes, pedidos de patente citados estão aqui incorporados em sua íntegra a título de referência para todos os fins.

[00350] As publicações discutidas neste pedido são mencionadas exclusivamente por sua descrição anterior à data de depósito do presente pedido. Nada neste pedido deve ser interpretado como reconhecimento de que a presente invenção não tem direito a antedatar tal publicação em função de invenções anteriores.

[00351] Embora a invenção tenha sido descrita em relação à modalidades específicas da mesma, ficará entendido que ela é passível de outras modificações e que este pedido destina-se a cobrir quaisquer variações, usos, ou adaptações da invenção seguindo, de modo geral, os princípios da invenção e incluindo desvios a partir da presente descrição que sejam de prática conhecida e rotineira na técnica à qual a invenção pertence e que possam ser aplicados aos aspectos essenciais apresentados acima e abrangidos pelo escopo das reivindicações anexas.

REIVINDICAÇÕES

1. Kit para detectar a presença ou a ausência de câncer colorretal (CRC) ou adenoma avançado (AA) em um paciente com necessidade do mesmo, caracterizado pelo fato de que compreende:

um primeiro par de iniciadores e uma primeira sonda para detectar o estado ou nível de metilação de pelo menos um dinucleotídeo CpG do gene BMP3 em uma amostra biológica obtida do paciente, em que o primeiro par de iniciadores e a primeira sonda compreendem, cada um, uma sequência contígua de pelo menos 16 nucleotídeos que é idêntica, complementar, ou hibridiza em condições de hibridização rigorosas para SEQ ID NO.: 1,

um segundo par de iniciadores e uma segunda sonda para detectar o estado ou nível de metilação de pelo menos um dinucleotídeo CpG do gene NDRG4 em uma amostra biológica obtida do paciente, em que o segundo par de iniciadores e a segunda sonda compreendem, cada um, uma sequência contígua de pelo menos 16 nucleotídeos que é idêntica, complementar, ou hibridiza em condições de hibridização rigorosas para SEQ ID NO.: 2,

2. Kit de acordo com a reivindicação 1,

caracterizado pelo fato de que o primeiro par de iniciadores e a primeira sonda são selecionados do grupo que consiste em:

um iniciador direto compreendendo a SEQ ID NO.: 3, um iniciador reverso compreendendo a SEQ ID NO.: 4, e uma sonda compreendendo a SEQ ID NO.: 5;

um iniciador direto compreendendo a SEQ ID NO.: 9, um iniciador reverso compreendendo a SEQ ID NO.: 10, e uma sonda compreendendo a SEQ ID NO.: 11; e

um iniciador direto compreendendo a SEQ ID NO.: 15, um iniciador reverso compreendendo a SEQ ID NO.: 16, e uma sonda compreendendo a SEQ ID NO.: 17;

e,

em que o segundo par de iniciadores e a segunda sonda são selecionados do grupo que consiste em:

iv) um iniciador direto compreendendo a SEQ ID NO.: 6, um iniciador reverso compreendendo a SEQ ID NO.: 7, e uma sonda compreendendo a SEQ ID NO.: 8;

v) um iniciador direto compreendendo a SEQ ID NO.: 12, um iniciador reverso compreendendo a SEQ ID NO.: 13, e uma sonda compreendendo a SEQ ID NO.: 14; e

vi) um iniciador direto compreendendo a SEQ ID NO.: 18, um iniciador reverso compreendendo a SEQ ID NO.: 19, e uma sonda compreendendo a SEQ ID NO.: 20;

3. Kit de acordo com a reivindicação 1, caracterizado por compreender:

um iniciador direto compreendendo a SEQ ID NO.: 3, um iniciador reverso compreendendo a SEQ ID NO.: 4, e uma sonda compreendendo a SEQ ID NO.: 5, para detectar o estado ou nível de metilação de pelo menos um dinucleotídeo CpG do gene BMP3 na amostra biológica obtida do paciente, e

um iniciador direto compreendendo a SEQ ID NO.: 6, um iniciador reverso compreendendo a SEQ ID NO.: 7, e uma sonda compreendendo a SEQ ID NO.: 8, para detectar o estado ou nível de metilação de pelo menos um dinucleotídeo CpG do gene NDRG4 na amostra biológica obtida do paciente.

4. Kit de acordo com a reivindicação 1, caracterizado pelo fato de que compreende:

um iniciador direto compreendendo a SEQ ID NO.: 9, um iniciador reverso compreendendo a SEQ ID NO.: 10, e uma sonda compreendendo a SEQ ID NO.: 11, para detectar o estado ou nível de metilação de pelo menos um dinucleotídeo CpG do gene BMP3 na

amostra biológica obtida do paciente, e

um iniciador direto compreendendo a SEQ ID NO.: 12, um iniciador reverso compreendendo a SEQ ID NO.: 13, e uma sonda compreendendo a SEQ ID NO.: 14, para detectar o estado ou nível de metilação de pelo menos um dinucleotídeo CpG do gene NDRG4 na amostra biológica obtida do paciente.

5. Kit de acordo com a reivindicação 1, caracterizado pelo fato de que compreende:

um iniciador direto compreendendo a SEQ ID NO.: 15, um iniciador reverso compreendendo a SEQ ID NO.: 16, e uma sonda compreendendo a SEQ ID NO.: 17, para detectar o estado ou nível de metilação de pelo menos um dinucleotídeo CpG do gene BMP3 na amostra biológica obtida do paciente, e

um iniciador direto compreendendo a SEQ ID NO.: 18, um iniciador reverso compreendendo a SEQ ID NO.: 19, e uma sonda compreendendo a SEQ ID NO.: 20, para detectar o estado ou nível de metilação de pelo menos um dinucleotídeo CpG do gene NDRG4 na amostra biológica obtida do paciente.

6. Kit de acordo com qualquer uma das reivindicações 1 a 5, caracterizado pelo fato de que tanto a primeira sonda quanto a segunda sonda compreendem um doador fluorescente e um fluoróforo aceptor.

7. Kit de acordo com a reivindicação 6, caracterizado pelo fato de que a primeira sonda e a segunda sonda são sondas TAQMAN®.

8. Kit de acordo com qualquer uma das reivindicações 1 a 7, caracterizado pelo fato de que compreende ainda:

um meio para detectar a presença ou a ausência de pelo menos uma mutação no gene KRAS no paciente; e

um meio para detectar a presença ou a ausência de

hemoglobina em uma amostra biológica obtida do paciente.

9. Kit de acordo com a reivindicação 8, caracterizado pelo fato de que o meio para detectar a presença ou a ausência de pelo menos uma mutação no gene KRAS no paciente compreende pelo menos um par de iniciadores capazes de amplificar a região do Exon 12 e/ou do Exon 13 do gene KRAS em uma reação em cadeia da polimerase (PCR).

10. Kit de acordo com a reivindicação 8, caracterizado pelo fato de que o meio para detectar a presença ou a ausência de hemoglobina na amostra biológica compreende um anticorpo anti-hemoglobina.

11. Kit de acordo com a reivindicação 9, caracterizado pelo fato de que os iniciadores são capazes de amplificar uma região do gene KRAS compreendendo pelo menos uma mutação em KRAS selecionada do grupo que consiste em G12D, G12V, G12C, G13D, G12A, G12R, G12S, e G13C.

12. Kit de acordo com a reivindicação 10, caracterizado pelo fato de que o anticorpo é um anticorpo conjugado a ouro coloidal.

13. Kit de acordo com qualquer uma das reivindicações 1 a 12, caracterizado pelo fato de que compreende ainda um meio para amplificar um gene de referência para quantificação.

14. Kit de acordo com qualquer uma das reivindicações 1 a 12, caracterizado pelo fato de que compreende ainda instruções de uso e/ou a interpretação de um resultado de teste obtido usando o kit.

15. Kit de acordo com a reivindicação 10, caracterizado pelo fato de que compreende ainda um meio para detectar um complexo formado pelo anticorpo e a hemoglobina na amostra biológica.

16. Kit de acordo com qualquer uma das reivindicações 1 a 15, caracterizado pelo fato de que a amostra biológica obtida do

paciente é uma amostra de fezes.

17. Kit de acordo com qualquer uma das reivindicações 1 a 16, caracterizado pelo fato de que compreende ainda um reagente bissulfito, e um recipiente adequado para misturar o reagente bissulfito e a amostra biológica do paciente, ou polinucleotídeos obtidos da amostra biológica.

18. Kit de acordo com qualquer uma das reivindicações 1 a 17, caracterizado pelo fato de que compreende ainda um reagente do tipo enzima de restrição sensível à metilação.

19. Kit de acordo com qualquer uma das reivindicações 1 a 18, caracterizado pelo fato de que compreende ainda

um padrão positivo e um padrão negativo para detectar metilação de BMP3 na amostra biológica, e

um padrão positivo e um padrão negativo para detectar metilação de NDRG4 na amostra biológica.

20. Kit de acordo com a reivindicação 19, caracterizado pelo fato de que

o padrão positivo para detectar metilação de BMP3 compreende uma sequência de polinucleotídeos de
 GTTAGTTTGGTTCGGGTGTTTTTAAAATAAAGCGAGGAGGGAAGG
 TATAGATAGATTTTGAATAATTCGGGTTATATACGTCGCGATTTAT
 AGTTTTTTTTTAGCGTTGGAGTGGAGACGGCGTTCGTAGCGTTTT
 GCGCGGGTGAGGTTTCGCGTAGTTGTTGGGAAGAGTTTATTTGTT
 AGGTTGCGTTGGGTTAGCGTAGTAAGTGGGGTTGGTCGTTATTTTC
 GTTGTATTCGGTCGCGTTTTCGGGTTTCGTGCGTTTTTCGTTTTAG
 (SEQ ID NO: 67);

o padrão negativo para detectar metilação de BMP3 compreende uma sequência de polinucleotídeos de

GTTAGTTTGGTTCGGGTGTTTTTAAAATAAAGTGAGGAG
 GGAAGGTATAGATAGATTTTGAATAATTTGGGTTATATATGTTGT

GATTTATAGTTTTTTTTTAGTGTTGGAGTGGAGATGGTGTGTTGTAG
 TGTTTTGTGTGGGTGAGGTTTGTGTAGTTGTTGGGGAAGAGTTTAT
 TTGTTAGGTTGTGTTGGGTTAGTGTAGTAAGTGGGGTTGGTTGTTA
 TTTTGTGTTTTGGTTGTGTTTTGGGTTTTGTGTGTTTTTGTTTTA
 G (SEQ ID NO: 68);

o padrão positivo para detectar metilação de NDRG4
 compreende uma sequência de polinucleotídeos de

TGAGAAGTCGGCGGGGGCGCGGATCGATCGGGGTGT
 TTTTLAGGTTTCGCGTCGCGGTTTTCGTTTCGTTTTTTCGTTTCGTTTA
 TCGGGTATTTTAGTCGCGTAGAAGGCGGAAGTTACGCGCGAGGG
 ATCGCGGTTTCGTTTCGGGATTAGTTTTAGGTTTCGGTATCGTTTCGC
 GGGTCGAGCGTTTATATTCGTTAAATTTACGCGGGTACGTTTTTCGC
 GGCGTATCGTTTTTAGTT (SEQ ID NO.: 69); e

o padrão negativo para detectar metilação de NDRG4
 compreende uma sequência de polinucleotídeos de

TGAGAAGTTGGTGGGGGTGTGGATTGATTGGGGTGTTT
 TTTAGGTTTTGTGTTGTGGTTTTTGTGTTTTTTTTGTTTGTGTTATTG
 GGTATTTTAGTTGTGTAGAAGGTGGAAGTTATGTGTGAGGGATTG
 TGGTTTGTGTTGGGATTAGTTTTAGGTTTGGTATTGTTTTGTGGGT
 GAGTGTTTATATTTGTTAAATTTATGTGGGTATGTTTTTGTGGTGTA
 TTGTTTTTAGTT (SEQ ID NO.: 70).

21. Kit de acordo com a reivindicação 13, caracterizado
 pelo fato de que o meio para amplificar um gene de controle interno
 compreende compreendendo iniciadores para amplificar um gene de
 controle positivo e/ou um gene de controle negativo.

22. Método para detecção da presença ou ausência de
 câncer colorretal (CRC) ou adenoma avançado (AA) em um paciente
 com necessidade do mesmo, caracterizado pelo fato de que
 compreende:

obter DNA genômico de uma amostra biológica do

paciente;

tratar o DNA genômico de a), ou um fragmento do mesmo, com um ou mais reagentes para converter bases citosina não metiladas do mesmo em uracila ou outra base que é detectavelmente diferente da citosina em termos de propriedades de hibridização;

colocar o DNA genômico tratado, ou o fragmento tratado do mesmo, em contato com um primeiro par de iniciadores para detecção da presença ou ausência de sítios de metilação de um gene codificando a proteína morfogenética óssea 3 (BMP3) no paciente, e um segundo par de iniciadores para detecção da presença ou ausência de sítios de metilação de um gene codificando a proteína do membro 4 da família de NDRG (NDRG4) no paciente, em que o primeiro par de iniciadores compreende uma sequência contígua de pelo menos 9 nucleotídeos que é idêntica, complementar, ou hibridiza em condições de hibridização rigorosas para SEQ ID NO.: 1, e em que o segundo par de iniciadores compreende uma sequência contígua de pelo menos 9 nucleotídeos que é complementar, ou hibridiza em condições de hibridização rigorosas para SEQ ID NO.: 2, em que o DNA genômico tratado ou o fragmento do mesmo ou é amplificado para produzir pelo menos um amplificado pelo primeiro par de iniciadores ou pelo segundo par de iniciadores, ou não é amplificado; e

determinar a presença ou ausência de CRC ou AA no paciente, com base na presença ou ausência do referido amplificado, o estado ou nível de metilação de pelo menos um dinucleotídeo CpG do gene BMP3 e do gene NDRG4 no paciente.

23. Método de acordo com a reivindicação 22, caracterizado pelo fato de que o primeiro par de iniciadores e a primeira sonda são selecionados do grupo que consiste em:

um iniciador direto compreendendo a SEQ ID NO.: 3, um iniciador reverso compreendendo a SEQ ID NO.: 4, e uma sonda

compreendendo a SEQ ID NO.: 5;

um iniciador direto compreendendo a SEQ ID NO.: 9, um iniciador reverso compreendendo a SEQ ID NO.: 10, e uma sonda compreendendo a SEQ ID NO.: 11; e

um iniciador direto compreendendo a SEQ ID NO.: 15, um iniciador reverso compreendendo a SEQ ID NO.: 16, e uma sonda compreendendo a SEQ ID NO.: 17;

e,

em que o segundo primeiro par de iniciadores e a segunda sonda são selecionados do grupo que consiste em:

um iniciador direto compreendendo a SEQ ID NO.: 6, um iniciador reverso compreendendo a SEQ ID NO.: 7, e uma sonda compreendendo a SEQ ID NO.: 8;

um iniciador direto compreendendo a SEQ ID NO.: 12, um iniciador reverso compreendendo a SEQ ID NO.: 13, e uma sonda compreendendo a SEQ ID NO.: 14; e

um iniciador direto compreendendo a SEQ ID NO.: 18, um iniciador reverso compreendendo a SEQ ID NO.: 19, e uma sonda compreendendo a SEQ ID NO.: 20;

24. Método de acordo com a reivindicação 22, caracterizado pelo fato de que compreende o uso de

um iniciador direto compreendendo a SEQ ID NO.: 3, um iniciador reverso compreendendo a SEQ ID NO.: 4, e uma sonda compreendendo a SEQ ID NO.: 5, para detectar o estado ou nível de metilação de pelo menos um dinucleotídeo CpG do gene BMP3 na amostra biológica obtida do paciente, e

um iniciador direto compreendendo a SEQ ID NO.: 6, um iniciador reverso compreendendo a SEQ ID NO.: 7, e uma sonda compreendendo a SEQ ID NO.: 8, para detectar o estado ou nível de metilação de pelo menos um dinucleotídeo CpG do gene NDRG4 na

amostra biológica obtida do paciente.

25. Método de acordo com a reivindicação 22, caracterizado pelo fato de que compreende o uso de

um iniciador direto compreendendo a SEQ ID NO.: 9, um iniciador reverso compreendendo a SEQ ID NO.: 10, e uma sonda compreendendo a SEQ ID NO.: 11, para detectar o estado ou nível de metilação de pelo menos um dinucleotídeo CpG do gene BMP3 na amostra biológica obtida do paciente, e

um iniciador direto compreendendo a SEQ ID NO.: 12, um iniciador reverso compreendendo a SEQ ID NO.: 13, e uma sonda compreendendo a SEQ ID NO.: 14, para detectar o estado ou nível de metilação de pelo menos um dinucleotídeo CpG do gene NDRG4 na amostra biológica obtida do paciente.

26. Método de acordo com a reivindicação 22, caracterizado pelo fato de que compreende o uso de

um iniciador direto compreendendo a SEQ ID NO.: 15, um iniciador reverso compreendendo a SEQ ID NO.: 16, e uma sonda compreendendo a SEQ ID NO.: 17, para detectar o estado ou nível de metilação de pelo menos um dinucleotídeo CpG do gene BMP3 na amostra biológica obtida do paciente, e

um iniciador direto compreendendo a SEQ ID NO.: 18, um iniciador reverso compreendendo a SEQ ID NO.: 19, e uma sonda compreendendo a SEQ ID NO.: 20, para detectar o estado ou nível de metilação de pelo menos um dinucleotídeo CpG do gene NDRG4 na amostra biológica obtida do paciente.

27. Método de acordo com qualquer uma das reivindicações 22 a 26, caracterizado pelo fato de que tanto a primeira sonda quanto a segunda sonda compreendem um doador fluorescente e um fluoróforo aceptor.

28. Método de acordo com qualquer uma das

reivindicações 22 a 26, caracterizado pelo fato de que a primeira sonda e a segunda sonda são sondas TAQMAN®.

29. Método de acordo com qualquer uma das reivindicações 22 a 28, caracterizado pelo fato de que compreende ainda uma etapa de detecção da presença ou ausência de pelo menos uma mutação no gene KRAS em uma amostra biológica obtida do paciente, e uma etapa de detecção da presença ou ausência de hemoglobina em uma amostra biológica obtida do paciente.

30. Método de acordo com a reivindicação 29, caracterizado pelo fato de que a etapa de detecção da presença ou ausência de pelo menos uma mutação no gene KRAS no paciente compreende o uso de pelo menos um par de iniciadores capazes de amplificar a região do Exon 12 e/ou do Exon 13 do gene KRAS em uma reação em cadeia da polimerase (PCR).

31. Método de acordo com a reivindicação 29, caracterizado pelo fato de que a etapa de detecção da presença ou ausência de hemoglobina na amostra biológica compreende o uso de um anticorpo anti-hemoglobina.

32. Método de acordo com a reivindicação 30, caracterizado pelo fato de que os iniciadores são capazes de amplificar uma região do gene KRAS compreendendo pelo menos uma mutação em KRAS selecionada do grupo que consiste em G12D, G12V, G12C, G13D, G12A, G12R, G12S, e G13C.

33. Método de acordo com a reivindicação 31, caracterizado pelo fato de que o anticorpo é um anticorpo conjugado a ouro coloidal.

34. Método de acordo com qualquer uma das reivindicações 22 a 33, caracterizado pelo fato de que a amplificação do gene BMP3 é realizada em uma PCR quantitativa (qPCR), e o método compreende ainda amplificar um primeiro gene de referência

para determinar o valor de Ct da amplificação de BMP3 como $\Delta Ct1$.

35. Método de acordo com qualquer uma das reivindicações 22 a 33, caracterizado pelo fato de que a amplificação do gene NDRG4 é realizada em uma PCR quantitativa (qPCR), e o método compreende ainda amplificar um segundo gene de referência para determinar o valor de Ct da amplificação de NDRG4 como $\Delta Ct2$.

36. Método de acordo com qualquer uma das reivindicações 30 a 33, caracterizado pelo fato de que a amplificação do gene KRAS mutante é realizada em uma PCR quantitativa (qPCR), e o método compreende ainda amplificar um terceiro gene de referência para determinar o valor de Ct da amplificação do KRAS mutante como $\Delta Ct3$.

37. Método de acordo com a reivindicação 34 ou 35, caracterizado pelo fato de que o primeiro e o segundo genes de referência são os mesmos.

38. Método de acordo com a reivindicação 37, caracterizado pelo fato de que o mesmo gene de referência é um gene B2M.

39. Método de acordo com a reivindicação 36, caracterizado pelo fato de que o gene KRAS mutante compreende uma mutação selecionada do grupo que consiste em G12D, G13D, G12V, G12C, G12S, G12A, e G13R.

40. Método de acordo com a reivindicação 39, caracterizado pelo fato de que o gene KRAS mutante é amplificado por um ou mais pares de iniciadores selecionados do grupo que consiste em:

um iniciador direto G12D-F compreendendo a SEQ ID NO.: 35, e um iniciador reverso Kras-R compreendendo a SEQ ID NO.: 42;

um iniciador direto G13D-F compreendendo a SEQ ID NO.: 36, e um iniciador reverso Kras-R compreendendo a SEQ ID NO.: 42;

um iniciador direto G12V-F compreendendo a SEQ ID NO.: 37, e um iniciador reverso Kras-R compreendendo a SEQ ID NO.: 42;

um iniciador direto G12C-F compreendendo a SEQ ID NO.: 38, e um iniciador reverso Kras-R compreendendo a SEQ ID NO.: 42;

um iniciador direto G12S-F compreendendo a SEQ ID NO.: 39, e um iniciador reverso Kras-R compreendendo a SEQ ID NO.: 42;

um iniciador direto G12A-F compreendendo a SEQ ID NO.: 40, e um iniciador reverso Kras-R compreendendo a SEQ ID NO.: 42;
e

um iniciador direto G12R-F compreendendo a SEQ ID NO.: 41, e um iniciador reverso Kras-R compreendendo a SEQ ID NO.: 42,
e em que a sonda KRAS para a qPCR compreende a SEQ ID NO.: 46.

41. Método de acordo com a reivindicação 36, caracterizado pelo fato de que o terceiro gene de referência é um gene ACTB.

42. Método de acordo com a reivindicação 41, caracterizado pelo fato de que os iniciadores de qPCR para amplificar o gene ACTB compreendem as SEQ ID NOs.: 43 e 44, e a sonda compreende a SEQ ID NO.: 46.

43. Método de acordo com qualquer uma das reivindicações 22 a 42, caracterizado pelo fato de que compreende o uso de

um padrão positivo e um padrão negativo para detectar metilação de BMP3 na amostra, e

um padrão positivo e um padrão negativo para detectar metilação de NDRG4 na amostra.

44. Método de acordo com a reivindicação 43, caracterizado pelo fato de que

o padrão positivo para detectar metilação de BMP3

compreende uma sequência de polinucleotídeos de

GTTAGTTTGGTCGGGTGTTTTTAAAAATAAAGCGAGGA
GGGAAGGTATAGATAGATTTTGAAAATATTTCGGGTTATATACGTCCG
GATTTATAGTTTTTTTTTTAGCGTTGGAGTGGAGACGGCGTTCGTA
GCGTTTTGCGCGGGTGAGGTTTCGCGTAGTTGTTGGGGAAGAGTT
TATTTGTTAGGTTGCGTTGGGTTAGCGTAGTAAGTGGGGTTGGTC
GTTATTTTCGTTGTATTCGGTCGCGTTTCGGGTTTCGTGCGTTTTTCG
TTTTAG (SEQ ID NO: 67);

o padrão negativo para detectar metilação de BMP3
compreende uma sequência de polinucleotídeos de

GTTAGTTTGGTTGGGTGTTTTTAAAAATAAAGTGAGGAG
GGAAGGTATAGATAGATTTTGAAAATATTTGGGTTATATATGTTGT
GATTTATAGTTTTTTTTTTAGTGTTGGAGTGGAGATGGTGTTTGTAG
TGTTTTGTGTGGGTGAGGTTTGTGTAGTTGTTGGGGAAGAGTTTAT
TTGTTAGGTTGTGTTGGGTTAGTGTAGTAAGTGGGGTTGGTTGTTA
TTTTGTTGTATTTGGTTGTGTTTTGGGTTTTGTGTGTTTTTGTTTTA
G (SEQ ID NO: 68);

o padrão positivo para detectar metilação de NDRG4
compreende uma sequência de polinucleotídeos de

TGAGAAGTCGGCGGGGGCGCGGATCGATCGGGGTGT
TTTTTAGGTTTCGCGTCGCGGTTTTTCGTTTCGTTTTTTCGTTTCGTTTA
TCGGGTATTTTAGTCGCGTAGAAGGCGGAAGTTACGCGCGAGGG
ATCGCGGTTTCGTTTCGGGATTAGTTTTAGGTTTCGGTATCGTTTCGC
GGGTCGAGCGTTTATATTCGTTAAATTTACGCGGGTACGTTTTTCGC
GGCGTATCGTTTTTAGTT (SEQ ID NO.: 69); e

o padrão negativo para detectar metilação de NDRG4
compreende uma sequência de polinucleotídeos de

TGAGAAGTTGGTGGGGGTGTGGATTGATTGGGGTGTTT
TTTAGGTTTTGTGTTGTGGTTTTTGTGTTTTTTTTGTTTGTATTG
GGTATTTTAGTTGTGTAGAAGGTGGAAGTTATGTGTGAGGGATTG

TGGTTTGTGGGATTAGTTTTAGGTTTGGTATTGTTTTGTGGGTT
GAGTGTATATTTGTTAAATTTATGTGGGTATGTTTTGTGGTGTA
TTGTTTTAGTT (SEQ ID NO.: 70).

45. Método de acordo com qualquer uma das reivindicações 22 a 44, caracterizado pelo fato de que compreende a amplificação de um padrão de controle de qualidade.

46. Método para detecção da presença ou ausência de câncer colorretal (CRC) ou adenoma avançado (AA) em um paciente com necessidade do mesmo, caracterizado pelo fato de que compreende o uso de um kit como definido em qualquer uma das reivindicações 1 a 21.

47. Método para detecção da presença ou ausência de câncer colorretal (CRC) ou adenoma avançado (AA) em um paciente com necessidade do mesmo, caracterizado pelo fato de que compreende:

obter um DNA genômico não tratado de uma amostra de fezes do paciente;

tratar o DNA genômico de a), ou um fragmento do mesmo, com um ou mais reagentes para converter bases citosina não metiladas do mesmo em uracila ou outra base que é detectavelmente diferente da citosina em termos de propriedades de hibridização;

realizar uma PCR quantitativa (qPCR) usando o DNA genômico não tratado de b) como gabarito, e determinar o valor de Ct do gene BMP3 no paciente como $\Delta Ct1$;

realizar uma qPCR usando o DNA genômico não tratado de b) como gabarito, e determinar o valor de Ct do gene NDRG4 no paciente como $\Delta Ct2$;

realizar uma qPCR usando o DNA genômico não tratado como gabarito, e determinar o valor de Ct de um gene KRAS mutante no paciente como $\Delta Ct3$;

realizar um exame imunoquímico de fezes da proteína hemoglobina na amostra de fezes e determinar um escore como FIT;

determinar o valor de K, onde $K = a \cdot \Delta Ct1 + b \cdot \Delta Ct2 + c \cdot \Delta Ct3 + d \cdot FIT + X$, onde a, b, c, d, X são constantes clínicas; e

determinar o valor de um índice de abrangência P, em que $P = e^K / (1 + e^K)$, em que e é a constante natural, em que quando P é maior ou igual a um limiar predeterminado, determina-se que o paciente tem CRC e/ou AA, e quando P é menor que o limiar, determina-se que o paciente é saudável.

48. Método de acordo com a reivindicação 47, caracterizado pelo fato de que a qPCR para amplificar o gene BMP3 compreende um primeiro par de iniciadores e uma primeira sonda, em que o primeiro par de iniciadores e a primeira sonda são selecionados do grupo que consiste em:

um iniciador direto compreendendo a SEQ ID NO.: 3, um iniciador reverso compreendendo a SEQ ID NO.: 4, e uma sonda compreendendo a SEQ ID NO.: 5;

um iniciador direto compreendendo a SEQ ID NO.: 9, um iniciador reverso compreendendo a SEQ ID NO.: 10, e uma sonda compreendendo a SEQ ID NO.: 11; e

um iniciador direto compreendendo a SEQ ID NO.: 15, um iniciador reverso compreendendo a SEQ ID NO.: 16, e uma sonda compreendendo a SEQ ID NO.: 17;

e,

em que a qPCR para amplificar o gene NDRG4 compreende um segundo par de iniciadores e uma segunda sonda, em que o segundo par de iniciadores e a segunda sonda são selecionados do grupo que consiste em:

um iniciador direto compreendendo a SEQ ID NO.: 6, um

iniciador reverso compreendendo a SEQ ID NO.: 7, e uma sonda compreendendo a SEQ ID NO.: 8;

um iniciador direto compreendendo a SEQ ID NO.: 12, um iniciador reverso compreendendo a SEQ ID NO.: 13, e uma sonda compreendendo a SEQ ID NO.: 14; e

um iniciador direto compreendendo a SEQ ID NO.: 18, um iniciador reverso compreendendo a SEQ ID NO.: 19, e uma sonda compreendendo a SEQ ID NO.: 20;

49. Método de acordo com a reivindicação 47, caracterizado pelo fato de que compreende o uso de

um iniciador direto compreendendo a SEQ ID NO.: 3, um iniciador reverso compreendendo a SEQ ID NO.: 4, e uma sonda compreendendo a SEQ ID NO.: 5, para detectar o estado ou nível de metilação de pelo menos um dinucleotídeo CpG do gene BMP3 na amostra, e

um iniciador direto compreendendo a SEQ ID NO.: 6, um iniciador reverso compreendendo a SEQ ID NO.: 7, e uma sonda compreendendo a SEQ ID NO.: 8, para detectar o estado ou nível de metilação de pelo menos um dinucleotídeo CpG do gene NDRG4 na amostra.

50. Método de acordo com a reivindicação 47, caracterizado pelo fato de que compreende o uso de

um iniciador direto compreendendo a SEQ ID NO.: 9, um iniciador reverso compreendendo a SEQ ID NO.: 10, e uma sonda compreendendo a SEQ ID NO.: 11, para detectar o estado ou nível de metilação de pelo menos um dinucleotídeo CpG do gene BMP3 na amostra, e

um iniciador direto compreendendo a SEQ ID NO.: 12, um iniciador reverso compreendendo a SEQ ID NO.: 13, e uma sonda compreendendo a SEQ ID NO.: 14, para detectar o estado ou nível de

metilação de pelo menos um dinucleotídeo CpG do gene NDRG4 na amostra.

51. Método de acordo com a reivindicação 47, caracterizado pelo fato de que compreende o uso de

um iniciador direto compreendendo a SEQ ID NO.: 15, um iniciador reverso compreendendo a SEQ ID NO.: 16, e uma sonda compreendendo a SEQ ID NO.: 17, para detectar o estado ou nível de metilação de pelo menos um dinucleotídeo CpG do gene BMP3 na amostra, e

um iniciador direto compreendendo a SEQ ID NO.: 18, um iniciador reverso compreendendo a SEQ ID NO.: 19, e uma sonda compreendendo a SEQ ID NO.: 20, para detectar o estado ou nível de metilação de pelo menos um dinucleotídeo CpG do gene NDRG4 na amostra.

52. Método de acordo com qualquer uma das reivindicações 47 a 51, caracterizado pelo fato de que tanto a primeira sonda quanto a segunda sonda compreendem um doador fluorescente e um fluoróforo aceptor.

53. Método de acordo com qualquer uma das reivindicações 47 a 52, caracterizado pelo fato de que a primeira sonda e a segunda sonda são sondas TAQMAN®.

54. Método de acordo com qualquer uma das reivindicações 47 a 53, caracterizado pelo fato de que o gene KRAS mutante compreendendo pelo menos uma mutação em KRAS selecionada do grupo que consiste em G12D, G12V, G12C, G13D, G12A, G12R, G12S, e G13C.

55. Método de acordo com qualquer uma das reivindicações 47 a 54, caracterizado pelo fato de que o exame imunológico de fezes compreende um anticorpo conjugado a ouro coloidal.

56. Método de acordo com qualquer uma das reivindicações 47 a 55, caracterizado pelo fato de que a etapa c) e a etapa d) compreendem o uso do gene B2M como um gene de referência.

57. Método de acordo com a reivindicação 54, caracterizado pelo fato de que o gene KRAS mutante é amplificado por um ou mais pares de iniciadores selecionados do grupo que consiste em:

um iniciador direto G12D-F compreendendo a SEQ ID NO.: 35, e um iniciador reverso Kras-R compreendendo a SEQ ID NO.: 42;

um iniciador direto G13D-F compreendendo a SEQ ID NO.: 36, e um iniciador reverso Kras-R compreendendo a SEQ ID NO.: 42;

um iniciador direto G12V-F compreendendo a SEQ ID NO.: 37, e um iniciador reverso Kras-R compreendendo a SEQ ID NO.: 42;

um iniciador direto G12C-F compreendendo a SEQ ID NO.: 38, e um iniciador reverso Kras-R compreendendo a SEQ ID NO.: 42;

um iniciador direto G12S-F compreendendo a SEQ ID NO.: 39, e um iniciador reverso Kras-R compreendendo a SEQ ID NO.: 42;

um iniciador direto G12A-F compreendendo a SEQ ID NO.: 40, e um iniciador reverso Kras-R compreendendo a SEQ ID NO.: 42;

e

um iniciador direto G12R-F compreendendo a SEQ ID NO.: 41, e um iniciador reverso Kras-R compreendendo a SEQ ID NO.: 42,

e em que a sonda KRAS para a qPCR compreende a SEQ ID NO.: 46.

58. Método de acordo com a reivindicação 57, caracterizado pelo fato de que o gene ACTB é usado como um gene de referência na qPCR para amplificar o gene KRAS mutante.

59. Método de acordo com a reivindicação 58, caracterizado pelo fato de que os iniciadores de qPCR para amplificar

o gene ACTB compreendem as SEQ ID NOs.: 43 e 44, e a sonda de qPCR para o gene ACTB compreende a SEQ ID NO.: 46.

60. Método de acordo com qualquer uma das reivindicações 47 a 59, caracterizado pelo fato de que compreende o uso de

um padrão positivo e um padrão negativo para detectar metilação de BMP3 na amostra, e

um padrão positivo e um padrão negativo para detectar metilação de NDRG4 na amostra.

61. Método de acordo com a reivindicação 60, caracterizado pelo fato de que

o padrão positivo para detectar metilação de BMP3 compreende uma sequência de polinucleotídeos de

GTTAGTTTGGTCGGGTGTTTTTAAAATAAAGCGAGGA
GGGAAGGTATAGATAGATTTTGAAAATATTCGGGTTATATACGTCCG
GATTTATAGTTTTTTTTTAGCGTTGGAGTGGAGACGGCGTTCGTA
GCGTTTTGCGCGGGTGAGGTTTCGCGTAGTTGTTGGGGAAGAGTT
TATTTGTTAGGTTGCGTTGGGTTAGCGTAGTAAGTGGGGTTGGTC
GTTATTTTCGTTGTATTCGGTCGCGTTTTCGGGTTTTCGTGCGTTTTTCG
TTTTAG (SEQ ID NO: 67);

o padrão negativo para detectar metilação de BMP3 compreende uma sequência de polinucleotídeos de

GTTAGTTTGGTTGGGTGTTTTTAAAATAAAGTGAGGAG
GGAAGGTATAGATAGATTTTGAAAATATTTGGGTTATATATGTTGT
GATTTATAGTTTTTTTTTAGTGTTGGAGTGGAGATGGTGTTTGTAG
TGTTTTGTGTGGGTGAGGTTTGTGTAGTTGTTGGGGAAGAGTTTAT
TTGTTAGGTTGTGTTGGGTTAGTGTAAGTGGGGTTGGTTGTTA
TTTTGTTGTATTTGGTTGTGTTTTGGGTTTTGTGTGTTTTTGTTTTA
G (SEQ ID NO: 68);

o padrão positivo para detectar metilação de NDRG4

compreende uma sequência de polinucleotídeos de

TGAGAAGTCGGCGGGGGCGCGGATCGATCGGGGTGT
TTTTAGGTTTCGCGTCGCGGTTTTCGTTTCGTTTTTCGTTTCGTTTA
TCGGGTATTTTAGTCGCGTAGAAGGCGGAAGTTACGCGCGAGGG
ATCGCGGTTTCGTTTCGGGATTAGTTTTAGGTTTCGGTATCGTTTCGC
GGGTCGAGCGTTTATATTCGTTAAATTTACGCGGGTACGTTTTTCGC
GGCGTATCGTTTTTAGTT (SEQ ID NO.: 69); e

o padrão negativo para detectar metilação de NDRG4
compreende uma sequência de polinucleotídeos de

TGAGAAGTTGGTGGGGGTGTGGATTGATTGGGGTGTTT
TTTAGGTTTTGTGTTGTGGTTTTTGTGTTTTTTTTGTTTGTTTATTG
GGTATTTTAGTTGTGTAGAAGGTGGAAGTTATGTGTGAGGGATTG
TGGTTTGTTTGGGATTAGTTTTAGGTTTGGTATTGTTTTGTGGGTT
GAGTGTTTATATTTGTTAAATTTATGTGGGTATGTTTTTGTGGTGTA
TTGTTTTTAGTT (SEQ ID NO.: 70).

62. Método de acordo com qualquer uma das reivindicações 47 a 61, caracterizado pelo fato de que compreende amplificar um padrão de controle de qualidade na etapa c) e na etapa d).

63. Método para o diagnóstico e o tratamento de um câncer colorretal (CRC) e/ou adenoma avançado (AA) em um paciente com necessidade do mesmo, caracterizado pelo fato de que compreende determinar a presença ou ausência de CRC e/ou de AA no paciente através do uso de um kit como definido em qualquer uma das reivindicações 1 a 21, e o tratamento do paciente depender da presença ou ausência de CRC e/ou AA no paciente.

64. Método para o diagnóstico e o tratamento de um câncer colorretal (CRC) e/ou adenoma avançado (AA) em um paciente com necessidade do mesmo, caracterizado pelo fato de que compreende determinar a presença ou ausência de CRC e/ou de AA no paciente

através do uso de um método como definido em qualquer uma das reivindicações 22 a 62, e o tratamento do paciente depender da presença ou ausência de CRC e/ou AA no paciente.

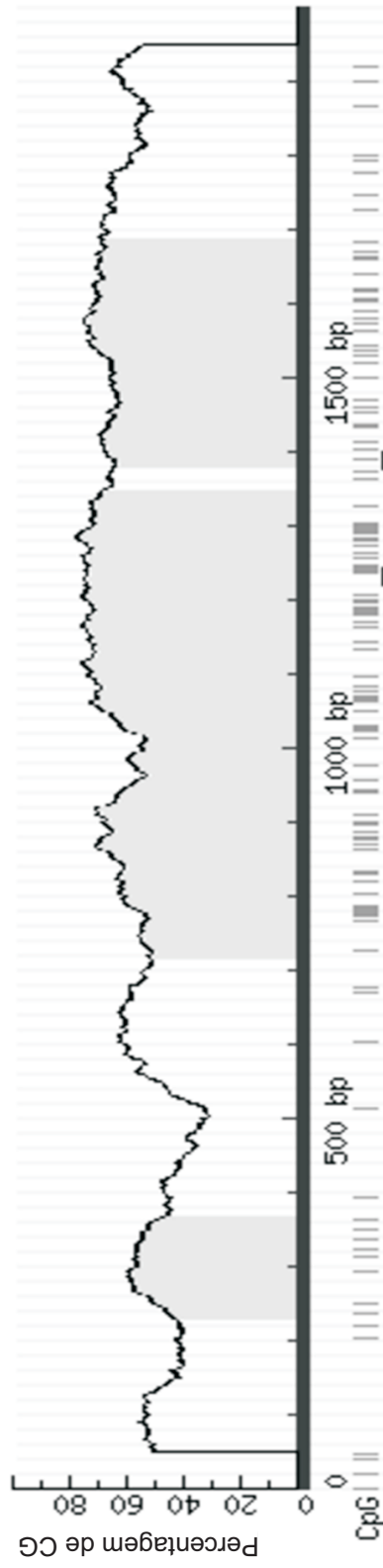


FIG. 1A

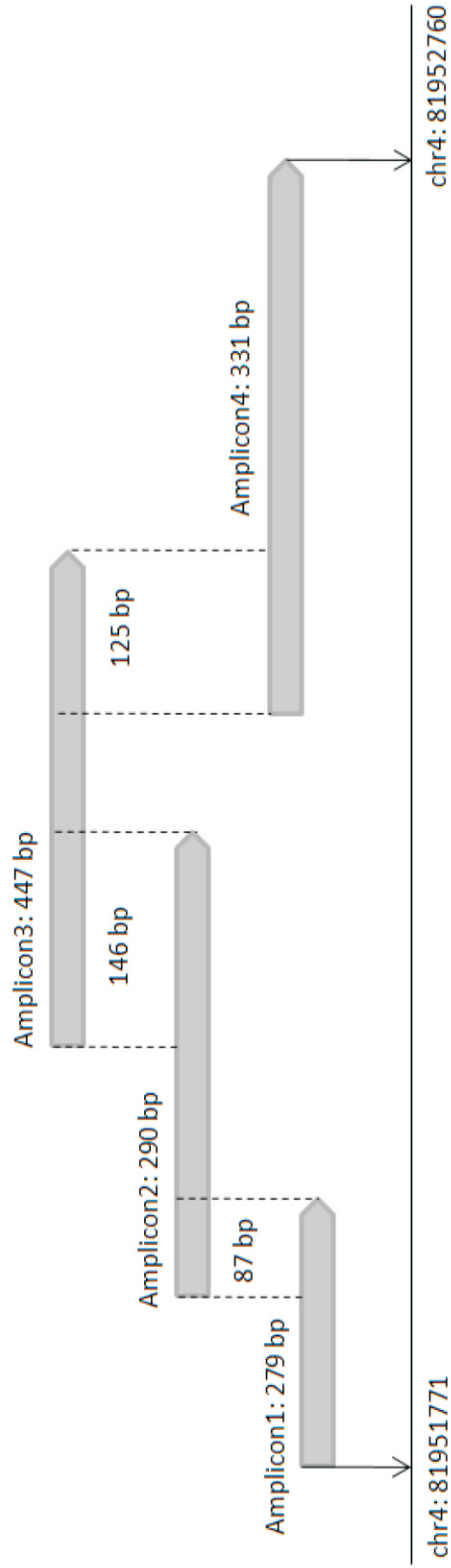


FIG. 1B

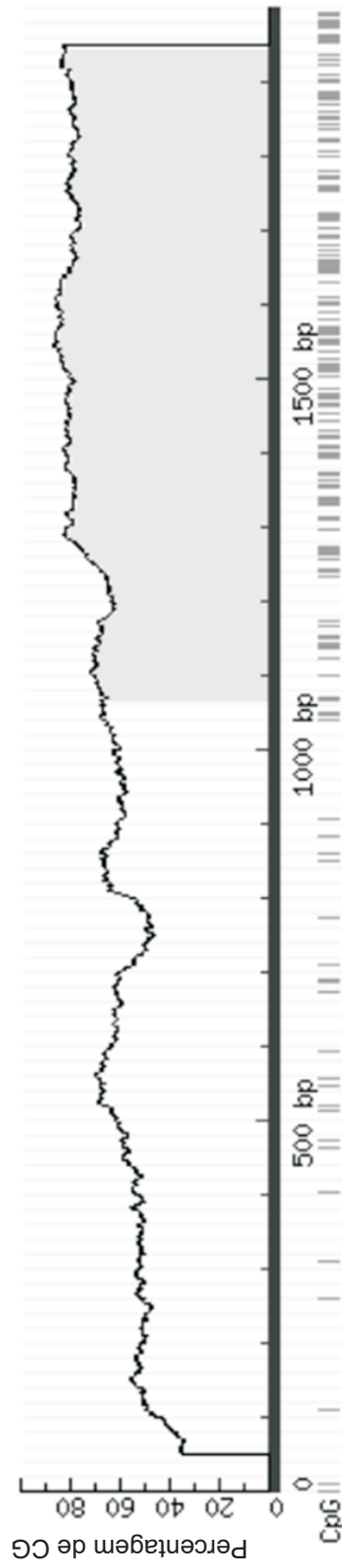


FIG. 1C

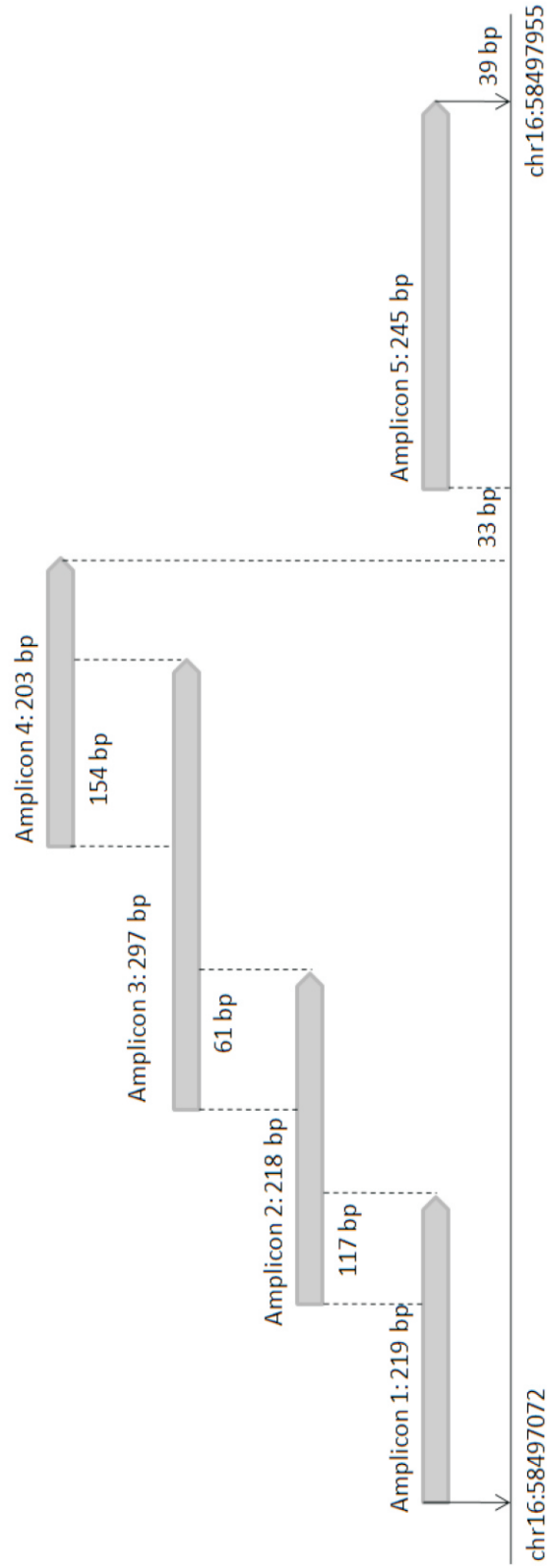


FIG. 1D

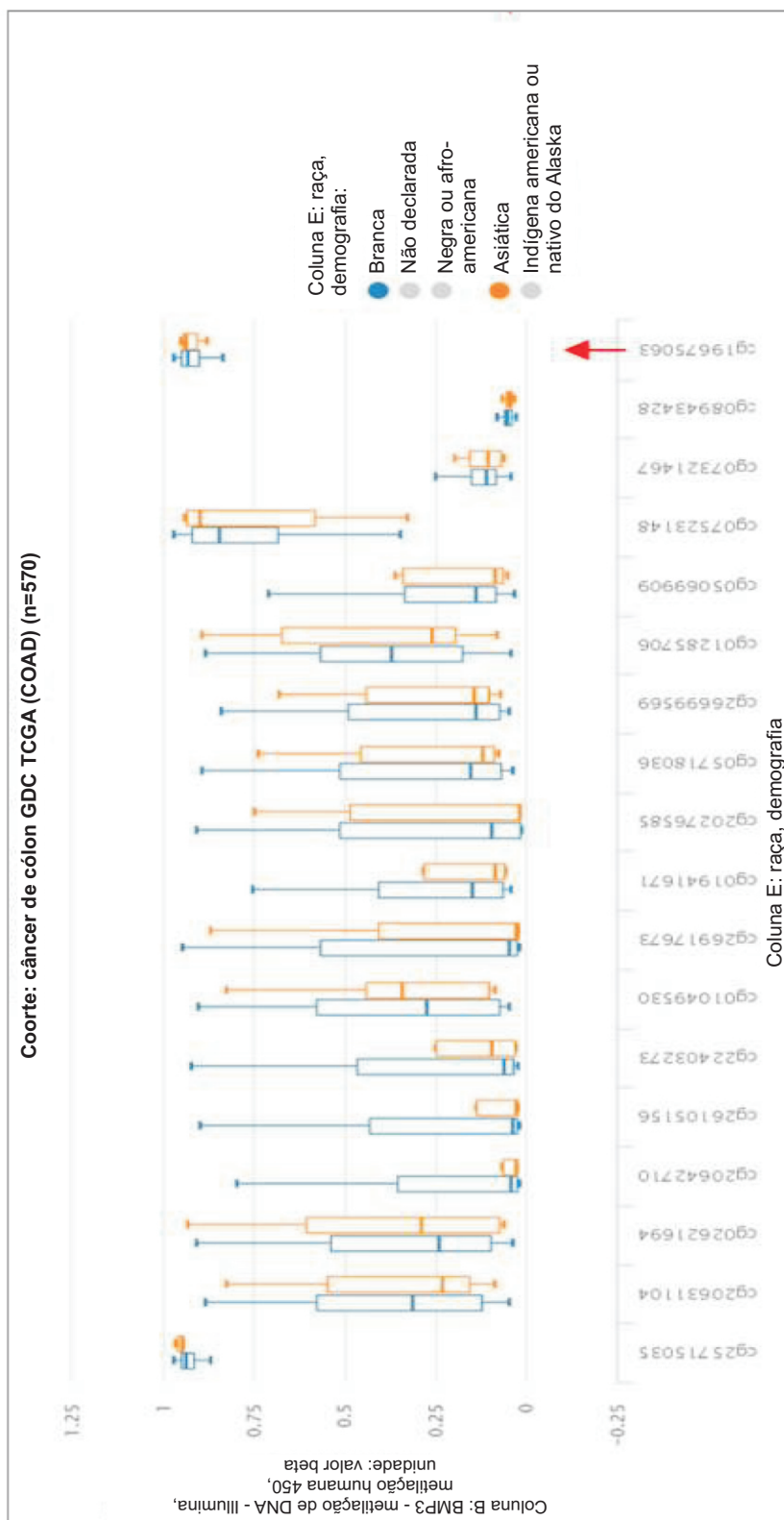


FIG. 2A. Diferença nos sítios CpG de metilação do gene BMP3 na população branca e na população asiática

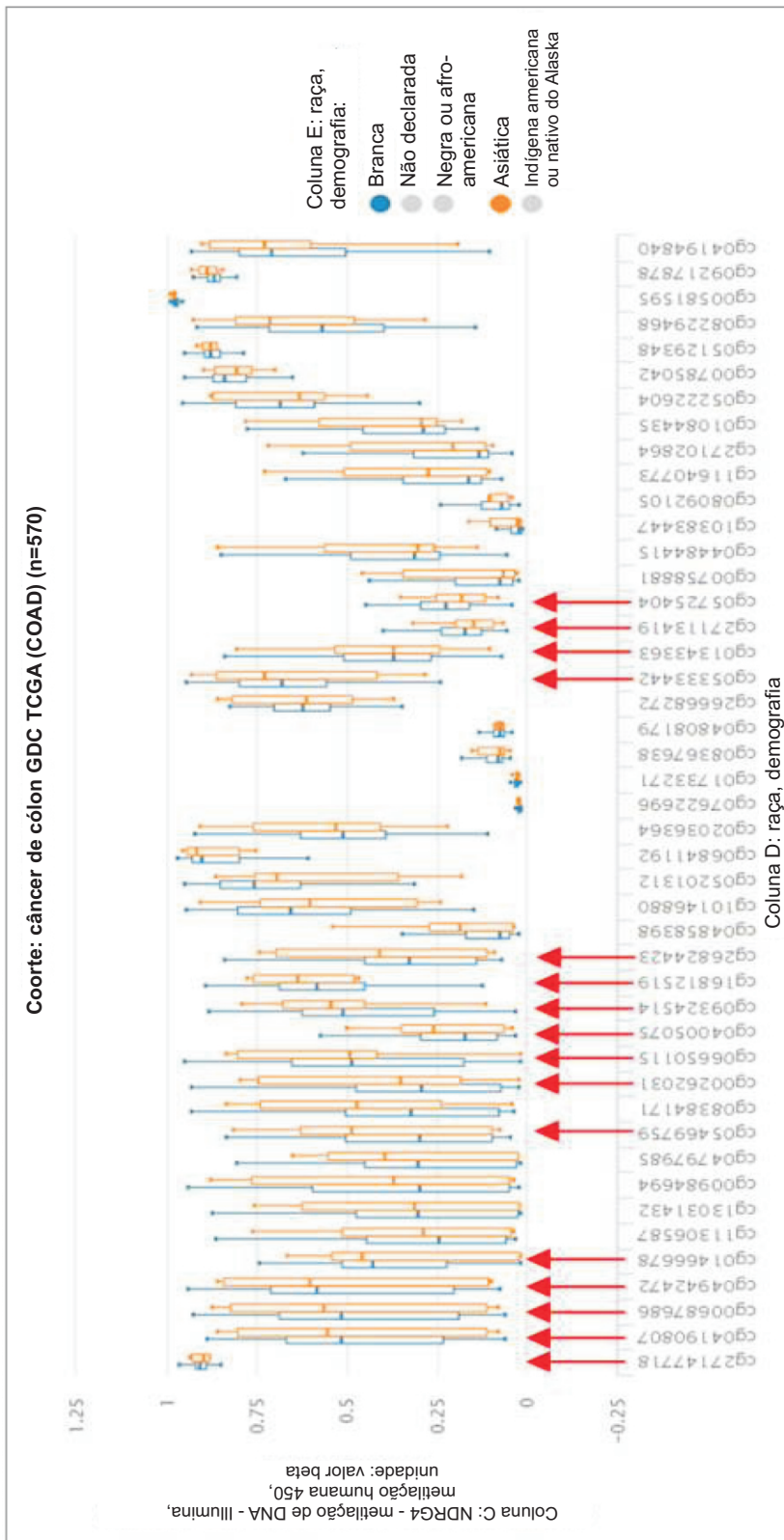


FIG. 2B. Diferença nos sítios CpG de metilação do gene NDRG4 na população branca e na população asiática

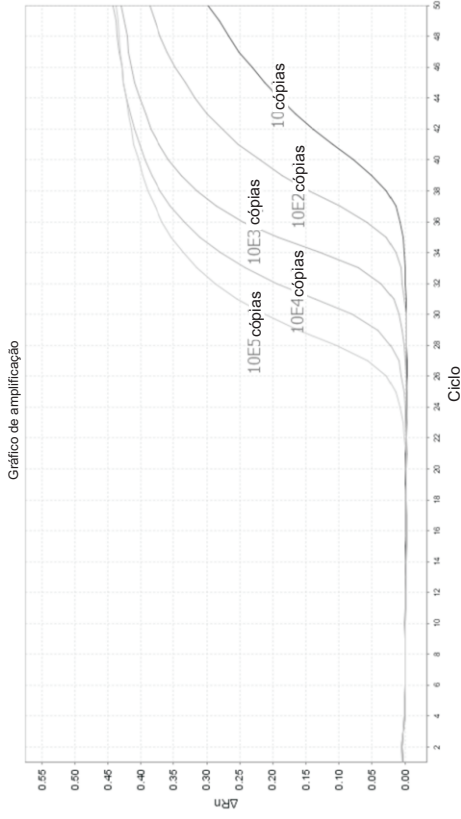


FIG. 3B

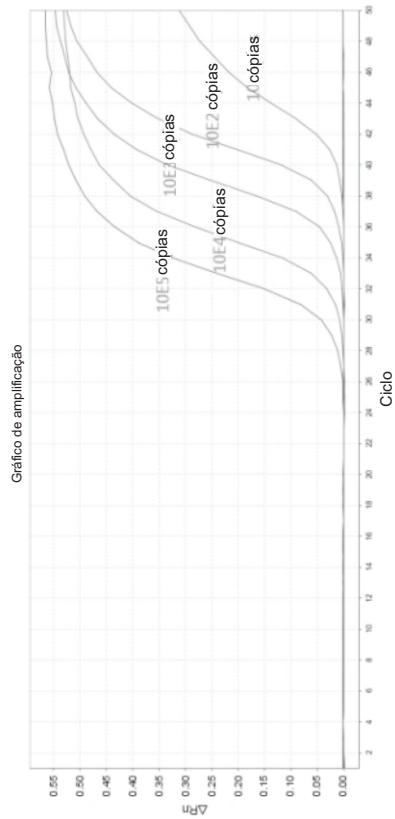


FIG. 3D

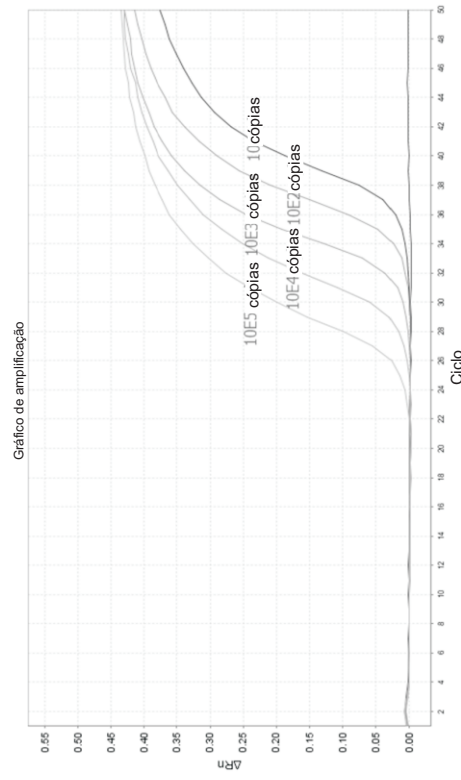


FIG. 3A

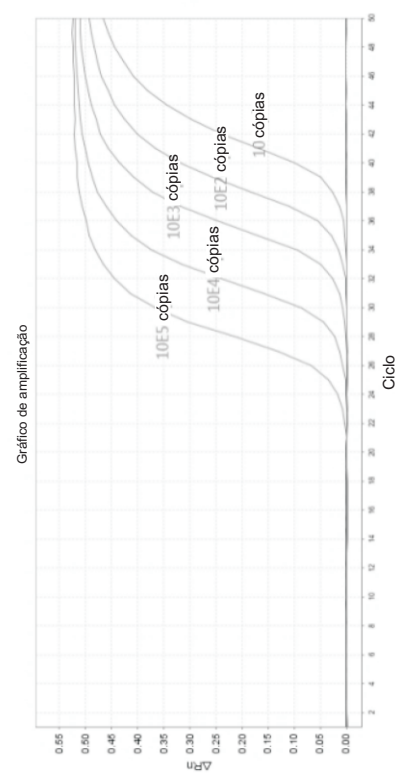


FIG. 3C

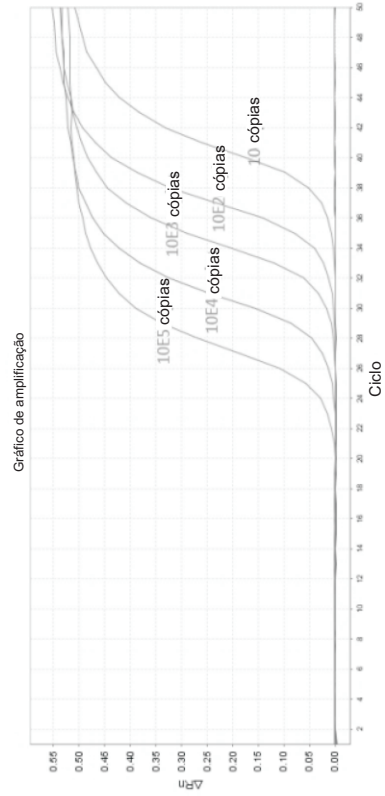
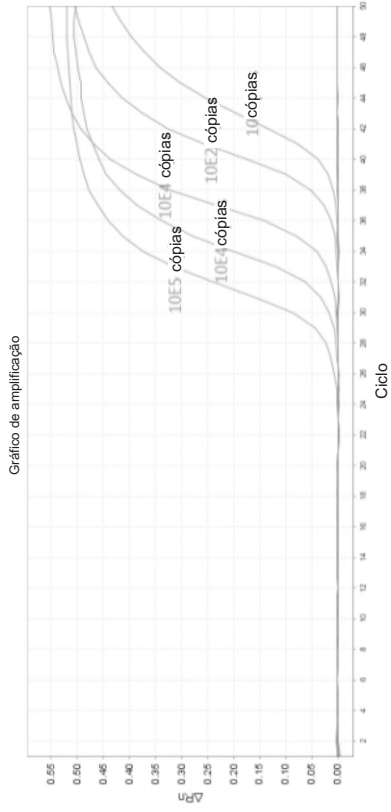


FIG. 3E

FIG. 3F

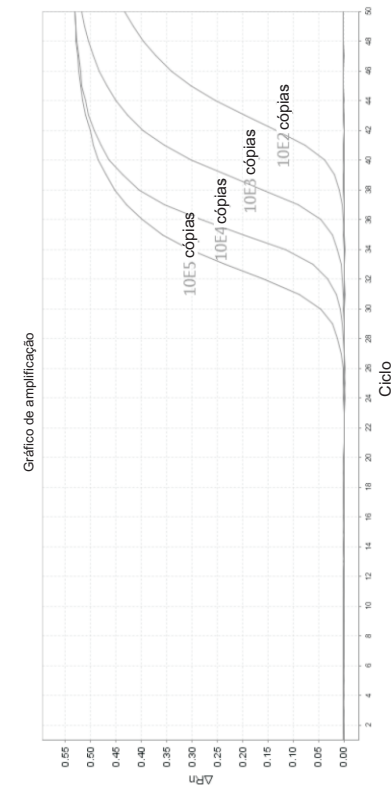
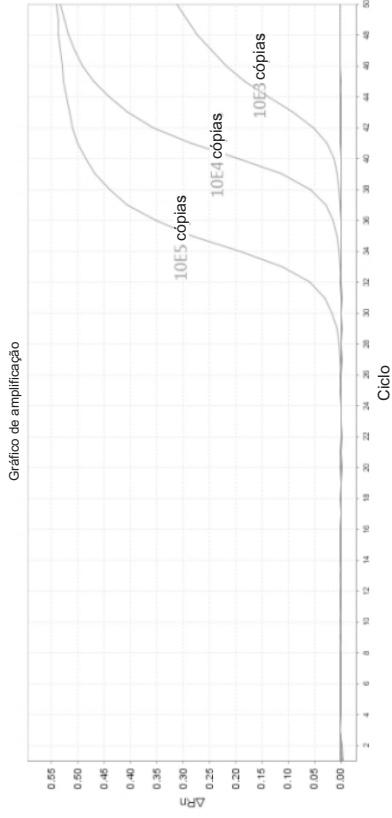


FIG. 3G

FIG. 3H

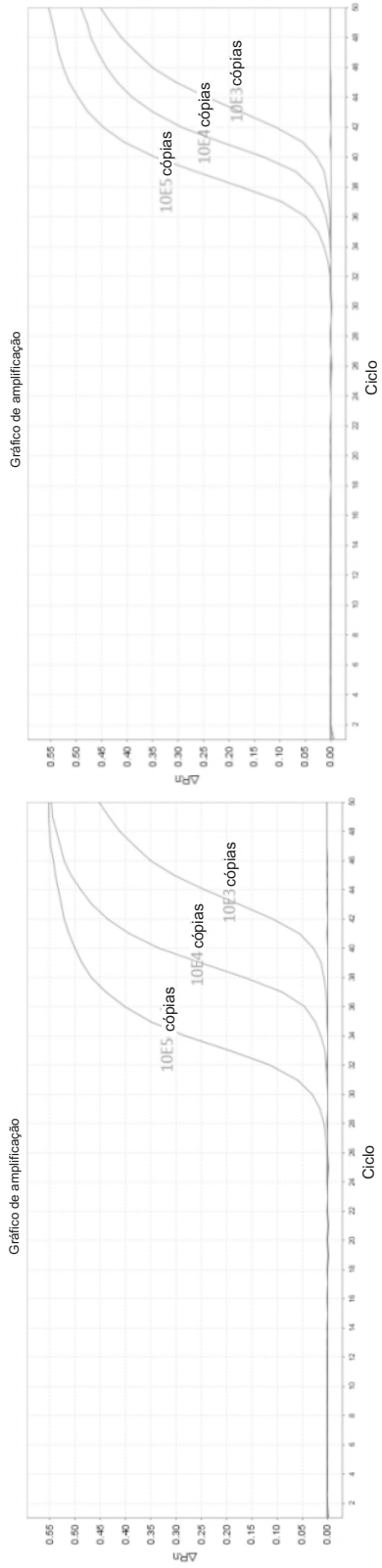


FIG. 3I

FIG. 3J

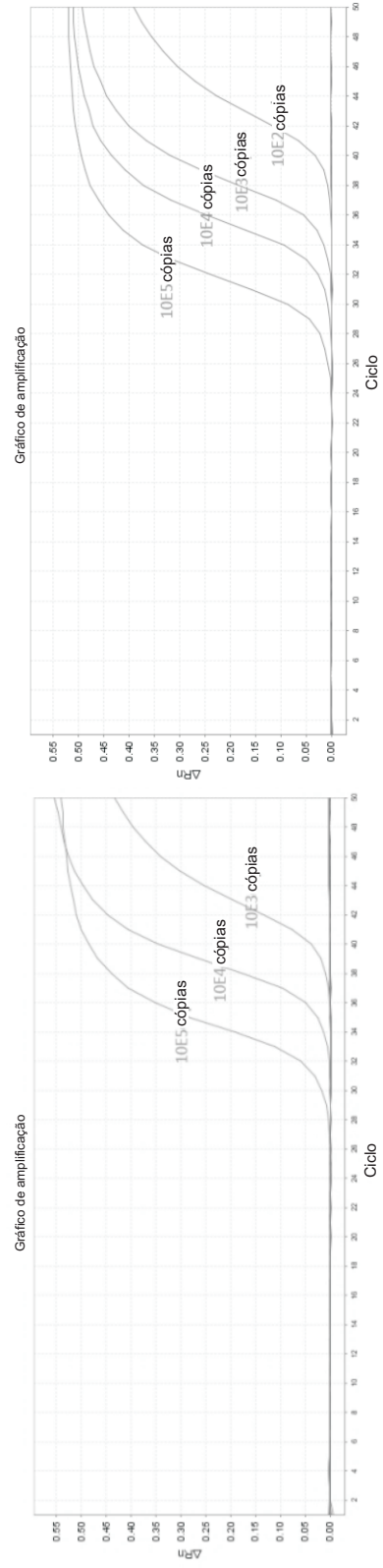


FIG. 3K

FIG. 3L

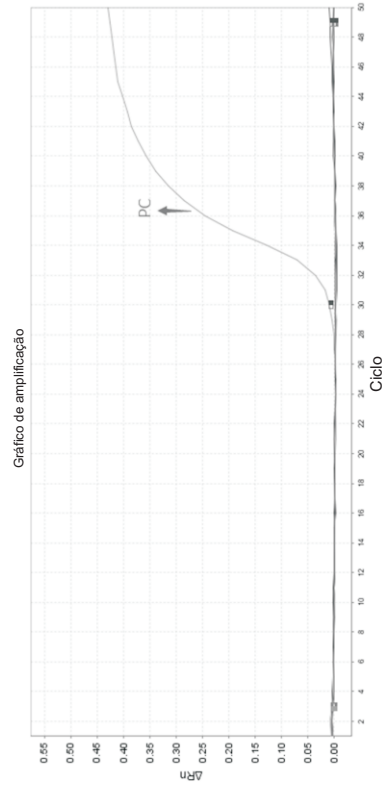


FIG. 4B

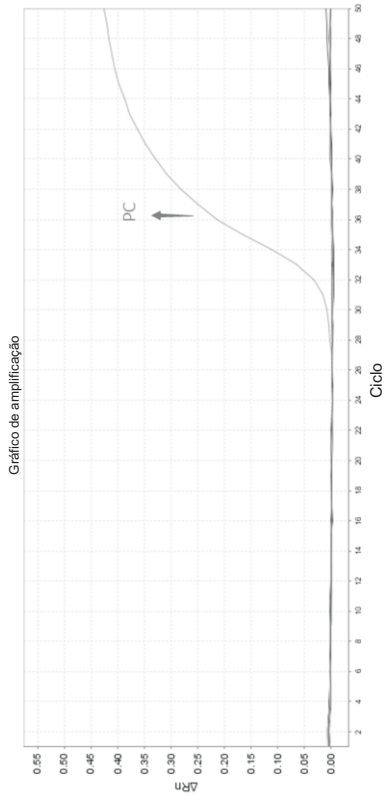


FIG. 4A

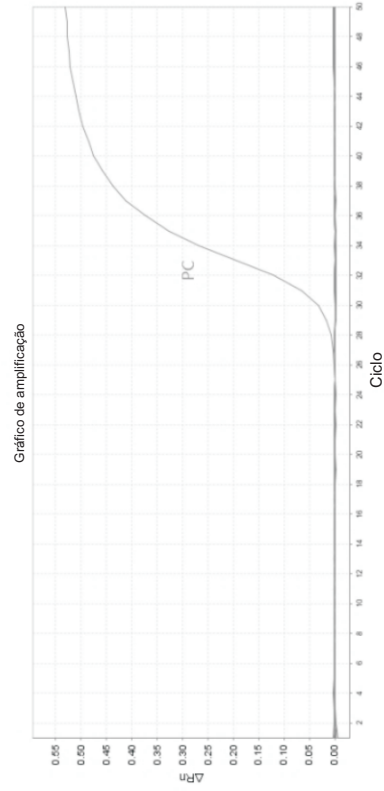


FIG. 4D

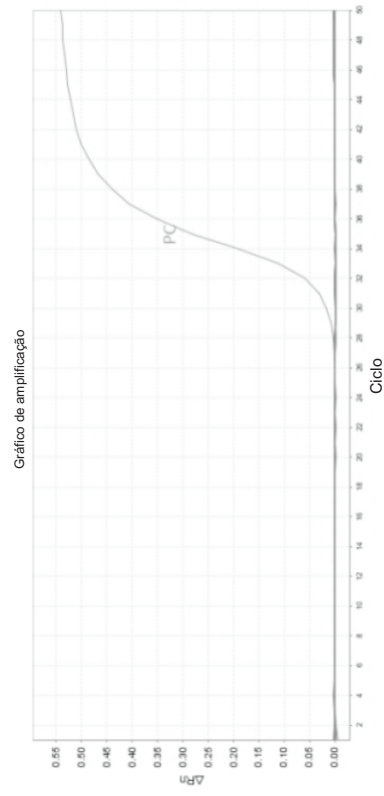


FIG. 4C

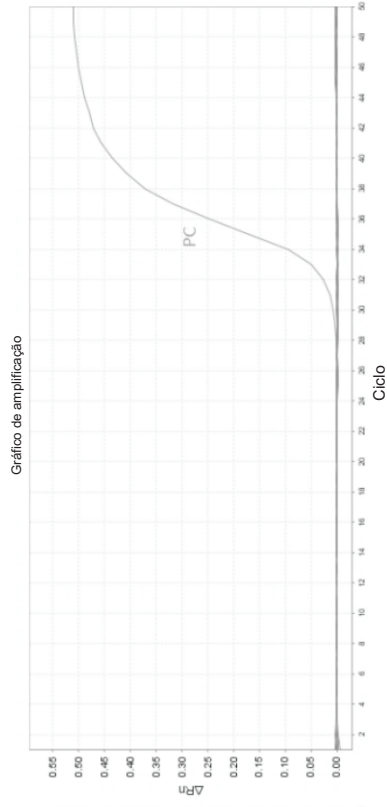


FIG. 4F

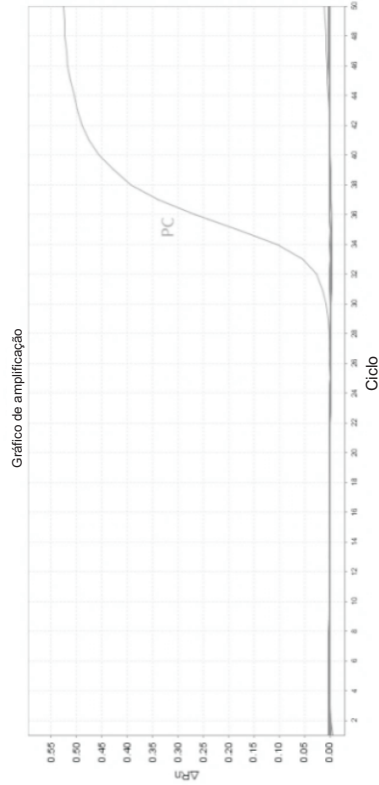


FIG. 4E

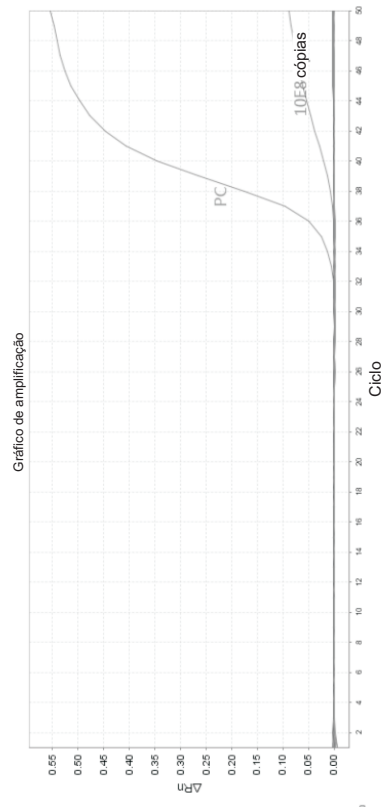


FIG. 4H

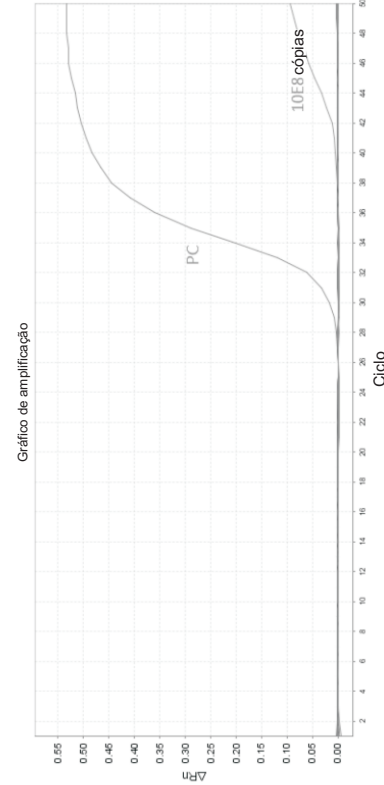


FIG. 4G

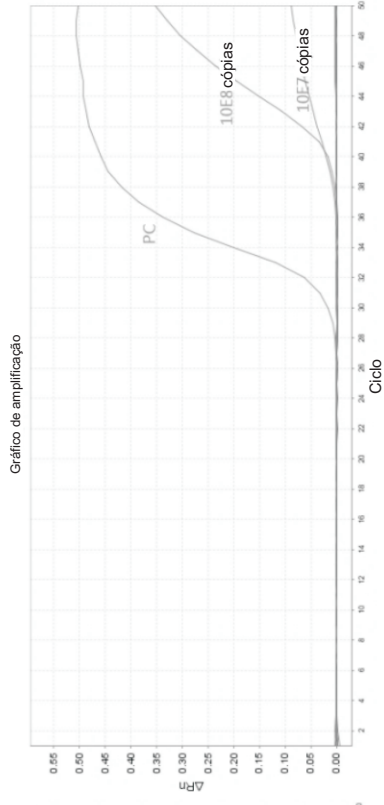


FIG. 4I

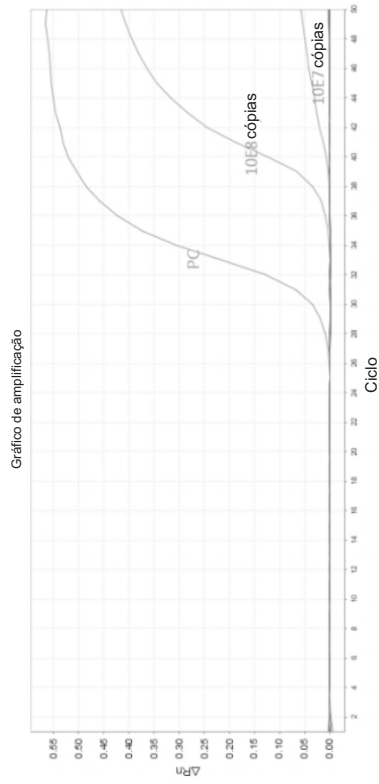


FIG. 4J

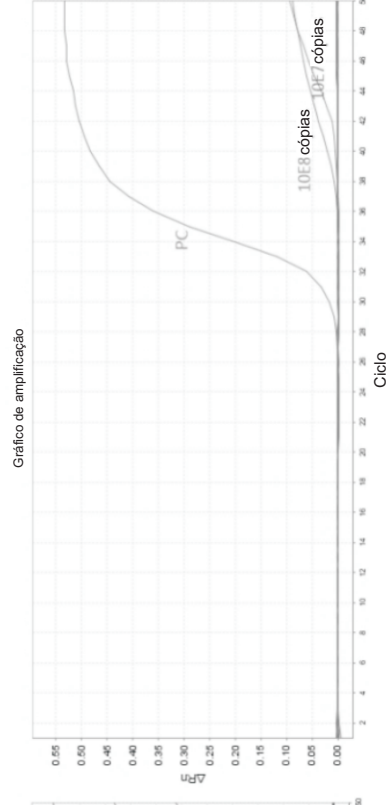


FIG. 4K

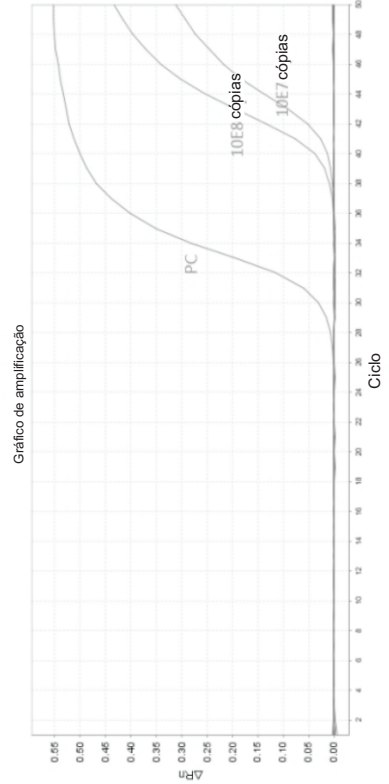


FIG. 4L

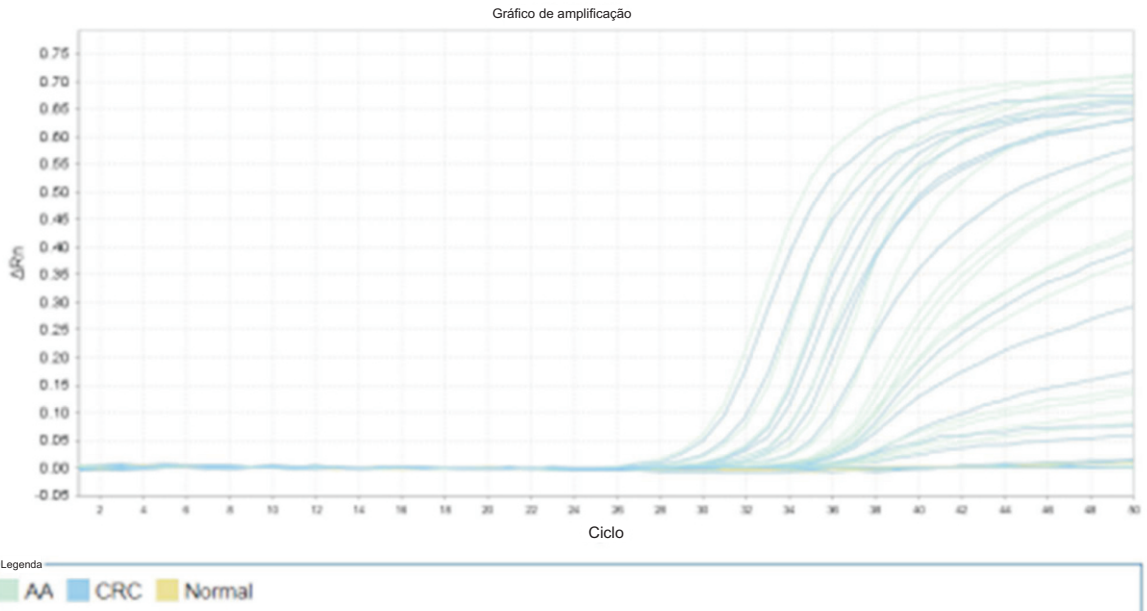


FIG. 5A

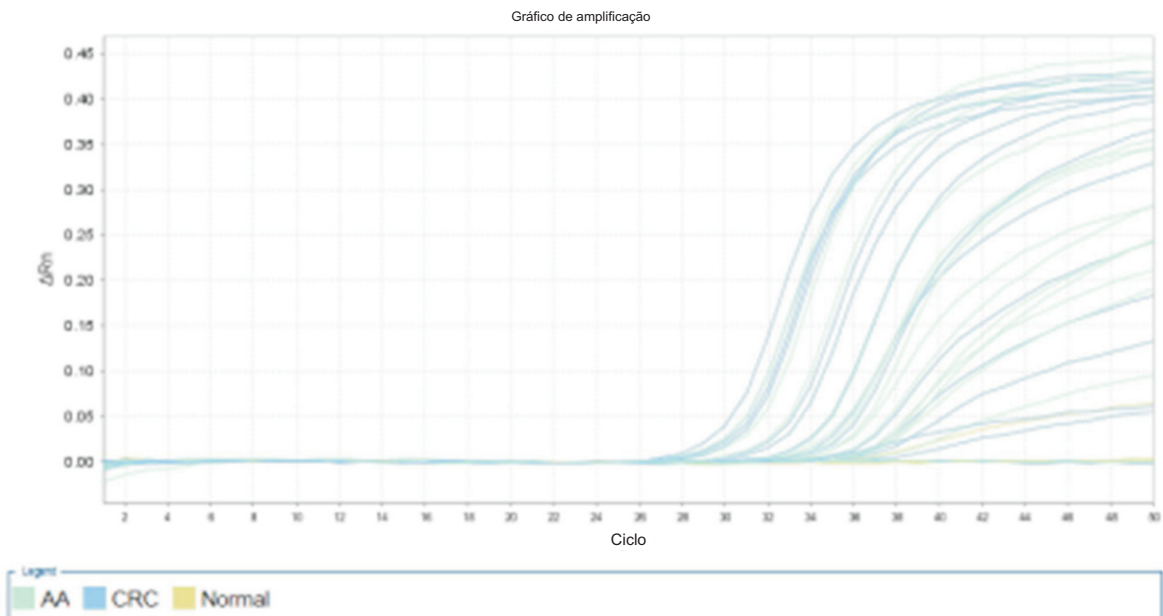


FIG. 5B

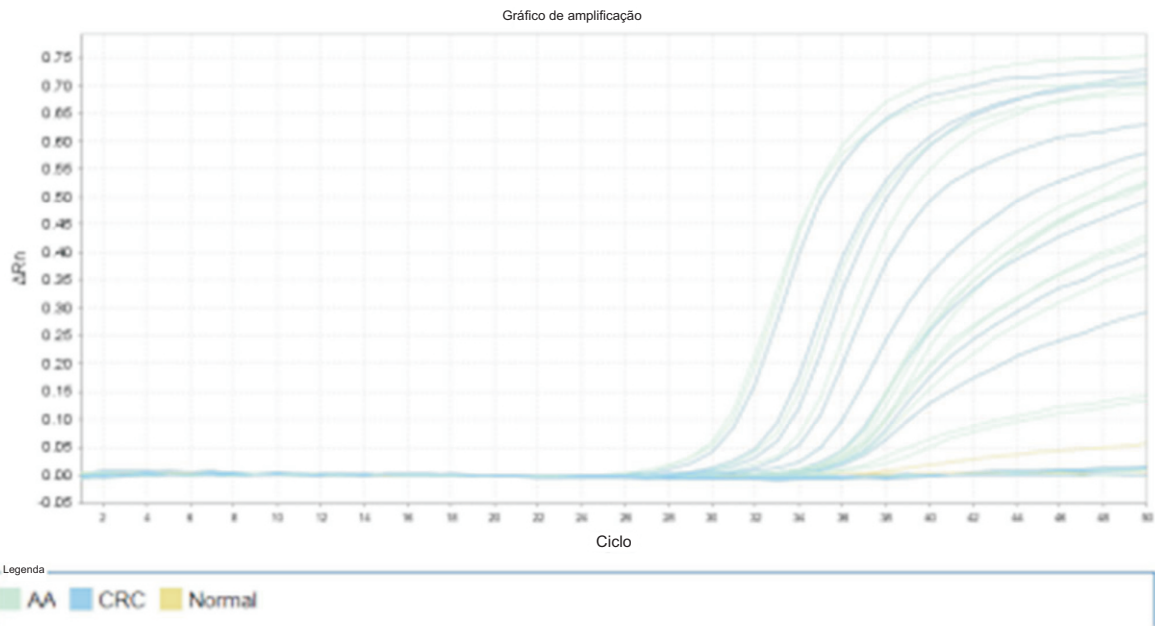


FIG. 5C

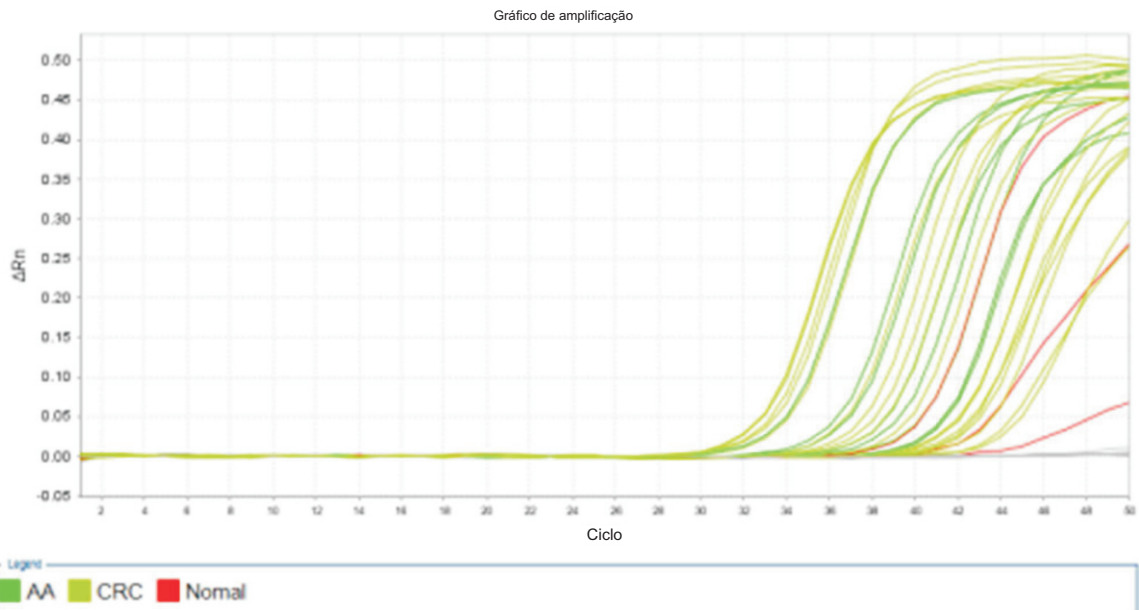


FIG. 5D

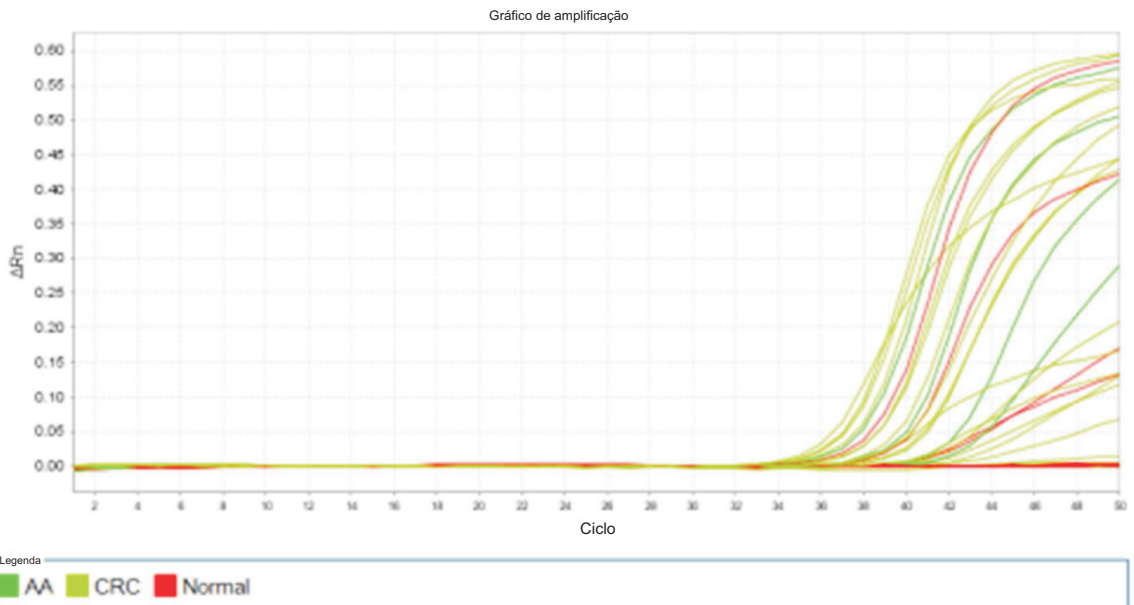


FIG. 5E

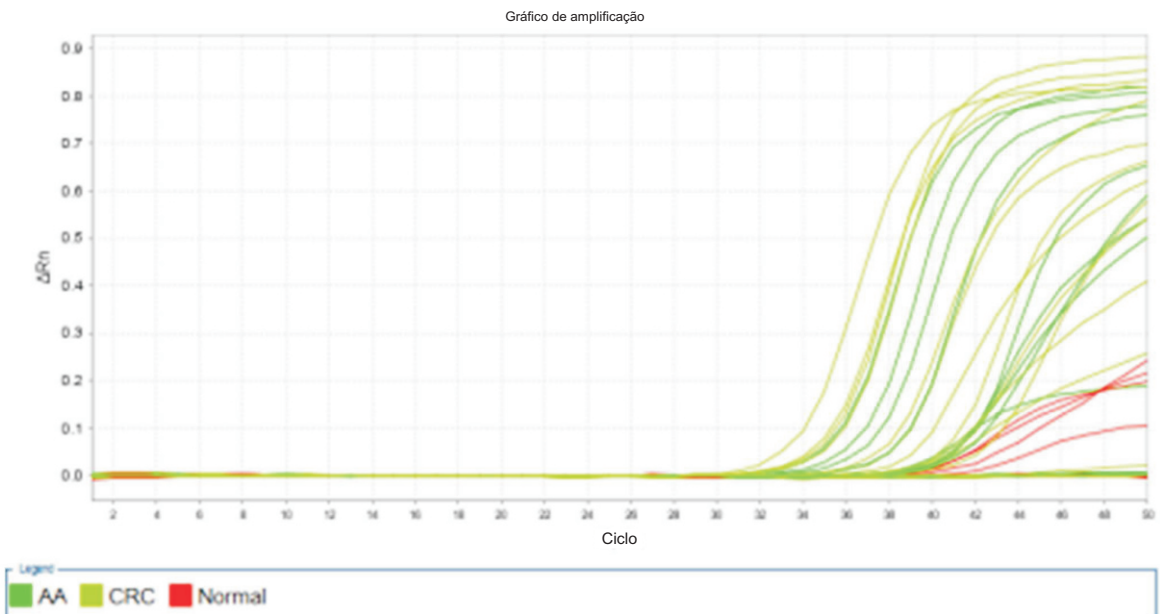


FIG. 5F

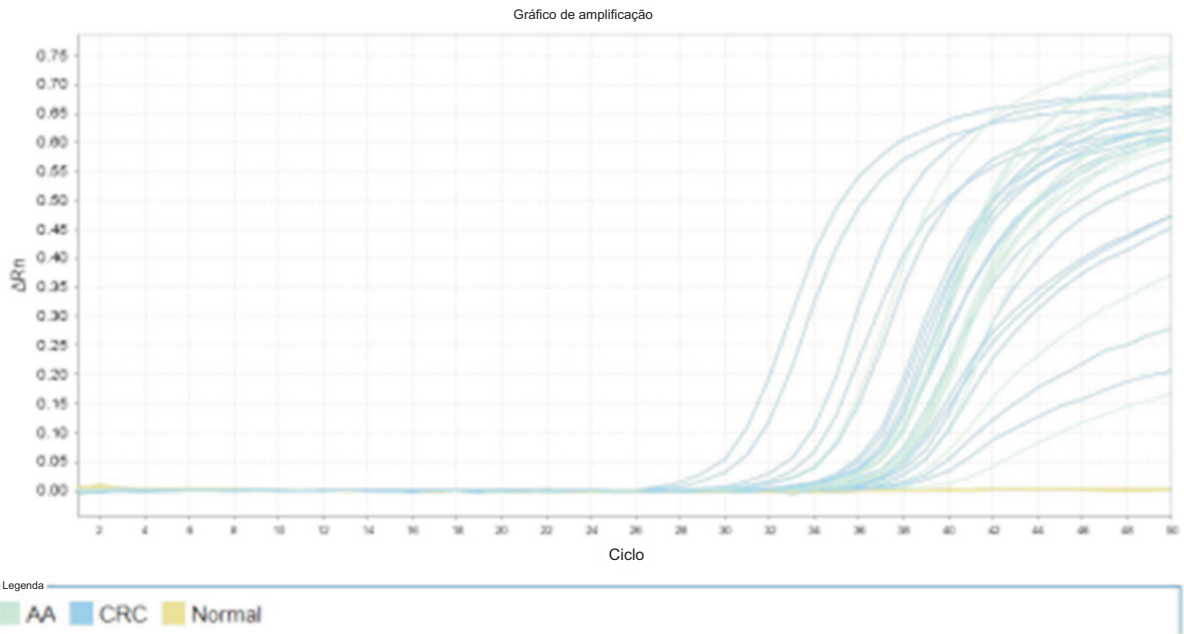


FIG. 6A

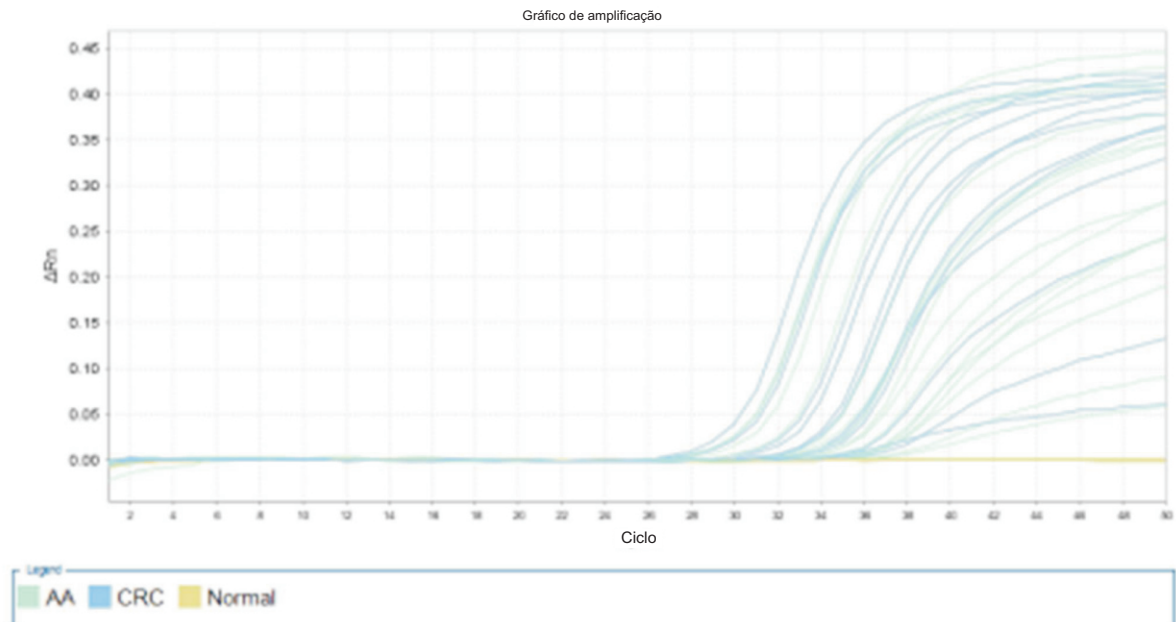


FIG. 6B

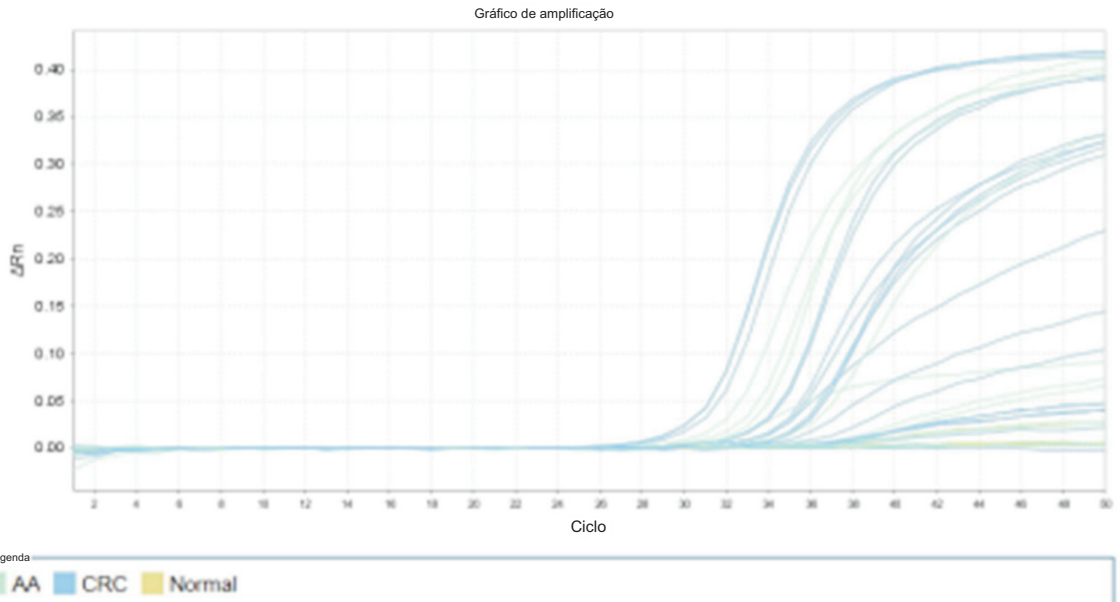


FIG. 6C

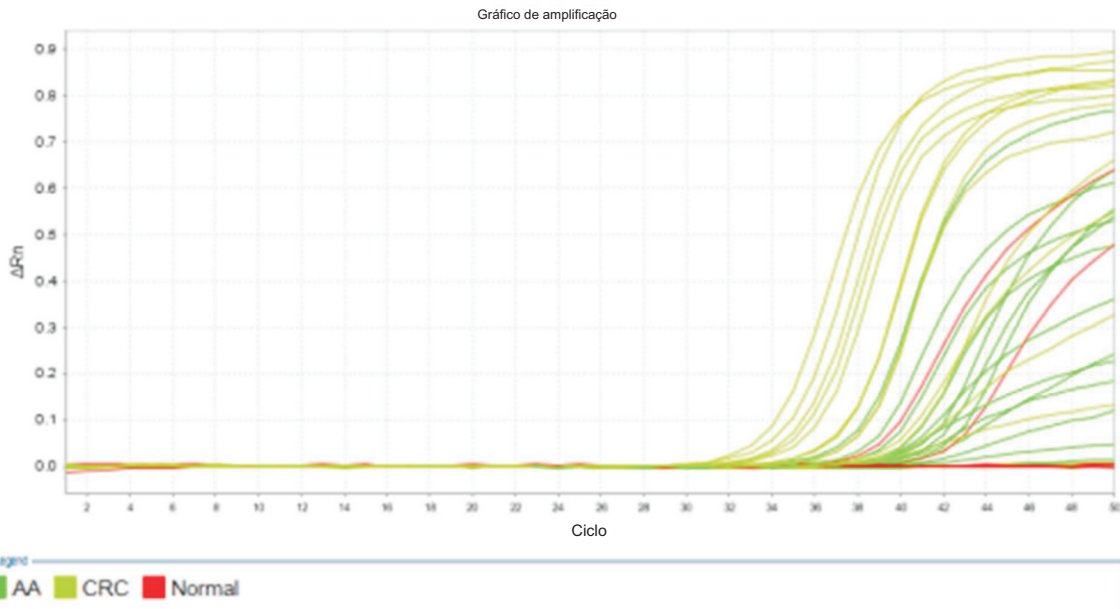


FIG. 6D

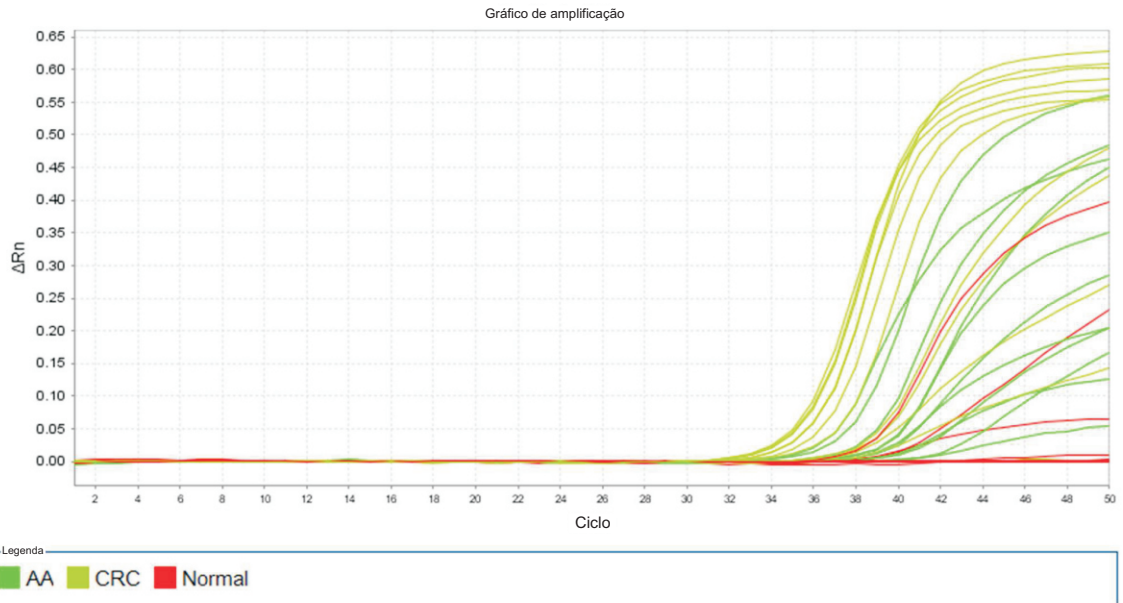


FIG. 6E

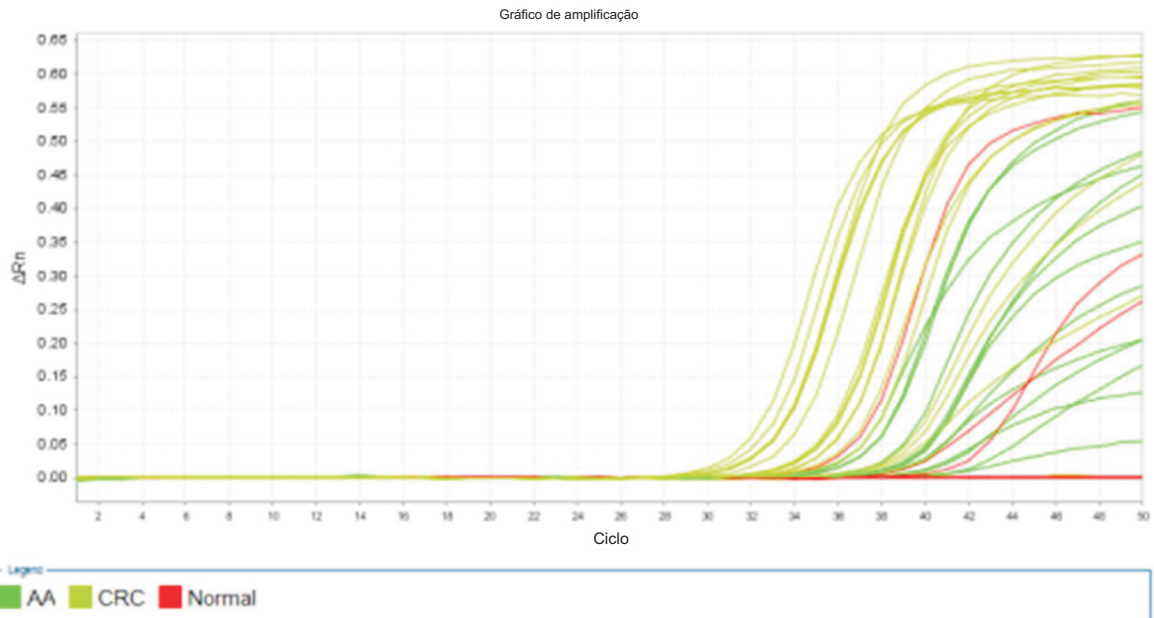


FIG. 6F

RESUMO

Patente de Invenção: **“KIT PARA RASTREAMENTO DE CÂNCER COLORRETAL E ADENOMA AVANÇADO E SUA APLICAÇÃO”**.

A presente invenção refere-se a combinações de iniciadores e sondas para a realização de PCRs quantitativas que podem ser usadas para determinar o estado e nível de metilação do gene BMP3 e de genes NDRG4 em um paciente com necessidade do mesmo, que resulta em especificidade diagnóstica surpreendentemente alta e sensibilidade para diagnosticar a presença ou a ausência de câncer colorretal (CRC) e/ou adenoma avançado (AA) em um paciente com necessidade do mesmo. A invenção apresenta composições e métodos para a realização do diagnóstico.

Este anexo apresenta o código de controle da listagem de sequências biológicas.

Código de Controle

Campo 1



Campo 2



Outras Informações:

- Nome do Arquivo: LISTAGEM DE SEQUENCIA - P249550.TXT
- Data de Geração do Código: 13/11/2020
- Hora de Geração do Código: 18:00:12
- Código de Controle:
 - Campo 1: D84BC850FD145700
 - Campo 2: E22B7618BEC2668A