

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

(19) Organización Mundial de la Propiedad Intelectual
Oficina internacional



WIPO | PCT



(10) Número de publicación internacional
WO 2019/013613 A2

(43) Fecha de publicación internacional
17 de enero de 2019 (17.01.2019)

(51) Clasificación internacional de patentes:
Sin clasificar

15, Of. 1502, Col. San José Insurgentes, Ciudad De México, 03900 (MX).

(21) Número de la solicitud internacional:
PCT/MX2018/000084

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

(22) Fecha de presentación internacional:
03 de septiembre de 2018 (03.09.2018)

(25) Idioma de presentación: español

(26) Idioma de publicación: español

(30) Datos relativos a la prioridad:
62/530,245 09 de julio de 2017 (09.07.2017) US
1042665 30 de noviembre de 2017 (30.11.2017) NL
MX/a/2018/008471
09 de julio de 2018 (09.07.2018) MX

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

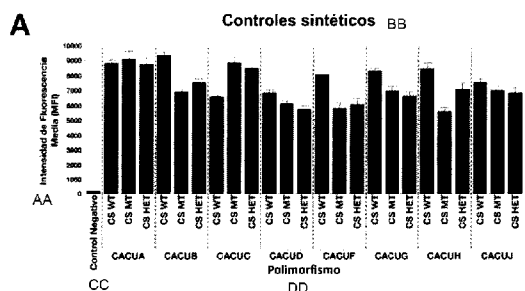
(71) Solicitante: HAKKEN ENTERPRISE SA DE CV [MX/MX]; Río Conchos 216, Col. Vista Hermosa, Cuernavaca, Morelos, 62290 (MX).

(72) Inventores: AGUIRRE GIL, Martha Gisela; Aurelio Manrique No. 19, Col. Presidentes Ejidales, Ciudad De México, 04770 (MX). MEDA MONZÓN, Elizabeth; Niños Héroes No. 30B, Col. Río Balsas, Cuernavaca, Morelos, 62215 (MX). DELGADO PASTELIN, Lucero; Puente Colorado No. 1, Morelos, 62766 (MX).

(74) Mandatario: MÁRQUEZ PONCE, Claudia Elizabeth; Clarke, Modet & C°, Av. Insurgentes Sur No. 1647, Piso

(54) Title: METHODS AND KITS FOR DETERMINING A RISK OF CANCER

(54) Título: MÉTODOS Y KITS PARA DETERMINAR EL RIESGO DE CÁNCER



AA Median fluorescence intensity (MFI)
BB Synthetic controls
CC Negative control
DD Polymorphism

(57) Abstract: The invention relates to methods and devices for determining susceptibility to cancer or for diagnosing cancer in a subject by means of the simultaneous identification and detection of genotypes of HPV strains and genetic markers for cancer susceptibility in a sample from a subject.

(57) Resumen: Se divulgan métodos y equipos para determinar la susceptibilidad del cáncer o diagnosticar un cáncer en un sujeto al realizar una identificación y detección simultáneas de genotipos de cepas del VPH y marcadores genéticos para la susceptibilidad al cáncer en una muestra de un sujeto.

[Continúa en la página siguiente]



WO 2019/013613 A2

Publicada:

- *sin informe de búsqueda internacional, será publicada nuevamente cuando se reciba dicho informe (Regla 48.2(g))*
- *con información relativa a una petición de restablecimiento del derecho de prioridad sobre una o más reivindicaciones de prioridad (Reglas 26bis.3 y 48.2(b)(vii))*
- *con la parte de lista de secuencias de la descripción (Regla 5.2(a))*

MÉTODOS Y KITS PARA DETERMINAR EL RIESGO DE CÁNCER**REFERENCIA CRUZADA A SOLICITUDES RELACIONADAS**

5 Esta solicitud reclama el beneficio de prioridad bajo 35
U.S.C. §119(e) de la solicitud Provisional de los Países
Bajos No. 1042665, presentada el 10 de Enero de 2018, y
también al No. de Serie de E.U.A. 62/530,245, presentada el
9 de Julio de 2017. La descripción de la solicitud anterior
10 se considera parte de y se incorpora a manera de referencia
en la descripción de esta solicitud en su totalidad.

15

20

25

30

CAMPO DE LA INVENCION

La presente invención se refiere a la determinación de la susceptibilidad al cáncer y, de manera más particular, a la
5 detección simultánea e identificación de genotipos de la cepa VPH y marcadores genéticos para susceptibilidad al cáncer.

10

15

20

25

30

ANTECEDENTES DE LA INVENCION

El cáncer es una de las causas principales de morbilidad y mortalidad en el mundo representando 14 millones de nuevos casos y 8.2 millones de muertes en el 2012. De estos, la próstata y cervical son entre las causas más comunes de muertes relacionadas con cáncer.

La etiología de un tipo particular de cáncer se asocia probablemente con un conjunto de variantes genéticas, muchas de las cuales interactúan con factores ambientales. Los estudios epidemiológicos respaldados por evidencia considerable habían mostrado la función de los polimorfismos de nucleótidos individuales (SNP's) como un componente hereditario en diferentes tipos de cáncer.

La infección con virus de papiloma humano (VPHs) es un factor de riesgo primario en el desarrollo de numerosos cánceres. Como tal, los VPHs son responsables por el desarrollo de casi todos los cánceres cervicales. Además, los VPHs también se han implicado en el desarrollo de cánceres de próstata.

Además del VPH, otros factores de riesgo se pueden implicar en el desarrollo de cánceres cervicales y de próstata. Por ejemplo, las mutaciones pueden desempeñar la función en 5 a 10% de todos los desarrollos de cáncer. De esta manera, las mutaciones en los tejidos cervicales y de próstata también pueden constituir factores de riesgo para el cáncer.

Varios métodos bien conocidos en la técnica se pueden usar para aislar ácido nucleico y para detectar mutaciones en la secuencia de ADN. Por ejemplo, Ravinder (WO2004079011) proporciona métodos para aislar ácidos nucleicos libres a través de la adición de formalina más la amplificación del sitio de interés, hibridación, lavado,

tinción y disposición GeneCHIP^{MR} de escaneo para la detección de trastornos genéticos asociados con anomalías cromosómicas mediante el muestreo no invasivo. Bajo un procedimiento complejo que implica la
5 amplificación de fago Q-beta, la amplificación de desplazamiento de hebra, y la reacción en cadena de la polimerasa de extensión solapante de empalme, fragmentación de amplicones por digestión de exonucleasa y Tecnología BeadArray. Adicionalmente, se describe una PCR multiplex,
10 técnica de secuenciación para la detección de SNPs, y reclama la detección de secuencia de diferentes especies incluyendo humanas, aunque no hay genotipificación de VPH y/o cualquier otro microorganismo. Adicionalmente, no existe descripción de un método para detección de
15 propensión al cáncer sino un método de diagnóstico prenatal que comprende analizar una composición que comprende ADN fetal y ADN materno.

Otra patente basada en microdisposición describe un método para la detección de secuencias patogénicas y
20 genéticas hospedadas simultáneas (WO2009095840). No obstante, no se describe la genotipificación de los tipos virales de VPH específicos, tampoco los SNPs específicos para el cáncer cervical, cáncer de próstata u otros tipos específicos de cáncer. Además, el uso de microdisposiciones
25 es una tecnología consumidora de tiempo y costo.

Giffard y colaboradores (WO2007109854), describe métodos para los SNPs y genotipificación de célula o
células. Estos métodos son aplicables en ya sea células eucariotas (incluyendo células cancerosas) o células
30 procariotas (incluyendo varios tipos de bacterias). La única técnica reclamada en esta patente es la PCR en tiempo real, donde el análisis multiplex se limita al número de fluoróforos detectados por termocicladores comerciales. Además, la compatibilidad entre los cebadores o sondas

diseñadas para la PCR en tiempo real con diferentes plataformas (tal como secuenciación u otras) no se reclama. Además, no se describen la genotipificación viral (es decir VPH) tampoco los métodos no invasivos para la preparación de muestras. Xenomics, (WO2010051261) reclama el uso del fragmento del gen E1 del genoma del virus de papiloma como un marcador específico para la diagnosis diferencial mediante la detección de los genotipos VPH de riesgo más comunes contra el riesgo bajo. La patente indica varias técnicas moleculares incluyendo PCR y PCR en tiempo real pero no la secuenciación tampoco cuentas magnéticas. También se describe el uso de ácidos nucleicos aislados de muestra de orina pero no las secuencias de genoma hospedero tampoco la identificación de SNPs.

Existen varias formas para obtener un diagnóstico de cáncer, incluyendo historial del paciente, pruebas físicas, polimorfismos de riesgo de evaluación y finalmente, pruebas de disposición genética. Las pruebas físicas se refieren a formación de imágenes y escaneos, los más comunes de estos son los rayos X, ultrasonidos y MRI's. También pueden incluir escaneos PET y endoscopias. En lo que respecta a la identificación de los polimorfismos, existen pruebas que detectan los analitos específicos asociados con el cáncer tal como proteínas o productos metabólicos. Finalmente, las pruebas genéticas pueden identificar un cambio en el nivel molecular directamente en el ADN o ARN de un individuo. Estos cambios se asocian usualmente con un riesgo incrementado de la formación de neoplasia.

Estas asociaciones con cáncer son de mayor importancia, debido a que todas las pruebas previamente mencionadas, solo las pruebas genéticas son de una naturaleza preventiva. Es decir, pueden detectar una amenaza potencial antes de que se presente. Como resultado, un individuo puede tomar mediciones precautorias tal como

un cambio en hábitos, dieta y monitoreo constante. Todo esto se puede hacer antes de que la patología surja y puede ser muy efectivo en prevenir el desarrollo de la enfermedad.

5 Actualmente, existen diferentes técnicas para detectar los polimorfismos de riesgo genético. Por ejemplo, la secuenciación de genoma, reacción en cadena de la polimerasa cuantitativa (qPCR), microdisposiciones de ADN y técnica de polimorfismos de longitud de fragmento de
10 restricción (RFLPs). Estas técnicas se utilizan ampliamente, no solo para la búsqueda de cáncer y técnicas sofisticadas bien conocidas. Sin embargo, tienen desventajas con respecto a su precisión, capacidad de repetición, tiempo de análisis, y costo de realización.
15 También, requieren usualmente una muestra de sangre invasiva tomada por un flebotomista calificado.

Estos precedentes muestran la necesidad de desarrollar nuevas técnicas para la prevención de cáncer cervical y de próstata que sean sensibles, rápidas y económicas. La
20 presente invención busca responder esta necesidad por la detección simultánea de varias cepas del VPH y polimorfismos de riesgo asociados con el cáncer. No sólo eso, fija como objetivo hacerlo de esta manera con una muestra no invasiva tomada de la orina de ya sea hombres o
25 mujeres. Esta técnica no invasiva permitiría que un paciente tome su propia muestra con seguridad y sin dolor reduciendo no solo el riesgo y estrés al paciente, sino el costo total en el procedimiento de diagnóstico.

Este es un cambio importante de las técnicas invasivas
30 de la extracción de sangre o la prueba de Papanicolaou para mujeres, en los cuales los pacientes deben viajar a una clínica autorizada y solicitar un analista especializado. Se ha determinado que la orina puede de hecho ser utilizada como una muestra de fluido aceptable en las prácticas

clínicas y aún se ha encontrado que aloja exitosamente la presencia de ADN genómico y viral de VPH cuando una infección está presente. No solo eso, sino una prueba de orina no invasiva es mucho más segura para un paciente que una prueba de Papanicolaou que puede crear ocasionalmente microlesiones alrededor del área infectada de un paciente femenino creando una respuesta inflamatoria.

Por consiguiente, se describe en la presente nuevos métodos y kits para determinar simultáneamente si los genotipos de la cepa VPH y los marcadores genéticos para susceptibilidad al cáncer están presentes en una muestra de un sujeto.

De esta manera, en varias modalidades, la presente invención se dirige a métodos para determinar simultáneamente genotipos de la cepa VPH y marcadores genéticos para la susceptibilidad al cáncer en una muestra de un sujeto.

Koninkl (WO2009095840) describe un método para detección de factores patogénicos y específicos de hospedero simultáneos en una muestra líquida que comprende los pasos de extraer ADN fuera del cuerpo humano o animal de una muestra de tejido; solubilizar el ADN para obtener una muestra líquida que comprende ADN hospedero y/o ADN patógeno; cargar la muestra líquida en la cámara del dispositivo de microdisposición a fin de hacer contacto con los nucleótidos de sonda del dispositivo de microdisposición con la muestra líquida y detectar las interacciones entre el ADN hospedero y/o el ADN patógeno comprendido en la muestra líquida y los nucleótidos de sonda. En este método, el ADN se amplifica después del paso de extracción utilizando PCR multiplex con cebadores específicos para las regiones de ADN hospedero y ADN de patógeno. Y el dispositivo de microdisposición que comprende oligonucleótidos de sonda es capaz de enlazar los

factores de ADN específicos de hospedero implicados en la susceptibilidad a y/o prognosis de la enfermedad específica, y los oligonucleótidos de sonda son capaces de enlazar los patógenos de ADN que provocaron una enfermedad específica y cualquier cáncer provocado por patógenos tal como cáncer de estómago y cáncer cervical. En este método se pueden utilizar hasta 20-50 sondas para detectar el ADN patogénico se pueden utilizar y hasta 30-40 sondas para detectar marcadores en el ADN hospedero.

10 No obstante, la invención no incluye genotipificación de tipos virarles VPH específicos, tampoco SNPs específicos para el cáncer cervical, cáncer de próstata u otros tipos específicos de cáncer. La presente solicitud difiere con ese trabajo en que los genotipo de la cepa VPH específicos se eligen y mediante el uso de un ensayo de ligación de oligonucleótidos en lugar del microdisposición consumidor de tiempo y costoso. WO2009/095840 describe que los SNPs se detectan, lo cual conduce a la susceptibilidad a la infección por el patógeno en el ADN del hospedero, de esta manera la sensibilidad al desarrollo de cáncer cervical o 20 cáncer de estómago también se menciona.

Por otra parte, Rafnar y colaboradores (WO2010018601), describe un método para determinar el riesgo de cáncer o protección de la identificación de uno o más marcadores polimórficos rs401681, rs2736100 y rs2736098. El método comprende la presencia de al menos un alelo de al menos un marcador polimórfico, ya sea de una muestra de ácido nucleico de humano o en un conjunto de datos de genotipo del individuo. Este trabajo consistente reclama métodos, software y hardware para determinar la susceptibilidad al 30 cáncer en un individuo humano o se basa en datos indicativos de al menos un marcador polimórfico. También reclama un método para evaluar un individuo para la probabilidad de respuesta a un agente terapéutico

canceroso. En los métodos moleculares para identificación de polimorfismos se basan en amplificación por PCR en donde la genotipificación se lleva a cabo utilizando un proceso seleccionado de hibridación de sonda específica de alelo, extensión de cebadores específica de alelo, amplificación específica de alelo, secuenciación de ácido nucleico, digestión de 5'-exonucleasa, ensayo de baliza molecular, ensayo de ligación de oligonucleótido, análisis de tamaño, análisis de conformación de hebra individual y tecnología de microdisposición. No obstante, las condiciones de PCR multiplex tampoco las cuentas magnéticas se describen y la capacidad multiplex en los métodos clínicos no se especifican. Implica un alcance de tipos de cáncer consistentes incluyendo determinar el riesgo o protección contra cánceres de próstata, cervicales, de mama, de pulmón, de piel, colorectal, y de tiroides de acuerdo con la presencia/ausencia de al menos un alelo de al menos uno de los tres polimorfismos indicados previamente.

WO2010018601 además, describe un método para determinar la sensibilidad de un humano a desarrollar cáncer cervical en una infección con VPH16, VPH18, VPH31, VPH33, VPH45 o cualquier otro de los genotipos de la cepa VPH que detectan la presencia de SNPs en los marcadores al amplificar el ADN extraído de una muestra obtenida del paciente utilizando PCR y después un ensayo de hibridación, tal como ensayo de ligación de oligonucleótidos.

BREVE DESCRIPCIÓN DE LA INVENCION

La presente invención se basa en el descubrimiento seminal de la determinación de la susceptibilidad al cáncer mediante la identificación simultánea y detección de la infección por VPH y la genotipificación de marcadores de susceptibilidad al cáncer.

En una modalidad, la presente invención proporciona métodos para evaluar la susceptibilidad al cáncer en un sujeto al identificar simultáneamente uno o más genes marcadores de susceptibilidad al cáncer y uno o más genotipo de la cepa de virus de papiloma humano (VPH), evaluando de esta manera la susceptibilidad al cáncer en el sujeto. En un aspecto, la identificación del uno o más genes marcadores de susceptibilidad al cáncer es mediante la amplificación de una muestra de ADN sin células del sujeto utilizando cebadores para el uno o más genes marcadores de susceptibilidad al cáncer; y detectar el ADN amplificado. En otro aspecto, la amplificación de la muestra de ADN sin células también usa cebadores para el uno o más genotipos de la cepa VPH. En un aspecto adicional, el cáncer es cáncer cervical, de próstata, de colon, pancreático, gástrico, de pulmón, leucemia y mama. En ciertos aspectos, el uno o más genes marcadores de susceptibilidad al cáncer es CaCuA, CaCuB, CaCuC, CaCuD, CaCuE, CaCuF, CaCuG, CaCuH, CaCuI, CaCuJ, CaPA, CaPB, CaPC, CaPD, CaPE, CaPF, CaPG, CaPH, CaPI, CaPJ, COLA, COLB, COLC, COLD, COLE, COLF, COLG, GASA, GASB, GASC, GASD, GASE, GASG, LEUA, LEUB, LEUC, LEUD, LEUE, LEUF, MAMA, MAMB, MAMC, MAMD, MAME, MAMF, MAMG, PROA, PROB, PROC, PROD, PROE, PROF, PANA, PANB, PANC, PAND, PULA, PULB, PULC, PULD, PULE, PULF, PULG, GENA, GENB, GEND, GENE, GENG, GENH y/o GENI; un polimorfismo de nucleótido individual (SNP) situado dentro del gen que codifica para IL10, TGF- β 1, CYP1A1, ST3GAL4,

IL4, AGTR1, ERBB2, HOXB13, Chr8, MSMB, RNASEL, CYP19, ABO, ABL1, ARID5B, Chr13, CCKBR, JAK2, NQO1, EGFR, EPHX1, CHRNA3, IRF4, PIK3CA, CXCL8, BRCA2, BRCA1, ATM, TCF2, TGFB1, KiSS1, APC, PGR, MTHFR, MUTYH, CDH1, IL1B, IL6, 5 TLR4, TNF- α , MDM2, MLH1, BRAF, TP53, BCAR1, STK11, KRAS, FGFR2, SRD5A2, EIF3H y/o MSH6; y/o SEQ ID NOS:1-67. En algunos aspectos, el uno o más genes marcadores de susceptibilidad al cáncer es específico para el cáncer cervical (CaCuA, CaCuB, CaCuC, CaCuD, CaCuE, CaCuF, CaCuG, 10 CaCuH, CaCuI, y/o CaCuJ); específico para cáncer de próstata (CaPA, CaPB, CaPC, CaPD, CaPE, CaPF, CaPG, CaPH, CaPI, y/o CaPJ); específico para cáncer de colon (COLA, COLB, COLC, COLD, COLE, COLF, y/o COLG); específico para cáncer gástrico (GASA, GASB, GASC, GASD, GASE, y/o GASG); 15 específico para leucemia (LEUA, LEUB, LEUC, LEUD, LEUE, y/o LEUF); específico para cáncer de mama (MAMA, MAMB, MAMC, MAMD, MAME, MAMF, y/o MAMG), PROA, PROB, PROC, PROD, PROE, PROF; específico para cáncer pancreático (PANA, PANB, PANC y/o PAND), específico para cáncer de pulmón (PULA, PULB, 20 PULC, PULD, PULE, PULF, y/o PULG); y/o GENA, GENB, GEND, GENE, GENG, GENH y/o GENI. En un aspecto adicional, el uno o más genotipos de la cepa VPH es VPH-16, VPH-18, VPH-31, VPH-33, VPH-35, VPH-39, VPH-45, VPH-51, VPH-52, VPH-56, VPH-58, VPH-59, VPH-66, VPH-68, VPH-73 y/o SEQ ID NOS:68- 25 82. En un aspecto, el uno o más genotipos de la cepa VPH es una cepa de alto riesgo. En un aspecto específico, el genotipo de la cepa VPH es VPH-16, VPH-18, VPH-31, VPH-45 y/o VPH-58. En un aspecto adicional, el genotipo de la cepa de HVP se determina al detectar VPHA, VPHB, VPHC, VPHD, 30 VPHE, VPHF, VPHG, VPHH, VPHI, VPHJ, VPHK, VPHL, VPHM, HVPN, y/o VPHO. En un aspecto adicional, la detección del ADN amplificado se lleva a cabo por el ensayo de oligo-ligación (OLA), PCR, qPCR, secuenciación de ADN, fluorescencia, electroforesis en gel, cuentas magnéticas, extensión de

cebador específico de alelo (ASPE) e/o hibridación directa. En otro aspecto, el OLA usa sondas para el uno o más genes marcadores de susceptibilidad al cáncer. En un aspecto adicional, el OLA también usa sondas para el uno o más genotipos de la cepa VPH. En un aspecto, la muestra es una muestra de saliva, hisopo, sangre u orina. De esta manera, en varias modalidades, la presente invención se dirige a métodos para determinar simultáneamente los genotipos de la cepa VPH y marcadores genéticos para la susceptibilidad al cáncer en una muestra de un sujeto. Los métodos incluyen a) proporcionar una muestra del sujeto, b) obtener el ADN sin células de la muestra amplificar el ADN sin células con PCR de punto final utilizando cebadores para uno o más genotipos de la cepa VPH y cebadores para uno o más genes marcadores de susceptibilidad al cáncer; d) llevar a cabo un ensayo de ligación de oligonucleótido (OLA) en el ADN sin células amplificado utilizando sondas para el uno o más genotipos de la cepa VPH y sondas para el uno o más marcadores de susceptibilidad al cáncer y e) determinar si el uno o más genotipos de la cepa VPH y el uno o más marcadores de susceptibilidad al cáncer están presentes en el ADN sin células amplificado. En varias modalidades, la muestra es una muestra de orina. El uno o más genotipos de la cepa VPH pueden incluir una pluralidad de genotipos de la cepa VPH de alto riesgo. El uno o más marcadores de susceptibilidad al cáncer puede incluir una pluralidad de marcadores de susceptibilidad al cáncer cervical o una pluralidad de marcadores de susceptibilidad al cáncer de próstata.

En una modalidad adicional, la presente invención proporciona métodos llevados a cabo al amplificar una muestra de ADN sin células de un sujeto utilizando cebadores para uno o más genes marcadores de susceptibilidad al cáncer y para uno o más genotipos de la

cepa de virus de papiloma humano (VPH); y detectar el ADN amplificado. En un aspecto, el uno o más genes marcadores de susceptibilidad al cáncer son marcadores para cáncer cervical, de próstata, de colon, pancreático, de pulmón, de
5 mama, gástrico o leucemia. En un aspecto adicional, el uno o más genes marcadores de susceptibilidad al cáncer es CaCuA, CaCuB, CaCuC, CaCuD, CaCuE, CaCuF, CaCuG, CaCuH, CaCuI, CaCuJ, CaPA, CaPB, CaPC, CaPD, CaPE, CaPF, CaPG, CaPH, CaPI, CaPJ, COLA, COLB, COLC, COLD, COLE, COLF, COLG,
10 GASA, GASB, GASC, GASD, GASE, GASG, LEUA, LEUB, LEUC, LEUD, LEUE, LEUF, MAMA, MAMB, MAMC, MAMD, MAME, MAMF, MAMG, PROA, PROB, PROC, PROD, PROE, PROF, PANA, PANB, PANC, PAND, PULA, PULB, PULC, PULD, PULE, PULF, PULG, GENA, GENB, GEND, GENE, GENG, GENH y/o GENI; un polimorfismo de nucleótido
15 individual (SNP) situado dentro del gen que codifica para IL10, TGF- β 1, CYP1A1, ST3GAL4, IL4, AGTR1, ERBB2, HOXB13, Chr8, MSMB, RNASEL, CYP19, ABO, ABL1, ARID5B, Chr13, CCKBR, JAK2, NQO1, EGFR, EPHX1, CHRNA3, IRF4, PIK3CA, CXCL8, BRCA2, BRCA1, ATM, TCF2, TGFB1, KiSS1, APC, PGR, MTHFR,
20 MUTYH, CDH1, IL1B, IL6, TLR4, TNF- α , MDM2, MLH1, BRAF, TP53, BCAR1, STK11, KRAS, FGFR2, SRD5A2, EIF3H y/o MSH6; y/o SEQ ID NOs:1-67. En un aspecto adicional, el uno o más genotipos de la cepa VPH es VPH-16, VPH-18, VPH-31, VPH-33, VPH-35, VPH-39, VPH-45, VPH-51, VPH-52, VPH-56, VPH-58,
25 VPH-59, VPH-66, VPH-68 y/o VPH-73. En ciertos aspectos, la detección del ADN amplificado se lleva a cabo por el ensayo de oligo-ligación, PCR, secuenciación de ADN, fluorescencia, electroforesis en gel, cuentas magnéticas, extensión de cebador específico de alelo (ASPE) e/o
30 hibridación directa. En aspectos específicos, la PCR es qPCR, PCR multiplex o PCR anidada. En un aspecto, la muestra es una muestra de saliva, hisopo, sangre u orina.

En un aspecto adicional, la presente invención proporciona un kit que contiene al menos cebadores para uno

o más genes marcadores de susceptibilidad al cáncer; cebadores para uno o más genotipos de la cepa de virus de papiloma humano (VPH); e instrucciones para el uso. En un aspecto, el uno o más genes marcadores de susceptibilidad al cáncer es CaCuA, CaCuB, CaCuC, CaCuD, CaCuE, CaCuF, CaCuG, CaCuH, CaCuI, CaCuJ, CaPA, CaPB, CaPC, CaPD, CaPE, CaPF, CaPG, CaPH, CaPI, CaPJ, COLA, COLB, COLC, COLD, COLE, COLF, COLG, GASA, GASB, GASC, GASD, GASE, GASG, LEUA, LEUB, LEUC, LEUD, LEUE, LEUF, MAMA, MAMB, MAMC, MAMD, MAME, MAMF, MAMG, PROA, PROB, PROC, PROD, PROE, PROF, PANA, PANB, PANC, PAND, PULA, PULB, PULC, PULD, PULE, PULF, PULG, GENA, GENB, GEND, GENE, GENG, GENH, GENI y/o SEQ ID NO:1-67; un polimorfismo de nucleótido individual (SNP) situado dentro del gen que codifica para IL10, TGF- β 1, CYP1A1, ST3GAL4, IL4, AGTR1, ERBB2, HOXB13, Chr8, MSMB, RNASEL, CYP19, ABO, ABL1, ARID5B, Chr13, CCKBR, JAK2, NQO1, EGFR, EPHX1, CHRNA3, IRF4, PIK3CA, CXCL8, BRCA2, BRCA1, ATM, TCF2, TGFB1, KiSS1, APC, PGR, MTHFR, MUTYH, CDH1, IL1B, IL6, TLR4, TNF- α , MDM2, MLH1, BRAF, TP53, BCAR1, STK11, KRAS, FGFR2, SRD5A2, EIF3H y/o MSH6; y/o SEQ ID NOS: 1-67. En otro aspecto, el uno o más genotipos de la cepa VPH son VPH-16, VPH-18, VPH-31, VPH-33, VPH-35, VPH-39, VPH-45, VPH-51, VPH-52, VPH-56, VPH-58, VPH-59, VPH-66, VPH-68 y/o VPH-73 y/o SEQ ID NOS:68-82. En un aspecto adicional, el kit también contiene sondas para el uno o más genes marcadores de susceptibilidad al cáncer y/o sondas para el uno o más genotipos de la cepa VPH.

La presente invención se mejora además en los métodos descritos y procesos, presentando un método multiplex innovador para la genotipificación de VPH simultánea y varias identificaciones de SNPs diferentes para tipos diferentes de predisposición de cáncer.

Estas y otras características, aspectos y ventajas de las presentes enseñanzas se entenderán mejor con referencia

a la siguientes descripción, ejemplos y reivindicaciones adjuntas.

5

10

15

20

25

30

BREVE DESCRIPCIÓN DE LOS DIBUJOS

Aquellos de experiencia en la técnica entenderán que las figuras, descritas a continuación, son para propósitos
5 ilustrativos solamente. Las figuras no se proponen para limitar el alcance de las presentes enseñanzas de ninguna manera.

Las FIGURAS 1A, 1B, 1C, 1D y 1E ilustran la especificidad de especie en la detección de SNPs asociados
10 con SNPs de riesgo de cáncer cervical (CaCu) utilizando controles sintéticos, control biológico y ADN de 2 microorganismos uropatogénicos. FIGURA 1A. Detección de SNPs A-J de riesgo CaCu utilizando controles sintéticos de tipo natural (WT), mutante (MT) y heterocigotos (HET) (CS
15 WT, CS MT y CS HET). FIGURA 1B. Detección de SNPs A-J de riesgo CaCu utilizando ADN aislado de M1 de control biológico. FIGURA 1C. Detección de SNPs A-J de riesgo CaCu utilizando ADN aislado de *C. lupus familiaris*. FIGURA 1D. Detección de SNPs A-J de riesgo CaCu utilizando ADN aislado de
20 *Escherichia coli*. FIGURA 1E. Detección de SNPs A-J de riesgo CaCu utilizando ADN aislado del virus de Inmunodeficiencia Humano, VIH.

Las FIGURAS 2A y 2B ilustran la especificidad de intraensayo con la detección de SNPs A-J de riesgo CaCu
25 utilizando el control biológico M1. FIGURA 2A. Detección de SNPs A-J de riesgo CaCu utilizando sondas CaCu específicas. FIGURA 2B Detección de SNPs A-J de riesgo CaCu utilizando sondas específicas para la detección de VPH.

La FIGURA 3 ilustra los resultados de las
30 amplificaciones de PCR representativas de la susceptibilidad al cáncer cervical SNP designado como CaCuH en el cual AL indica líder alélico, C indica sin control de plantilla, WT indica control de ADN de tipo natural positivo, MT indica un control de ADN mutante positivo, B

indica ADN extraído de las muestras de sangre. U indica ADN extraído de las muestras de orina y CL indica ADN extraído de las líneas de células que presentan el SNP.

Las FIGURAS 4A, 4B, 4C, 4D y 4E ilustran la especificidad de especie en la detección de SNPs de riesgo de cáncer de próstata (CaP) utilizando controles sintéticos, una muestra de control biológica y ADN de 7 microorganismos uropatogénicos. FIGURA 4A. Detección de SNPs A-J de riesgo CaP utilizando controles sintéticos (CS WT, CS MT y CS HET). FIGURA 4B. Detección SNPs A-J de riesgo CaP utilizando ADN aislado de M4 de control biológico. FIGURA 4C. Detección de SNPs A-J de riesgo CaP utilizando 100 ng de ADN aislado de *C. lupus familiaris*. FIGURA 4D. Detección de SNPs A-J de riesgo CaP utilizando 100 ng de ADN aislado de *Escherichia coli*. FIGURA 4E. Detección de SNPs A-J de riesgo CaP utilizando 100 ng de ADN aislado de VIH.

Las FIGURAS 5A y 5B ilustran la especificidad de intra-ensayo en la detección de SNPs A-J de riesgo CaP utilizando la muestra de control biológica M4. FIGURA 5A. Detección de SNPs A-J de riesgo CaP utilizando sondas CaP específicas. FIGURA 5B. Detección de SNPs A-J de riesgo CaP utilizando sondas específicas para la detección de VPH.

La FIGURA 6 muestra los resultados de las amplificaciones por PCR representativas de los SNPs de susceptibilidad al cáncer de próstata designados como CaPG, CaPD y CaPH, en los cuales AL indica líder alélico, C indica sin control de plantilla, WT indica control de ADN de tipo natural positivo, MT indica control de ADN mutante positivo, B indica ADN extraído de las muestras de sangre, U indica ADN extraído de muestras de sangre y CL indica ADN extraído de la línea de células que presentan el SNP.

Las FIGURAS 7A, 7B, 7C, 7D y 7E ilustran la especificidad de especie en la descripción de VPH ADN

utilizando controles sintéticos y controles biológicos positivos para VPHA, VPHB, VPHC, VPHF, VPHG y VPHO. FIGURA 7A. Detección de VPHs A-O ADN utilizando controles sintéticos. FIGURA 7B. Detección de VPH DNA utilizando
5 controles biológicos. FIGURA 7C. Detección de VPH ADN utilizando ADN aislado de *C. lupus familiaris*. FIGURA 7D. Detección de VPH ADN utilizando ADN aislado de *Escherichia coli*. FIGURA 7E. Detección de VPH utilizando ADN aislado de VIH.

10 Las FIGURAS 8A, 8B, y 8C ilustran la especificidad de intra-ensayo en la detección de VPH ADN utilizando controles sintéticos. FIGURA 8A. Detección de VPH ADN utilizando sondas de VPH específicas. FIGURA 8B. Detección de VPH ADN utilizando sondas de CaCu específicas. FIGURA
15 8C. Detección de VPH ADN utilizando sondas de CaP específicas.

Las FIGURAS 9A y 9B ilustran los resultados de corrida de PCR representativas que identifican dos tipos de VPH en los cuales AL indica líder alélico, C- indica sin control de plantilla, C+1 indica control positivo sintético, C+2
20 indica ADN viral y CL indica ADN extraído de una línea de células conocida por contener el virus correspondiente. FIGURA 9A. Corridas de PCR representativas que identifican VPHA. FIGURA 9B. Corridas de PCR representativas que
25 identifican VPHB.

La FIGURA 10 muestra la identificación de 20 polimorfismos de riesgo de cáncer utilizando controles sintéticos por la prueba GanPlex MR (Panel A). La gráfica muestra los valores MFI registrados en cada uno de los
30 polimorfismos de riesgo de cáncer cuando se utilizaron controles sintéticos de tipo natural (CS WT), Mutantes (MT) y Heterocigotos (HET). Las barras representan el Promedio \pm 1 D.E. de 2 réplicas.

La FIGURA 11 muestra la identificaron de 22

polimorfismos de riesgo de cáncer utilizando controles sintéticos por la prueba GanPlex MR (Panel B). La gráfica muestra los valores MFI registrados en cada uno de los polimorfismos de riesgo de cáncer cuando se utilizaron los
5 controles sintéticos de tipo natural (CS WT), Mutantes (MT) y Heterocigotos (HET). Las barras representan el Promedio \pm 1 D.E. de 2 réplicas.

La FIGURA 12 ilustra el ensayo de discriminación alélica de un SNP de riesgo de cáncer cervical que muestra
10 la fluorescencia asociada con el alelo de tipo natural (WT) en el eje X, la fluorescencia asociada con un alelo mutante (MT) en el eje Y, y la delimitación de las áreas de fluorescencia utilizando un control WT sintético, un control sintético MT y un control sintético heterocigoto
15 (WT/MT).

Las FIGURAS 13A y 13B ilustran electroferogramas ejemplares de acuerdo con varias modalidades descritas en la presente.

La FIGURA 14 es una gráfica de flujo que ilustra la
20 detección de secuencias objetivo previamente amplificadas por PCR, utilizando qPCR en presencia de sondas SYBR^{MR} Green o TaqMan^{MR} etiquetada con diferentes fluoróforos, en los cuales (1) indica el oligonucleótido delantero, (2) el oligonucleótido inverso, (5) la secuencia de sonda, (6) la
25 secuencia objetivo, (7) el extremo de cebador 5, (8) el extremo de cebador 3, (100) el paso de desnaturalización (temperatura de 95°C), (200) el paso de alineación, y (300) el paso de extensión (temperatura de 72°C).

La FIGURA 15 ilustra un ejemplo de gráfica de
30 amplificación que muestra la secuencia objetivo identificadas por qPCR utilizando sondas TaqMan^{MR} etiquetadas con tres fluoróforos diferentes. La gráfica muestra el análisis de una muestra biológica incluyendo sus controles sintéticos respectivos formados para identificar

uno de los SNPs asociado con cáncer de próstata, en el cual (29) indica la amplificación del control sintético positivo de tipo natural, (30) la amplificación del control sintético positivo Mutante, (31) la amplificación de la muestra biológica Mutante, y (32) la amplificación del control Negativo.

Las FIGURAS 16A y 16B muestran la identificación y la discriminación alélica de polimorfismos de riesgo para CaCu en la muestra de control biológica M1 por la prueba Kimera-Test^{MR}. FIGURA 16A: Se muestran los valores MFI registrados en cada uno de los polimorfismos de riesgo CaCu identificados de la muestra de control biológica M1. Las barras representan el Promedio \pm 1 D.E. de 4 réplicas. FIGURA 16B: Gráfica de discriminación de alelo originada de los valores RA obtenidos. La muestra de control biológica M1 presenta los polimorfismos CACUA, CACUB, CACUD y CACUJ en el genotipo Ho.WT, CACUH y CACUG en el genotipo Ho.MT, CACUF y CACUC en el genotipo HET.

Las FIGURAS 17A y 17B muestran la identificación y discriminación alélica de polimorfismos de riesgo para CaP en la muestra de control biológica por la prueba Kimera-TestTM. FIGURA 17A: Se muestran los valores MFI registrados en cada uno de los polimorfismos de riesgo CaP identificados en la muestra de control biológica M4. Las barras representan el Promedio \pm 1 D.E. de 4 réplicas. FIGURA 17B: Gráfica de discriminación de alelo originada de los valores RA obtenidos. La muestra de control biológica M4 presenta CAPA, CAPB, CAPC, CACUD, CAPE, CAPF, CAPG y los polimorfismos CAPI en el genotipo Ho.WT, CAPH y CAPJ en el genotipo HET.

Las FIGURAS 18A, 18B, 18C, 18D, 18E, 18F, 18G, 18H, 18I, 18J, 18K, 18L, 18M y 18N muestran la detección de las cepas de VPH. FIGURA 18A. muestra 5636. FIGURA 18B. muestra 1920. FIGURA 18C. 1929. FIGURA 18D. 1933. FIGURA 18E.

muestra 1573. FIGURA 18F. muestra 2864. FIGURA 18G. muestra 1877. FIGURA 18H. muestra 1878. FIGURA 18I. muestra 1882. FIGURA 18J. muestra 1883. FIGURA 18K. muestra 1909. FIGURA 18L. muestra 1920. FIGURA 18M. muestra 1933. FIGURA 18N. muestra 1939.

Las FIGURAS 19A, 19B, 19C, 19D, 19E, 19F, 19G, 19H y 19I muestran la determinación de susceptibilidad al cáncer de mama. FIGURA 19A. muestra 113. FIGURA 19B muestra 116. FIGURA 19C. muestra 117. FIGURA 19D. muestra 118. FIGURA 19E. muestra 119. FIGURA 19F muestra 120. FIGURA 19G. muestra 133. FIGURA 19H. muestra 134.

Las FIGURAS 20A, 20B, 20C, 20D, 20E, 20F, 20G, 20H, 20I, 20J, 20K, 20L, 20M, 20N, 20O, 20P, 20Q, 20R, 20S, 20T, 20U y 20V muestran la determinación de la susceptibilidad al cáncer de colon. FIGURA 20A muestra 81. FIGURA 20B muestra 82. FIGURA 20C muestra 84. FIGURA 20D muestra 85. FIGURA 20E. muestra 86. FIGURA 20F. muestra 87. FIGURA 20G muestra 88. FIGURA 20H. muestra 89. FIGURA 20I muestra 90. FIGURA 20J. muestra 92. FIGURA 20K. muestra 93. FIGURA 20L. muestra 96. FIGURA 20M. muestra 97. FIGURA 20N. muestra 100. FIGURA 20O. muestra 101. FIGURA 20P. muestra 102. FIGURA 20Q. muestra 103. FIGURA 20R. muestra 104. FIGURA 20S. muestra 105. FIGURA 20T. muestra 106. FIGURA 20U. muestra 107. FIGURA 20V. muestra 108.

Las FIGURAS 21A, 21B, 21C, 21D y 21E muestran los resultados de qPCR de una muestra de cáncer de mama para marcadores de genes específicos de cáncer de mama. FIGURA 21A. MAMA SNP. FIGURA 21B. MAMB SNP. FIGURA 21C. MAMC SNP. FIGURA 21D. MAMD SNP. FIGURA 21E. MAMD SNP.

DESCRIPCIÓN DETALLADA DE LA INVENCION

La presente invención se basa en el descubrimiento seminal que la detección simultánea de la infección por VPH y la genotipificación de los marcadores de susceptibilidad al
5 cáncer se pueden utilizar para determinar la susceptibilidad al cáncer en un sujeto.

Antes que se describan las presentes descomposiciones y métodos, se va a entender que esta invención no se limita
10 a composiciones particulares, métodos, y condiciones experimentales descritas, ya que estas composiciones, métodos y condiciones pueden variar. También se va a entender que la terminología utilizada en la presente es para propósito de describir modalidades particulares
15 solamente, y no se proponen para ser limitante, puesto que el alcance de la presente invención será limitada solo en las reivindicaciones adjuntas.

Como es utiliza en esta especificación y las reivindicaciones adjuntas, las formas singulares "un",
20 "una", "el/la" incluyen referencias plurales a menos que el contexto lo indique claramente de otra manera. De esta manera, por ejemplo, las referencias al "el método" incluye uno o más métodos, y/o pasos del tipo descrito en la presente que serán evidentes para aquellas personas
25 expertas en la técnica en la lectura de esta descripción y así sucesivamente. Por ejemplo, el término "un genotipo de la cepa VPH" puede incluir "una pluralidad de genotipos de la cepa VPH". Similarmente, la forma plural puede incluir la forma singular.

30 Todas las publicaciones, patentes, y solicitudes de patente mencionadas en esta especificación se incorporan en la presente a manera de referencia al mismo grado como si cada publicación individual, patente, o solicitud de patente se hubiera indicado específica e individualmente a

ser incorporada por referencia.

A menos que se defina de otra manera, todos los términos técnicos y científicos utilizados en la presente tienen el mismo significado como es comúnmente entendido por uno de experiencia ordinaria en la técnica a la cual esta invención pertenece. Aunque cualquiera de los métodos y materiales similares y equivalentes a aquellos descritos en la presente se pueden utilizar en la práctica o prueba de la invención, se entenderá que las modificaciones y variaciones son abarcadas dentro del espíritu y alcance de la presente descripción. Ahora se describen los métodos y materiales preferidos.

El término "aproximadamente" cuando se utiliza antes de una designación numérica, por ejemplo, pH, temperatura, cantidad, concentración, y peso molecular, incluyendo intervalo, indica aproximaciones que pueden variar por $\pm 5\%$, $\pm 1\%$ o $\pm 0.1\%$.

Como se utiliza en la especificación y reivindicaciones, la forma singular "un", "una", "el/la" incluyen referentes plurales a menos que el contexto lo indique claramente de otra manera.

El término "y/o" se propone para referirse a cualquiera o ambos de los dos componentes de la invención.

Varias modalidades de la presente invención se dirigen a métodos y kits para determinar simultáneamente si los genotipos de la cepa VPH y marcadores genéticos para la susceptibilidad al cáncer están presentes en una muestra de un sujeto.

En una modalidad, la presente invención proporciona métodos para evaluar la susceptibilidad al cáncer en un sujeto al identificar simultáneamente uno o más genes marcadores de susceptibilidad al cáncer y una cepa del genotipo de virus de papiloma humano (VPH), evaluando de esta manera la susceptibilidad al cáncer en el sujeto.

Como es utilizada en la presente "determinar una susceptibilidad al cáncer" y "evaluar una susceptibilidad al cáncer" en un paciente se puede utilizar intercambiamente, y se refiere a la evaluación de la probabilidad del paciente a desarrollar un cierto tipo de cáncer. La evaluación del riesgo del desarrollo de cáncer de la presente invención incluye la detección de un ADN de la cepa VPH, y la detección de SNPs que se asocian con la susceptibilidad al cáncer.

El término "cáncer" se refiere a un grupo de enfermedades caracterizadas por proliferación de células anormales y descontroladas comenzando en un sitio (sitio primario) con el potencial de invadir y/o propagarse a otros sitios (sitios secundarios, metástasis) que diferencian el cáncer (tumor maligno) del tumor benigno. Virtualmente, todos los órganos se pueden afectar, conduciendo a más de 100 tipos de cáncer que pueden afectar humanos. Los cánceres pueden resultar de muchas causas incluyendo predisposición genética, infección viral, disposición a radiación ionizante, disposición a contaminantes ambientales, uso de tabaco o alcohol, obesidad, dieta deficiente, falta de actividad física o cualquier combinación de los mismos. Los cánceres particulares referido en la presente son cáncer cervical, de próstata, de colon, pancreático, de pulmón o cabeza y cuello.

Los cánceres ejemplares descritos por el Instituto de Cáncer Nacional incluyen: Leucemia Linfoblástica Aguda, Adulta; Leucemia Linfoblástica Aguda, de la Niñez; Leucemia mielóide Aguda, Adulta; Carcinoma Adrenocortical; Carcinoma Adrenocortical, de la Niñez; Linfoma Relacionado con SIDA; Afecciones Malignas Relacionadas con SIDA; Cáncer Anal; Astrocitoma, Cerebelar de la Niñez; Astrocitoma, Cerebral de la Niñez; Cáncer del Conducto Biliar, Extrahepático;

Cáncer de Vejiga; Cáncer de Vejiga, de la Niñez; Cáncer Óseo, Osteosarcoma/Histiocitoma Fibroso Maligno; Glioma de Tallo Cerebral, de la Niñez; Tumor Cerebral, Adulto; Tumor Cerebral, Glioma del Tallo Cerebral, de la Niñez; Tumor Cerebral, Astrocitoma Cerebelar, de la Niñez; Tumor Cerebral, Astrocitoma Cerebral/Glioma Maligno, de la Niñez; Tumor Cerebral, Ependimoma, de la Niñez; Tumor Cerebral, Meduloblastoma, de la Niñez; Tumor Cerebral, Tumores Neuroectodérmicos Primitivos Suprasensoriales, de la Niñez; Tumor Cerebral, Ruta Visual y Glioma Hipotalámico, de la Niñez; Tumor Cerebral; de la Niñez (Otros); Cáncer de mama; Cáncer de mama y Embarazo; Cáncer de mama, de la Niñez; Cáncer de mama, Masculino; Adenomas Bronquiales/Carcinoides, de la Niñez; Tumor Carcinoide, de la Niñez; Tumor Carcinoide, Gastrointestinal; Carcinoma, Adrenocortical; Carcinoma, Célula de Islotes; Carcinoma de Primario Desconocido; Linfoma del Sistema Nervioso Central, Primario; Astrocitoma Cerebelar, de la Niñez; Astrocitoma Cerebral/Glioma Maligno, de la Niñez; Cáncer Cervical; Cánceres de la Niñez; Leucemia linfocítica Crónica; Leucemia Mielogenosa Crónica; Trastornos Mieloproliferativos Crónicos; Sarcoma de Células Claras de Revestimiento de Tendón; Cáncer de colon; Cáncer Colorectal, de la Niñez; Linfoma de Células T Cutáneo; Cáncer de Endometrio; Ependimoma, de la Niñez; Cáncer Epitelial, Ovárico; Cáncer Esofágico; Cáncer Esofágico, de la Niñez; Familia de Tumores de Ewing; Tumor de Células Germinales Extracraneales, de la Niñez; Tumor de Células Germinales Extragonadales; Cáncer del Conducto Biliar Extrahepático; Cáncer Ojos, Melanoma Intraocular; Cáncer de Ojos, Retinoblastoma; Cáncer de la Vesícula Biliar; Cáncer Gástrico (Estómago); Cáncer Gástrico (Estómago), de la Niñez; Tumor Carcinoide Gastrointestinal; Tumor de Células Germinales, Extracraneal, de la Niñez; Tumor de Células

Germinales, Extragonadal; Tumor de Células Germinales, Ovárico; Tumor Trofoblástico Gestacional; Glioma. Tallo Cerebral de la Niñez; Glioma. Ruta Visual de la Niñez e Hipotalámico; Leucemia de Células Pilosas; Cáncer de Cabeza y Cuello; Cáncer Hepatocelular (Hígado), Adulto (Primario); 5 Cáncer Hepatocelular (Hígado), de la Niñez (Primario); Linfoma de Hodgkin, Adulto; Linfoma de Hodgkin, de la Niñez; linfoma de Hodgkin Durante el Embarazo; Cáncer Hipofaríngeo; Glioma Hipotalámico y de la Ruta Visual, de 10 la Niñez; Melanoma Intraocular; Carcinoma de Células de los Islotes (Páncreas Endocrino); Sarcoma de Kaposi; Cáncer de Riñón; Cáncer de Laringe; Cáncer de Laringe, de la Niñez; Leucemia, Linfoblástica aguda, Adulta; Leucemia, Linfoblástica Aguda, de la Niñez; Leucemia, Mieloide Aguda, 15 Adulto; Leucemia, Mieloide Aguda, de la Niñez; Leucemia, Linfocítica Crónica; Leucemia, Mielogenosa Crónica; Leucemia, Células Pilosas; Cáncer de Labios y Cavidad Oral; Cáncer de Hígado, Adulto (Primario); Cáncer de Hígado, de la Niñez (Primario); Cáncer de pulmón, Células no Pequeñas; 20 Cáncer de Pulmón, Células Pequeñas; Leucemia Linfoblástica, Aguda Adulta; Leucemia Linfoblástica, Aguda de la Niñez; Leucemia linfocítica, Crónica; Linfoma, Relacionado con SIDA; Linfoma, Sistema Nervioso Central (Primario); Linfoma, Células T Cutáneas; Linfoma, de Hodgkin, Adulto; 25 Linfoma, de Hodgkin; de la Niñez; Linfoma, de Hodgkin Durante el Embarazo; Linfoma, no de Hodgkin, Adulto; Linfoma, No de Hodgkin, de la Niñez; Linfoma, No de Hodgkin Durante el Embarazo; Linfoma, Sistema Nervioso Central Primario; Macroglobulinemia, Cáncer de mama Masculino de 30 Waldenstrom; Mesotelioma Maligno, Adulto; Mesotelioma Maligno, de la Niñez; Timoma Maligno; Meduloblastoma, de la Niñez; Melanoma; Melanoma, Intraocular; Carcinoma de Células de Merkel; Mesotelioma, Maligno; Cáncer de Cuello Escamoso Metastásico con Primario Oculito; Síndrome de

Neoplasia Endocrina Múltiple, de la Niñez; Mieloma Múltiple/Neoplasma de Células Plasmáticas; Fungoides Micosis; Síndromes de Mielodisplasia; Leucemia Mielogenosa, Crónica; Leucemia Mieloide, Aguda de la Niñez; Mieloma, 5 Múltiple; Trastornos Mieloproliferativos, Crónicos; Cáncer de la Cavidad Nasal y Seno Paranasal; Cáncer Nasofaríngeo; Cáncer Nasofaríngeo, de la Niñez; Neuroblastoma; Linfoma No de Hodgkin, Adulto; Linfoma No de Hodgkin, de la Niñez; Linfoma No Hodgkin Durante el Embarazo; Cáncer de pulmón de 10 Células no Pequeñas; Cáncer Oral, de la Niñez; Cáncer de la Cavidad Oral y Labios; Cáncer Orofaríngeo; Osteosarcoma/Histiocitoma Fibroso Maligno de Hueso; Cáncer Ovárico, de la Niñez; Cáncer Epitelial Ovárico; Tumor de Células Germinales de Ovario; Tumor de Potencial Maligno 15 Bajo de Ovario; Cáncer Pancreático; Cáncer Pancreático, de la Niñez, Cáncer Pancreático, Células de Islote; Cáncer del Seno Paranasal y Cavidad Nasal; Cáncer de Paratiroides; Cáncer de Pene; Feocromocitoma; Tumores Neuroectodérmicos Primitivos Pineales y Suprasensoriales, de la Niñez; Tumor 20 de la Pituitaria; Neoplasma de Células Plasmáticas/mieloma Múltiple; Blastoma Pleuropulmonar; Embarazo y Cáncer de Mama; Embarazo y Linfoma de Hodgkin; Embarazo y Linfoma No de Hodgkin; Linfoma del Sistema Nervioso Central Primario; Cáncer de Hígado Primario, Adulto; Cáncer de Hígado 25 Primario, de la Niñez; Cáncer de Próstata; Cáncer Rectal; Cáncer de Células Renales (Riñón); Cáncer de Células Renales, de la Niñez; Pelvis y Uréter Renal, Cáncer de Células Transicionales; Retinoblastoma; Rabdomiosarcoma, de la Niñez; Cáncer de Glándulas Salivales; Cáncer de la 30 Glándula Salivar, de la Niñez; Sarcoma, Familia de Ewing de Tumores; Sarcoma, Sarcoma de Kaposi (Histiocitoma Fibroso Maligno de Osteosarcoma V de Hueso; Sarcoma, Rabdomiosarcoma, de la Niñez; Sarcoma, Tejido Blando, Adulto; Sarcoma, Tejido Blando, de la Niñez; Síndrome de

Sezary; Cáncer de Piel; Cáncer de Piel, de la Niñez; Cáncer de Piel (Melanoma); Carcinoma de Piel, Células de Merkel; Cáncer de Pulmón de Células Pequeñas; Cáncer de Intestino Delgado; Sarcoma de Tejido Blando, Adulto; Sarcoma de Tejido Blando, de la Niñez; Cáncer de Cuello Escamoso con Primario Oculito, Metastásico; Cáncer de Estómago (Gástrica); Cáncer de Estómago (Gástrica), de la Niñez; Tumores Neuroectodérmicos Primitivos Suprasensoriales, de la Niñez; Linfoma de Células T, Cutáneo; Cáncer Testicular; Timoma, de la Niñez; Timoma, Maligno; Cáncer de la Tiroides; Cáncer de la Tiroides, de la Niñez; Cáncer de Células Transicionales de la Pelvis Renal y Uréter; Tumor Trofoblástico, Gestacional; Sitio Primario Desconocido, Cáncer de, de la Niñez; Cánceres Inusuales de la Niñez; Uréter y Pelvis Renal, Cáncer de Células Transicionales; Cáncer Uretral; Sarcoma Uterino; Cáncer Vaginal; Glioma de la Ruta Visual e Hipotalámico, de la Niñez; Cáncer Vulvar; Macro-globulinemia de Waldenstrom; y Tumor de Wilms.

Los términos "sujeto", "individuo" y "paciente" se utilizan intercambiablemente en la presente y se refieren a un mamífero y, particularmente, a un humano.

Como se utiliza en la presente, "Marcadores de susceptibilidad al cáncer" y "marcadores genéticos de susceptibilidad al cáncer" se utilizan intercambiablemente y se refieren a cualquiera de los marcadores genéticos que incrementan el riesgo del portador de tal marcador para desarrollar el cáncer asociado con el marcador. Los marcadores genéticos de susceptibilidad al cáncer se refieren en general a mutaciones heredadas o mutaciones somáticas en los genes supresores de tumor o en oncogenes, y que son responsables por el mayor riesgo de desarrollo de cáncer. Sin embargo, los marcadores de susceptibilidad al cáncer en un sujeto también se pueden identificar como polimorfismos de nucleótidos individuales (SNPs). Un SNP es

una variación de la secuencia de ADN que se presenta cuando un nucleótido individual - A, T, C, o G - en el genoma difiere entre los miembros de una especie. Como se utiliza en la presente, el término SNP se propone para referirse a
5 aquellas variaciones de secuencia de ADN asociadas con el cáncer, en particular, con cáncer cervical o cáncer de próstata.

Los SNPs se han reportado que se asocian con cánceres cervicales y de próstata en pacientes. De esta manera, un
10 número de SNPs en genes identificados, se ha reportado que se asocia con cáncer cervical y similarmente, a un número de SNPs se ha reportado que se asocia con cáncer de próstata. Estos SNPs se pueden tomar como objetivo en los métodos y kits en la presente para detectar la presencia de
15 marcadores genéticos que indican susceptibilidad a cáncer cervical o cáncer de próstata.

Además, los SNPs se asocian con propensión a cáncer en órganos diferentes, incluyendo otros órganos tal como cánceres de mama, pulmón, pancreáticos, gástricos y de
20 colon. Por otra parte, los SNPs se han asociado con cánceres, incluyendo leucemia, y específicamente leucemia linfoblástica mieloide crónica, leucemia linfoblástica mieloide aguda y leucemia linfocítica crónica. Aquellos de experiencia en la técnica reconocerán que los métodos y
25 kits de la presente invención se pueden utilizar para detectar la presencia de marcadores genéticos indicando susceptibilidad a esos cánceres también. En otro aspecto, la detección simultánea de la infección por VPH (genotipificación) y la propensión genética de cáncer de
30 próstata, y la detección simultánea de detección por VPH (genotipificación) y la propensión genética de cáncer cervical, se puede lograr utilizando los métodos y kits de la presente invención. Las pruebas de ADN se pueden utilizar para identificar genotipos de la cepa VPH así como

marcadores de susceptibilidad al cáncer en un sujeto.

En ciertos aspectos, el gen marcador de susceptibilidad al cáncer es CaCuA, CaCuB, CaCuC, CaCuD, CaCuE, CaCuF, CaCuG, CaCuH, CaCuI, CaCuJ, CaPA, CaPB, CaPC, CaPD, CaPE, CaPF, CaPG, CaPH, CaPI, CaPJ, COLA, COLB, COLC, COLD, COLE, COLF, COLG, GASA, GASB, GASC, GASD, GASE, GASG, LEUA, LEUB, LEUC, LEUD, LEUE, LEUF, MAMA, MAMB, MAMC, MAMD, MAME, MAMF, MAMG, PROA, PROB, PROC, PROD, PROE, PROF, PANA, PANB, PANC, PAND, PULA, PULB, PULC, PULD, PULE, PULF, PULG, GENA, GENB, GEND, GENE, GENG, GENH y/o GENI; es un SNP situado en el gen que codifica para IL10, TGF- β 1, CYP1A1, ST3GAL4, IL4, AGTR1, ERBB2, HOXB13, Chr8, MSMB, RNASEL, CYP19, ABO, ABL1, ARID5B, Chr13, CCKBR, JAK2, NQO1, EGFR, EPHX1, CHRNA3, IRF4, PIK3CA, CXCL8, BRCA2, BRCA1, ATM, TCF2, TGFB1, KISS1, APC, PGR, MTHFR, MUTYH, CDH1, IL1B, IL6, TLR4, TNF- α , MDM2, MLH1, BRAF, TP53, BCAR1, STK11, KRAS, FGFR2, SRD5A2, EIF3H y/o MSH6; y/o SEQ ID NOs:1-67 *ver Tabla 22). En algunos aspectos el gen de susceptibilidad al cáncer es específico para cáncer cervical (CaCuA, CaCuB, CaCuC, CaCuD, CaCuE, CaCuF, CaCuG, CaCuH, CaCuI, y/o CaCuJ); específico para cáncer de próstata (CaPA, CaPB, CaPC, CaPD, CaPE, CaPF, CaPG, CaPH, CaPI, y/o CaPJ); específico para cáncer de colon (COLA, COLB, COLC, COLD, COLE, COLF, y/o COLG); específico para cáncer gástrico (GASA, GASB, GASC, GASD, GASE, y/o GASG); específico para leucemia (LEUA, LEUB, LEUC, LEUD, LEUE, y/o LEUF); específico para cáncer de mama (MAMA, MAMB, MAMC, MAMD, MAME, MAMF, y/o MAMG), PROA, PROB, PROC, PROD, PROE, PROF; específico para cáncer pancreático (PANA, PANB, PANC y/o PAND), específico para cáncer de pulmón (PULA, PULB, PULC, PULD, PULE, PULF, y/o PULG); y/o GENA, GENB, GEND, GENE, GENG, GENH y/o GENI. En otros aspectos el uno o más genes de susceptibilidad al cáncer es CACUA, CACUB, CACUC, CACUD, CACUF, CACUG, CACUH y/o CACUJ; CAPA, CAPB, CAPC,

CAPD, CAPE, CAPF, CAPG, CAPI, y/o CAPJ; MAMC, MAMF, MAMG; y/o COLA, COLB, COLC y/o COLF.

Tabla 22

SEQ ID NO	Nombre del SNP	Ubicación del SNP	Secuencia SNP
SEQ ID NO:1	CACUA	rs180087 2 situado en el gen IL-10	AGCAAGTGCAGACTACTCTTACCCACTTCCCCAAGCACAG TTGGGGTGGGGGACAGCTGAAGAGGTGGAAACATGTGCCTG AGAATCCTAATGAAATCGGGGTAAAGGAGCCTGGAACACAT CCTGTGACCCCGCCTGTMCTGTAGGAAGCCAGTCTCTGGAA AGTAAAATGGAAGGGCTGCTTGGGAACTTTGAGGATATTTA GCCCACCCCTCATTTTTACTTGGGGAACTAAGGCCCAGA GACC
SEQ ID NO:2	CACUB	rs180046 8 situado en el gen TGFB1	CATCTACAGTGGGGCCGACCGCTATCGCCTGCACACAGCTG CTGGTGGCACCGTGCACCTGGAGATCGGCCTGCTGCTCCGC AACTTCGACCGCTACGGCGTGGAGTGCTGAGGGACTCTGCC TCCAACRTCACCACCATCCACACCCCGGACACCCAGTGATG GGGAGGATGGCACAGTGGTCAAGAGCACAGACTCTAGAGA CTGTCAGAGCTGACCCAGCTAAGGCATGGCACCGCTTCTG TCCT
SEQ ID NO:3	CACUC	rs180046 9 situado en el gen TGFB1	GGTCCCTCTGGGCCAGTTTCCCTATCTGTAAATTGGGGAC AGTAAATGTATGGGGTGCAGGGTGTGAGTGACAGGAGGC TGCTTAGCCACATGGGAGGTGCTCAGTAAAGGAGAGCAATT CTTACAGGTGTCTGCCTCCTGACCCTTCCATCCYTCAGGTG TCCTGTTGCCCCCTCCTCCCACTGACACCCTCCGGAGGCC CCATGTTGACAGACCCTCTTCTCCTACCTTGTTTCCAGCC TGAC
SEQ ID NO:4	CACUF	rs108935 06 situado en el gen ST3GAL4	CTTCCTGCTTTCTGGTGGAAGGGAGGGGCAGACAGTGGGTG TGTCTGCTCCAGTGTCTAGGCAGGAGATTTGTGAAGCYG ACCGGACACCTGTGGCTCTTATTTCCCTAGGTGGCCGAGGC AGCCGGGATGACAGCTCTCCCAGGAATCCTGCTGCCTGCT GAGAAACATGGTCAGCAAGTCCCGTGAGTGTGATCCGAGGG CTCCCCACCCTGGAGGACAGGCCTCAGAAGCCGTCTTCAG CAGG

SEQ ID NO:5	CACUG	rs242491 3 situado en el gen DNMT3B	CTGGGGAATTCTGGCTGGACTCAGTCCAGAGTCCCACCTCA TCACCTGTTCACTTCCAGTTGTCCTGAAGCTGGCTACCAGG TCTCCTTGGCCACCTGAAGGCCTAATCCTTCTGGCCCCGCC AGACCCYAGGCCTCCAGTCACCTAAGGCCCAGTGAGTGTCC TCTCTTGCTTCTAGGTCCGAACTCGAAATAACAACAGTGTC TCCAGCCGGGAGAGGCACAGGCCTTCCCCACGTTCCACCCG AGGC
SEQ ID NO:6	CACUH	rs224325 0 situado en el gen IL-4	TTCCCTGAAACCTCAGAATAGACCTACCTTGCCAAGGGCTTC CTTATGGGTAAGGACCTTATGGACCTGCTGGGACCCAACT AGGCCTCACCTGATACGACCTGTCCTTCTCAAAACACCTAA ACTTGGGAGAACATTGTCCCCAGTGCTGGGGTAGGAGAGT CTGCCTGTTATTCTGCCTCTATGCAGAGAAGGAGCCCCAGA TCAGCTTTTCCATGACAGGACAGTTTCCAAGATGCCACCTG TACT
SEQ ID NO:7	CACUJ	rs180087 1 situado en el gen IL- 10	CCACAGAAGCTTACAACATAAAAGAACTCTAAGGCCAATTT AATCCAAGGTTTCATTCTATGTGCTGGAGATGGTGTACAGT AGGGTGAGGAAACCAAATCTCAGTTGGCACTGGTGTACCC TTGTACAGGTGATGTAAAYATCTCTGTGCCTCAGTTTGCTCA CTATAAAATAGAGACGGTAGGGGTCATGGTGAGCACTACCT GACTAGCATATAAGAAGCTTTCAGCAAGTGCAGACTACTCT TACC
SEQ ID NO:8	CAPA	rs5186 situado en el gen AGT1R	GCTCATCCACCAAGAAGCCTGCACCATGTTTTGAGTTGAG TGACATGTTGAAACCTGTCCATAAAGTAATTTTGTGAAAG AAGGAGCAAGAGAACATTCCTCTGCAGCACTTCACTACCAA ATGAGCMTTAGCTACTTTTCAGAATTGAAGGAGAAAATGCA TTATGTGGACTGAACCGACTTTTCTAAAGCTCTGAACAAAA GCTTTTCTTTCCTTTTGCAACAAGACAAAGCAAAGCCACAT TTTG
SEQ ID NO:9	CAPB	rs138213 197 situado	AAACTCAGTGGGGCGGCTGGGGTACTCTTCCCCGGCCGTGG GAGTCTCCGCGGGGTACGCGGCCAGGGTGGCTGCCTGGGCA CAGGGTTTCAGCGAGCTCCGGGACACTCGGCAGGAGTAGTA

		en el gen HOXB13	CCCGCCTYCAAAGTAACCATAAGGCACGGGAGCTGGGGACG TCCCCTGGGGCACCCCAGGGCATGGGTGGCATTGCTTTGGC GGCTCCGCCGAGCCTGGCAGATCCAAGGGGGCATAAGTTGAC AGCA
SEQ ID NO:10	CAPC	rs928285 8 situado en el gen SRD5A2	CYAGCAGAGCCCAGTGTGGCAGGCAGCGCCACTTTGGTCCG CCCTTGGGGCACTGGCCTTGTACGTGCGAAGCC TCCGGCTACGGGAAGCACACGGAGAGCCTGAAGCCGGCGGC TACCCGCCTGCCARCCRCGCCGCCTGGTTCTGCAGGAGC TGCCTTCTTTCGCGGTGCCCGGGGATCCTCGCCCGGCAG CCCCTCTCCCTCTTCGGGCCACCTGGGACGGTACTTCTGGG CCTCTTCTGCS
SEQ ID NO:11	CAPD	rs169019 79 situado en el cromosom a 8	AATTTAAAATGATACAAAGTTCAAAGTTTAAACAAATACATT TGAAGCCATTTGCAACAAATACATCTGAAGCTAATTGCTGG CTCTAGAAAGTGTGGGGTCTTTGTTGTGGAGCAGTGTAAAT GATTTAGCATTACTTATMTCTGGCAAATGGTATTTTTGAGA TAACATGTTATGGAAGAAAGTGAAGTGAAGTTGGAAGTTTG AAGATCTCGATTGAAGTATCATTCTGCCTCAACTACTTGC ATTA
SEQ ID NO:12	CAPE	rs424238 2 situado en el cromosom a 8	CCATATTTGGGCTATATTAAGTAATAAGCCACATGCTTTC TGTTGAGAAAATACAAAAAGATGTTTCCCTCTGTCATAAAG AAAAAGAGGTAACCCAGGGAACATTTTGTCCCTCTAGTTAT CTTCCRCAGGCCATCAAGAATCAGGCAGTAGGTGAAAAA GAAACACAGAGAACCTAGGAACACAATAGGAAGACCACCAT GGGCCCTTAGGGAGTCAGCGAAGGCTTATGATGCAAAAAGA AGGT
SEQ ID NO:13	CAPF	rs109939 94 situado en el gen MSMB	GGGGACAAGGTAAACACATAACTTGGGTGGAGATGTGATTG ATTAATAACTCATAAATCATCTGAAACCATACTTTCCTTTT GATAGTCAACCCTCTGTAAACACTCAATGTGTTCTCACCTT GTTATCATTTCCAATGAYGTCGAATGCGTGGTTGCCCTCTC CAGTATAAAAGTTTGATGCAGCTTTCCTGGATGTACCTGT CTATAAGGAGTCCTGCTTATCACAATGGTAGGTAAGTGGTT TTAT

SEQ ID NO:14	CAPG	CAPG rs127579 98 situado en el gen RNASEL	TCTTTGCTTCCACTTTAATCTCTTGTCTTTTTATTTTTGT CACACTTCTCCATCCCCTTTTTCCTCCCTCCTCTACGCCTC CCTAAACTTTTTTCTCCTCTTTCTATCCTACTTCACCTCTT CTCTTTTCCCTCATATACTCATACTCCTCTGCATTCCYGCCT TCATATTTCCCCCCTCCCTCCTTTCCCTCAACTTTCTCTCC CCAGTCCCATCTTCTTGTCTTCCTATTGTTGTCACTTTTT TCTC
SEQ ID NO:15	CAPH	rs104595 92 situado en el gen CYP19	CAACATGCCATTGAATCTGTCTTTTCAGCCAGGTTTTGTAA TCCCTTTACTCTCAGAACAGAGTTTCAGGGATGGTAGGTAG TCTGTAGCTGAAGAGGTGTAGGTTGAACAACTTGTAKAGT GAGGAAAGAGTGAGTCATCATTAAATGCATTTTCAGTGGCA GATGACATACTCCAAGGTTTGCCTTTACTTAGACAGGGCCT AGAGTTTCTGTGACTTGCAATGGCTCTCAATCAGACTTGTG CTGG
SEQ ID NO:16	CAPI	rs144729 5 situado en el cromosom a 8	AGACACTATACTAGATGATGGGACAATAAAGGGTAATGAA CAGTTCTGTCTCTATGTAAAAATAATAATGATGATGATGAT GAGATGGGACTTCAATTGAGGAAGTGCCATTGGGGAGGTAT GTAAAAMGTGCTATGGAAAAAAGCAACAGGAACCCCTTGA TAGAAAAAAAATGCTGGTGGGGGTAGGGATTTCTGCCTGT GTTCTTTCAGAATGGGGTATGGGAAAATCTGGGAGGAAAAGA AATT
SEQ ID NO:17	CAPJ	rs698326 7 situado en el cromosom a 8	TCTCAGCTCCCTATCCATAAAACAGAGGGACGAATAAACTC TCCTCCTACCACTAAGAGGTGTAGCCAGAGTTAATACCCTC ATCGTCCTTTGAGCTCAGCAGATGAAAGKCACTGAGAAAAG TACAAAGAATTTTTATGTGCTATTGACTTTATTTTATTTTA TGTGGGGGAGGGAGCCGGCCCCAGCTGGAAAGCTGCTTTCT CTGAATCAAAGGGCAGGAACCCAGCAAGTTTCTCAGGATTG GGGC
SEQ ID	COLA	rs180115	CTCCAATATGTTTTTCAAGATGTAGTTCATTATCATCTTTG

NO:18		5 situado en el gen APC	TCATCAGCTGAAGATGAAATAGGATGTAATCAGACGACACA GGAAGCAGATTCTGCTAATACCCTGCAAATAGCAGAAAWAA AAGAAAAGATTGGAAGTAGGTCAGCTGAAGATCCTGTGAGC GAAGTTCAGCAGTGTACAGCACCCCTAGAACCAAATCCAG CAGACTGCAGGGTTCTAGTTTATCTTCAGAATCAGCCAGGC ACAA
SEQ ID NO:19	COLB	rs355025 31 situado en el gen MLH1	GAGCCAGCACCGCTCTTTGACCTTGCCATGCTTGCCCTTAGA TAGTCCAGAGAGTGGCTGGACAGAGGAAGATGGTCCCAAAG AAGGACTTGCTGAATACATTGTTGAGTTTCTGAAGAAGNGG CTGAGATGCTTGACAGACTATTTCTCTTTGGAAATTGATGAG GTGTGACAGCCATTCTTATACTTCTGTTGTATTCTTCAAAT AAAATTTCCAGCCGGGTGCGGTGGCTCATGGCTGTAATCCC AGCA
SEQ ID NO:20	COLC	rs168927 66 situado en el gen EIF3H	ACATTGCAACTTACCACAATAAAGTAAATATCACAAGATAA ATGACAATGTTGGAATGGAACTACTTAGGGACTCAGAACG GTCAGACGCAAACAGTTTCAAGACTATTMGCTGTTAAAGGT TATGCCTTATGTCACCCAAAAGGGTTTTCCCTAGATTTAT AGCACAACTCATGGAAGATTTATTGCCGTCTTAATTTTTT CCCCAATTTTAACTTTAMGAACAGTCAGCCTGGAATKCCTC CTAA
SEQ ID NO:21	COLD	rs104282 1 situado en el gen MSH6	CCGATCTCCGACGCCCTCCGTTGAGGTTCTTCGCCTTGGGC GGTGACGCGGAGCGCGCCAAGGGCCTGGGCCAGGCCAGC CTCGCTCCAGGCCGCATCCCCGCTGGGGAAGGAGAGGCCY CGGGGGCAGCGCGGCACGCGCCCTTCGCGTGAGGCCCTG GCCGAGGCCTTGTTGGCATCACTCAGCGCCGAGACTTGGG GAAGAAGCTGTACAGGGTGCTCTGTGCGGACATACCGACAG CCGG
SEQ ID NO:22	COLE	rs180113 3 situado	AGGTGGAGGCCAGCCTCTCCTGACTGTCATCCCTATTGGCA GGTTACCCCAAAGGCCACCCCGAAGCAGGGAGCTTTGAGGC TGACCTGAAGCACTTGAAGGAGAAGGTGTCTGCGGGAGYCG

		en el gen MTHFR	ATTCATCATCACGCAGCTTTTCTTTGAGGCTGACACATTC TTCCGCTTTGTGAAGGCATGCACCGACATGGGCATCACTTG CCCCATCGTCCCCGGGATCTTTCCCATCCAGGTGAGGGGCC CAGG
SEQ ID NO:23	COLF	rs360539 93 situado en el gen MUTYH	GAACAGCCTGGGGCCCTTGGGGCCCAAATTCTGCTGGTGCA GAGGCCAACTCAGGTACCTGGATACTGGGCGTGGAGGGCA GTGGCATGAGTAACAAGAGAGAATGGAGGGAATCGGCAGCT GAGGCCTGACCCCTGCCTGGCTGCCCTCCCTCTCAGRTCTG CTGGCAGGACTGTGGGAGTTCCCGTCCGTGACCTGGGAGCC CTCAGAGCAGCTTCAGCGCAAGGCCCTGCTGCAGGAACTAC AGCG
SEQ ID NO:24	COLG	rs346123 42 situado en el gen MUTYH	CTGGAGGTGAGAGCCACCCTAGGGTAGGGGAAATAGGAACA ATAGAGGGACTGACGGGTGATCTCTTTGACCTCTGATCCTA CCCACAGGAGGTGAATCAACTCTGGGCTGGCCTGGGCTRCT ATTCTCGTGGCCGGCGGCTGCAGGAGGGAGCTCGGAAGGTA AGGGGATGGCAGGAGGGTAGGAACCCAGGAGTCTTGGGTGT CTTATAATCTTGAGTCTTGCACTCCAATCAGGTGGTAGAGG AGCT
SEQ ID NO:25	GASA	rs16260 situado en el gen CDH1	AACAAAAGA ACTCAGCCAAGTG TAAAAGCCCTTTCTGATCC CAGGTCTTAGTGAGCCACCGGCGGGGCTGGGATT CGAACCC AGTGAATCAGAACCGTGCAGGTCCCATAACCCACCTAGAC CCTAGCAACTCCAGGCTAGAGGGTCAMCGCGTCTATGCGAG GCCGGTGGGCGGGCCGTCAGCTCCGCCCTGGGGAGGGGTC CGCGCTGCTGATTGGCTGTGGCCGGCAGGTGAACCCTCAGC CAAT
SEQ ID NO:26	GASB	rs114362 7 situado en el gen IL- 1B	ATTAGTCCCCTCCCCTAAGAAGCTTCCACCAATACTCTTTT CCCCTTTCCTTTAACTTGATTGTGAAATCAGGTATTCAACA GAGAAATTTCTCAGCCTCCTACTTCTGCTTTTGAAAGCYAT AAAAACAGCGAGGGAGAAACTGGCAGATACCAAACCTCTTC GAGGCACAAGGCACAACAGGCTGCTCTGGGATTCTCTTCAG CCAATCTTCATTGCTCAAGTATGACTTTAATCTTCCTTACA

			ACTA
SEQ ID NO:27	GASC	rs4073 situado en el gen CXCL8	ATCATGATAGCATCTGTAATTAAGTAAATAATTAT GCCATTAAAAGAAAATCATCCATGATCTTGTCTAACACCT GCCACTCTAGTACTATATCTGTCACATGGTACTATGATAAA GTTATCTAGAAATAAAAAAGCATACAWTTGATAATTCACCA AATTGTGGAGCTTCAGTATTTTAAATGTATATTTAAATTA ATTATTTTAAAGATCAAAGAAAACCTTCGTCATACTCCGTA TTTG
SEQ ID NO:28	GASD	rs498679 0 situado en el gen TLR4	TTCTGGGAGAATTTAGAAATGAAGGAAACTTGGAAAAGTTT GACAAATCTGCTCTAGAGGGCCTGTGCAATTTGACCATTGA AGAATTCCGATTAGCATACTTAGACTACTACCTCGATGRTA TTATTGACTTATTTAATTGTTTGACAAATGTTTCTTCATTT TCCCTGGTGAGTGTGACTATTGAAAGGGTAAAAGACTTTTC TTATAATTTCCGGATGGCAACATTTAGAATTAGTTAACTGTA AATT
SEQ ID NO:29	GASE	rs498679 1 situado en el gen TLR4	CTTCCAACAAAGGTGGGAATGCTTTTTTCAGAAGTTGATCTA CCAAGCCTTGAGTTTCTAGATCTCAGTAGAAATGGCTTGAG TTTCAAAGGTTGCTGTTCTCAAAGTGATTTTGGGACAAAYCA GCCTAAAGTATTTAGATCTGAGCTTCAATGGTGTATTACC ATGAGTTCAAACTTCTTGGGCTTAGAACAACTAGAACATCT GGATTTCCAGCATTCCAATTTGAAACAAATGAGTGAGTTTT CAGT
SEQ ID NO:30	GASG	rs180062 9 situado en el gen TNFA	CTGAAGCCCCTCCAGTTCTAGTTCTATCTTTTTCTCTGCAT CCTGTCTGGAAGTTAGAAGGAAACAGACCACAGACCTGGTC CCCAAAGAAATGGAGGCAATAGTTTTGAGGGGCATGRGG ACGGGGTTCAGCCTCCAGGGTCTACACACAAATCAGTCAG TGGCCCAGAAGACCCCTCGGAATCGGAGCAGGGAGGATG GGGAGTGTGAGGGGTATCCTTGATGCTTGTGTGTCCCCAAC TTTC
SEQ ID	LEUA	rs345497	CAGCTCTACGTCTCCTCCGAGAGCCGCTTCAACACCCTGGC

NO:31		64 situado en el gen ABL1	CGAGTTGGTTCATCATCATTCAACGGTGGCCGACGGGCTCA TCACCACGCTCCATTATCCAGCCCCAAAGCGCAACAAGCCC ACTGTCTATGGTGTGTCCCCAACTACGACAAGTGGGAGAT GGAACGCACGGACATCACCATGAAGCACARGCTGGGCGGGG GCCAGTACGGGGAGGTGTACGAGGGCGTGTGGAAGAAATAC AGCC
SEQ ID NO:32	LEUB	rs708942 4 situado en el gen ARID5B	TTGGAGGTGGAGTTGGCTTTCTTCCCCTGCGTTCATTTGT TACTCAGAGTGGTAGCAGTGTGGTTATAGTTTAGTTKTG TGATGTTTTTTTTCTTGAGTGATGAAGCAATAGTGAGGGCA AAAGCTGATAGTAACATTTTGATACATATTTTGTATTTGT CTATGCCTCTATTTTAAGTGGTTTGCTTTTGAAAACAGCTG GTTCAAACCCTTGGTTTTGGGTTTGAATATTCTTTGTTTT GTTT
SEQ ID NO:33	LEUC	LEUC rs498273 1 situado en el gen ARID5B	AGAGACAGGTACCACGTAAGTACTGAGGCAGCAAAGGGACTCAGT GAGTGTGAGGAGGAGCCTCTTACCCCTCTGGCCCTCAACTG CTTTATCTGTAAAATGTGGCTCACCCCTAYCTTGCTGGTCTG AGGGCAGAGCCCACCAGATGATCTCTTGAGGTCTCTCCAG CACATCTTGAGATCTGCGATTTTACAGAGCCAATTTTGGTT CTACCTCTAAACAATCGTGTGACTCCAGGTAAGTCCCTTCC CCTC
SEQ ID NO:34	LEUD	rs872071 situado en el gen IRF4	TTGAGATCCTGATAGCCTGTTACAGGAATGAAGTAAAGGTC AGTTTTTTTTTGTATTGATTTTACAGCTTTGAGGAACATG CATAAGAAATGTAGCTGAAGTAGAGGGGRCGTGAGAGAAGG GCCAGGCCGGCAGGCCAACCTCCTCCAATGGAAATCCCCG TGTTGCTTCAAAGTGAACAGATGGGACTTAACAGGCAATG GGGTCCACTTCCCCCTTTCAGCATCCCCCGTACCCCACTT TCTG
SEQ ID NO:35	LEUE	rs773754 93 situado en el	ATTCTTTGTACTTTTTTTTTTCTTAGTCTTTCTTTGAAGC AGCAAGTATGATGAGCAAGCTTCTCACAAGCATTGGTTT TAAATTATGGAGTATGTDCTGTGGAGACGAGAGTAAGTAA AACTACAGGCTTTCTAATGCCTTTCTCAGAGCATCTGTTTT

		gen JAK2	TGTTTATATAGAAAATTCAGTTTCAGGATCACAGCTAGGTG TCAGTGTAAGCTATAATTTAACAGGAGTTAAGTATTTTGA AACT
SEQ ID NO:36	LEUF	rs180056 6 situado en el gen NQ01	AACTTCTGTTGTTTATAGTACAACTGCATGGAATTGGTTGA CTTACCTCTCTGTGCTTTCTGTATCCTCAGAGTGGCATTCT GCATTTCTGTGGCTTCCAAGTCTTAGAAYCTCAACTGACAT ATAGCATTGGGCACACTCCAGCAGACGCCCGAATTCAAATC CTGGAAGGATGGAAGAAACGCCTGGAGAATATTTGGGATGA GACACCACTGTATTTTGCTCCAAGCAGCCTCTTTGACCTAA ACTT
SEQ ID NO:37	MAMA	rs180151 6 situado en el gen ATM	TTTTTACTCAAACCTATTGGGTGGATTTGTTTGTATATTCTA GGTGAAAACCTGACTTTTGTGACTGTACTTCCATACTTGA TTCATGATATTTTACTCCAARATACAAATGAATCATGGAGA AATCTGCTTTCTACACATGTTGAGGATTTTTCACCAGCTG TCTTCGACACTTCTCGCAAACGAGCCGATCCACAACCCCTG CAAACCTGGATTGAGGATTTCTATTAAATTTTAAACATTAA TACT
SEQ ID NO:38	MAMB	rs803577 13 situado en el gen BRCA1	AAAGATATATATATATGTTTTTCTAATGTGTTAAAGTTCAT TGGAACAGAAAGAAATGGATTTATCTGCTCTTCGCGTTGAA GAAGTACAAAATGTCATTAATGCTATGCAGAAAATCTTNAG TGTCCCATCTGGTAAGTCAGCACAGAGTGTATTAATTTGG GATTCCTATGATTATCTCCTATGCAAATGAACAGAATTGAC CTTACATACTAGGGAAGAAAAGACATGTCTAGTAAGATTAG GCTA
SEQ ID NO:39	MAMC	rs803593 80 situado en el gen	CTACTAGTTTAGCTTGTGTTGAAATTGTAATAACCTTGGCA TTAGATAATCAAAGAACTGAGCAAGCCTCAGTCAATTAA TACTGTATCTGCACATTTACAGAGTAGTGTAGTTGTTTCTG ATTGTAAAAATAGTCATATAACCCCTNCAGATGTTATTTTC CAAGCAGGATTTTAATTCAAACCATAATTTAACACCTAGCC

		BRCA2	AAAAGGCAGAAATTACAGAACTTTCTACTATATTAGAAGAA TCAG
SEQ ID NO:40	MAMD	rs144848 situado en el gen BRCA2	CATCTGGGCTCCATTTAGACCTGAAAGGGTTAGTTGAGACC ATTCACAGGCCAAAGACGGTACAACCTCCTTGGAGATTTTG TCACTTCCACTCTCAAAGGGCTTCTGATKTGCTACATTTGA ATCTAATGGATCAGTATCATTTGGTTCCACTTCAGATACAA ATGAGTATTTTTCTTTCACTTGGTTTTTAGATTTTTTCACAT TCATCAGCGTTTGCTTCATGGAAAATTTTTTCTAGTCTT GCTA
SEQ ID NO:41	MAME	rs298158 2 situado en el gen FGFR2	TGAAATCTGTCATCAGTAGGGAATATTGGTAGCTGAGTTAT TTTTCGAGTGGTAATCCGAGAATAAAACGGCAGATCCCAGC ACTCATCGCCACTTAATGAACCTGTTTGYGGAGAGTCCACC TGGTGCCTGCCTGGCTTTAGGAACCCGCAGCAGTCCGAGTG GTGTCTGGGGTAAGCTGAGCTGCTCTGGGAACACATCTCGT GCGTGGGGTGAATGAACAGCACACTTACCCAGTGGGGTAGG CTGG
SEQ ID NO:42	MAMF	rs180047 0 situado en el gen TGFB1	CCAAGCCTCCCCTCCACCCTGCGCCCTTCTCCCTGAGGAC CTCAGCTTTCCCTCGAGGCCCTCCTACCTTTTGCCGGGAGA CCCCAGCCCCTGCAGGGGGCGGGCCTCCCCACCACACCAG CCCTGTTGCGGCTCTCGGCAGTGCCGGGGGGCGCCGCTCC CCCATGCCGCCCTCCGGGCTGCGGCTGCTGCBGCTGCTGCT ACCGCTGCTGTGGCTACTGGTGCTGACGCTGGCCGGCCGG CCGC
SEQ ID NO:43	MAMG	rs578021 8 situado en el gen KiSS1	TGCAGTGTGCCTACCTTGCCCTCAGTCCTGGCCTGGGCAGGA GTCTGGCGGAGCCTCTGAGGTGACGAGACCACCTGGCTGGG TGAATGTCCAGAGGTGGGCAGCTGGGCTCCCGGTCTCNAG AGTTCTCCCCAGCTCCCTGATCACATCCCTTTTATAAAGCC CGGGGTGACGTCTCCAAGCACAGGCCCACTTGCCGCCCTT CCCTCCTCCTCAGACCCTCCTGAAGAGCATGGCACCTTGGG AGGC

SEQ ID NO:44	PROA	rs5186 situado en el gen AGT1R	GCTCATCCACCAAGAAGCCTGCACCATGTTTTGAGGTTGAG TGACATGTTCGAAACCTGTCCATAAAGTAATTTTGTGAAAG AAGGAGCAAGAGAACATTCCCTCTGCAGCACTTCACTACCAA ATGAGCMTTAGCTACTTTTCAGAATTGAAGGAGAAAATGCA TTATGTGGACTGAACCGACTTTTCTAAAGCTCTGAACAAAA GCTTTTCTTTCCTTTTGCAACAAGACAAAGCAAAGCCACAT TTTG
SEQ ID NO:45	PROB	rs138213 197 situado en el gen HOXB13	AAACTCAGTGGGGCGGCTGGGGTACTCTTCCCCGGCCGTGG GAGTCTCCGCGGGGTACGCGGCCAGGGTGGCTGCCTGGGCA CAGGGTTTCAGCGAGCTCCGGGACACTCGGCAGGAGTAGTA CCCGCCTYCAAAGTAACCATAAGGCACGGGAGCTGGGGACG TCCCCTGGGGCACCCAGGGCATGGGTGGCATTGCTTTGGC GGCTCCGCCGAGCCTGGCAGATCCAAGGGGGCATAAGTTGAC AGCA
SEQ ID NO:46	PROC	rs928285 8 situado en el gen SRD5A2	CYAGCAGAGCCCAGTGCTGGCAGGCAGCGCCACTTTGGTCG CCCTTGGGGCACTGGCCTTGTACGTCGCGAAGCC TCCGGCTACGGGAAGCACACGGAGAGCCTGAAGCCGGCGGC TACCCGCCTGCCARCCRCGCCGCCTGGTTCCCTGCAGGAGC TGCCTTCCTTCGCGGTGCCCGCGGGGATCCTCGCCCGGCAG CCCCTCTCCCTCTTCGGGCCACCTGGGACGGTACTTCTGGG CCTCTTCTGCS
SEQ ID NO:47	PROD	rs523349 situado en el gen SRD5A2	TTGGCGTTCCCTCGGTGCGCGCTCTACGCTGCGCTCCTGGAC GCCGGGAGCAGGGCAGTGCGCTGCACTGGGCGCCCGCAAGG GAAAAACGCTACCTGTGGAAGTAATGTASGCAGAAGAGGCC CAGAAGTACCGTCCCAGGTGGCCCCGAAGAGGGAGAGGGGCT GCCGGGCGAGGATCCCCGCGGGCACCGCAAGGAAGGCAGC TCCTGCAGGAACCAGGCGGCGGGCTGGCAGGCGGGTAGC CGCC
SEQ ID NO:48	PROE	rs443079 6	CTTTTGAGAAGTTTCCAGTCTGCCTTTCCCTGCCTCCTTCTC CTTCTGAAGAAATTCTCATTGAATACAGAGAGGCAGCACA

		situado en el gen TCF2	GACTGGARATGCTGCATAAAGCTTAAATTGGGCAGGGCCCA AGCGTTGTTGGGTCTTTGGAGACAATGGCTCCTGAGAATTT TTTTAGGCTTTCCAGGAACTACAGAGAGTTGCTTCATGTCA GGAACACAAATTCTTAAAGAGCTAGTCACCAAGTATGGGGG GCCA
SEQ ID NO:49	PROF	rs127579 98 situado en el gen RNASEL	TCTTTGCTTCCACTTTAATCTCTTGTCTTTTTATTTTTTGT CACACTTCTCCATCCCCTTTTCCCTCCCTCCTCTACGCCTC CCTAAACTTTTTTCTCCTCTTTCTATCCTACTTCACCTCTT CTTTTTCCCTCATATACTCATACTCCTCTGCATTCCYGCCT TCATATTTCCCCCTCCCTCCTTTCCCTCAACTTTCTCTCC CCAGTCCCATCTTCTTGTCTTCTCCTATTGTTGTCACTTTTT TCTC
SEQ ID NO:50	PANA	rs505922 situado en el gen ABO	CTGACATGAGACCAACTAAGACAGCATAACCCGTGGGGCAG GACAGACTCCTGGGGTGGCAGCTGTGTTTCATCATCTTGACT GGGTCAAGATGTATCCAGCTGTACCTTTYATGTGCGGTTTA TTGTATACATCCGTTGAAACATATTAAGACAAAAAAGGGAA AACAAAGACCACAAAGGAGGGACAGGGAAGAACCCGGAAGG CGCTGGCAGCACAGGGAGGAGGCAGGTGTTTGCAGTCAGAC CTGA
SEQ ID NO:51	PANB	rs115494 65 situado en el gen CCKBR	TTAGGGCTTCGCTTTGACGGCGACAGTGACAGCGACAGCCA AAGCAGGGTCCGAAACCAAGGCGGGCTGCCAGGTGGGGCTG GACCACGTGAGCAAAATCTGGGVGAGGCGGAGCTTTGGAGG GCGACGGGGCTGCTGGAGTGGGTGGGACTGAAATGAAGGT GAGGGTGAGAAGGAAGCTGAAATGGAGTTGAGCTGGGAGC GGAGGTCAGGTGGGGACTGGGCTGGAGACTGGGGGACTCG CCTT
SEQ ID NO:52	PANC	rs954332 5 situado en el cromosom a 13	CATTCAAAGGAACTCTTTGTGGGCTCAAGGTTGGAGTTGAT AGATTCAGCAAGAATTTTCCCTCTTCAACTTCGTCAGCCC AATCCTCAGTAGGTAAAGTTGTCTTCTTGTCTGATGCACGT GCTGCCCTTGCTGCACYTCTATCACACCTGTGCCTTCTCTA TCATGACACTTAATCTACCGTCCTGTAGATGGGAGTCCTGG CAGGACACAGATAACCTCTTGGAGCAGTACTCTCCATTCTT

			CTAT
SEQ ID NO:53	PAND	rs719045 8 situado en el gen BCAR1	GCAGGAGGTTCGCACAGCAGGTTGCTGTAGTGGGTACCTGG CTGCGCACGTGAGCAGCCTTGGCCTGCCGTGACAGTGTGTC CCCGATGAACACCAGCTTGTGGGCGCTRAGGATGACGAACT TGCTGTGCGCCACAAAGATCTTGGGCGGCTGGTTGGTGGCC ACGGCGGTAAAGAAGGCGTCCACGGCGTTGGTCAGTGTGGT CAGGTTGGCCTCACACTGCTCCAGGTAGAAGAGCAGCAGCT GCCG
SEQ ID NO:54	PULA	rs464690 3 situado en el CYP1A1	TGGGTTTTACTGTAGGGAGGAAGAAGAGGAGGTAGCAGTGA AGAGGTGTAGCCGCTGCACTTAAGCAGTCTGTTTTGAGGGAC AAGACTCTATTTTTTGTAGACAGGGTCCCCAGGTCATCCAGG CTGGAGTGCCTGGTACCATTTTGTTCCTGTAACCTCCA CCTCCYGGGCTCACACGATTCTCCACCTCAGCCTCTGAGT AGTTGGGGCCGCAGGCACACGCCACCACAGCTTTTTTTTTTT TTTT
SEQ ID NO:55	PULB	rs121434 569 situado en el EGFR	GTGTGCCGCCTGCTGGGCATCTGCCTCACCTCCACCGTGCA RCTCATCAYGCAGCTCATGCCCTTCGGCTGCCTCCTGGACT ATGTCCGGGAACACAAAGACAATATTGGCTCCCAGTACCTG CTCAACTGGTGTGTGCAGATCGCAAAGGTAATCAGGGAAGG GAGATACGGGAGGGGAGATAAGGAGCCAGGATCCTCACAT GCGGTCTGCGCTCCTGGGATAGCAAGAGTTTGCCATGGGGA TATG
SEQ ID NO:56	PULC	rs223492 2 situado en el EPHX1	AGCCTGACCGTGCAGGGTCTTCTCTCTCCCTCCACCCTGAC TGTGCTCTGTCCCCCAGGGCTGGACATCCACTTCATCCAC GTGAAGCCCCCCCAGCTGCCCGCAGGCCRTACCCCGAAGCC CTTGCTGATGGTGCACGGCTGGCCCGGCTCTTTCTACGAGT TTTATAAGATCATCCCACTCCTGACTGACCCCAAGAACCAT GGCCTGAGCGATGAGCACGTTTTTGAAGTCATCTGCCCTTC CATC

SEQ ID NO:57	PULD	rs105173 0 situado en el CHRNA3	GTCTACGATAAGGCGAAAATCGATCTGGTCTGATCGGCT CTTCCATGAACCTCAAGGACTATTGGGAGAGCGGCGAGTGG GCCATCATCAAAGCCCCAGGCTAYAAACACGACATCAAGTA CAACTGCTGCGAGGAGATCTACCCCGACATCACATACTCGC TGTACATCCGGCGCCTGCCCTTGTCTACACCATCAACCTC ATCATCCCCTGCCTGCTCATC TCCTTCCTCACTGTGCTCGTCTTC
SEQ ID NO:58	PULE	rs104886 003 situado en el PIK3CA	TATATAAGATATTATTTTATTTTACAGAGTAACAGACTACT AGAGACAATGAATTAAGGGAAAATGACAAAGAACAGCTCAA AGCAATTTCTACACGAGATCCTCTCTCTGAAATCACTRAGC AGGAGAAAGATTTTCTATGGAGTCACAGGTAAGTGCTAAAA TGGAGATTCTCTGTTTCTTTTCTTTATTACAGAAAAATA ACTGAATTTGGCTGATCTCAGCATGTTTTTACCATACCTAT TGG
SEQ ID NO:59	PULF	rs121913 279 situado en el PIK3CA	GAAAGACCCTAGCCTTAGATAAAACTGAGCAAGAGGCTTTG GAGTATTTTCATGAAACAAATGAATGATGCACDTCATGGTGG CTGGACAACAAAATGGATTGGATCTTCCACACAATTAAC AGCATGCATTGAACTGAAAAGATAACTGAGAAAATGAAAGC TCACTCTGGATTCCACACTGCACTGTTAATAACTCTCAGCA GGCAAAGACCGATTGCATAGGAATTGCACAATCCATGAACA GCAT
SEQ ID NO:60	PULG	rs104894 3 situado en el CYP1A1	CCACTTCAGCTGTCTCCCTCTGGTTACAGGAAGCTATGGGT CAACCCATCTGAGTTCCTACCTGAACGGTTTCTCACCCCTG ATGGTGCTATCGACAAGGTGTTAAGTGAGAAGGTGATTATC TTTGGCATGGGCAAGCGGAAGTGTATCGGTGAGACCNTTGC CCGCTGGGAGGTCTTTCTCTTCCCTGGCTATCCTGCTGCAAC GGGTGGAATTCAGCGTGCCACTGGGCGTGAAGGTGGACATG ACCC

SEQ ID NO: 61	GENA situado en el MDM2	rs227974 4	GGAGGGCGGGATTTCCGGACGGCTCTCGCGGGCGGTGGGGGTG GGGGTGGTTCGGAGGTCTCCGCGGGAGTTCAGGGTAAAGGT CACGGGGGCCGGGGGCTGCGGGGCCGCTKCGGCGGGGAGG TCCGGATGATCGCAGGTGCCTGTCCGGTCACTAGTGTGAAC GCTGCGCGTAGTCTGGGCGGGATTGGGCCGGTTCAGTGGGC AGGTTGACTCAGCTTTTCTCTTGAGCTGGTCAAGTTCAGA CACG
SEQ ID NO: 62	GENB situado en el BRAF	rs113488 022	ATTACAGAATTATAGAAATTAGATCTCTTACCTAAACTCTT CATAATGCTTGCTCTGATAGGAAAATGAGATCTACTGTTTT CCTTACTTACTACACCTCAGATATATTTCTTCATGAAGAC CTCACAGTAAAAATAGGTGATTTTGGTCTAGCTACAGWGAA ATCTCGATGGAGTGGGTCCCATCAGTTTGAACAGTTGTCTG GATCCATTTTGTGGATGGTAAGAATTGAGGCTATTTTTCCA CTGA
SEQ ID NO: 63	GEND situado en el TP53	rs121912 664	GCAGTTTCTACTAAATGCATGTTGCTTTTGTACCGTCATAA AGTCAAACAATTGTAACCTGAACCATCTTTTAACTCAGGTA CTGTGTATATACTTACTTCTCCCCCTCCTCTGTTGCTGCAG ATCCGTGGGCGTGAGCNCTTCGAGATGTTCCGAGAGCTGAA TGAGGCCTTGGAACCTCAAGGATGCCAGGCTGGGAAGGAGC CAGGGGGGAGCAGGGCTCACTCCAGGTGAGTGACCTCAGCC CCTT
SEQ ID NO: 64	GENE situado en el ERBB2	rs113620 1	GAATGCCAAACACCTTCATGTCCCCCGTGGGCCCCCTTGT CCCTCCCACCCCAAAGTCCCTCAATCCCTGACCTGGCT TCCGCCCCAGCCCTCTGACGTCCATCRTCTCTGCGGTGGT TGCCATTCTGCTGGTCGTGGTCTTGGGGTGGTCTTTGGGA TCCTCATCAAGCGACGGCAGCAGAAGATCCGGAAGTACACG ATGCGGAGACTGCTGCAGGAAACGGAGGTGAGGCGGGTGA AGTC

SEQ ID NO:65	GENG	rs741765 situado en el STK11	TGCGTAGGAAGTGCAGCAGGACAACCCTGACAGACCCTGCA AGCCAGGGAGCCCCGAGGGTGGGGCTGGGGGAGGCGCAGG GCAGCACTGCCCTCTGGGGTGGGAGTTCRGAGGGTGAACAG GGCCCAGAAGCAGGGTGGAGCTGAGGGACCTGGCAAACCAG GCCCTGCGGGGAGGTCGGCCTCTCCACTCAGTCCTCTCAAT GCCTGCTGGGGTCTCGGGGCCAATAGCCCCCACCTGACAC CCCC
SEQ ID NO:66	GENH	rs121913 529 situado en el KRAS	TTGAAATAATTTTTTCATATAAAGGTGACAGTATTTGATAGT GTATTAACCTTATGTGTGACATGTTCTAATATAGTCACATT TTCATTATTTTTATTATAAGGCCTGCTGAAAATGACTGAAT ATAAACTTGTGGTAGTTGGAGCTGNTGNCGTAGGCAAGAGT GCCTTGACGATACAGCTAATTCAGAATCATTTTTGTGGACGA ATATGATCCAACAATAGAGGTAAATCTTGTTTTAATATGCA TATT
SEQ ID NO:67	GENI	rs112445 441 situado en el KRAS	TAATATGCATATTAACAAGATTTACCTCTATTGTTGGAT CATATTCGTCCACAAAATGATTCTGAATTAGCTGTATCGTC AAGGCACTCTTGCCTACGNCACCAGCTCCAACCTACCACAAG TTTATATTCAGTCATTTTCAGCAGGCCTTATAATAAAAATA ATGAAAATGTGACTATATTAGAACATGTCACACATAAGGTT AATACACTATCAAATACTCCACCAGTACCTTTTAATACAAA CTCA

Tabla 22: Secuencias SNP de susceptibilidad al cáncer

Como se utiliza en la presente, "VPH" se refiere a virus de papiloma humano, virus de ADN de la familia de virus de papiloma humano que incluyen más de 170 tipos o cepas. La infección por VPH se propaga por contacto directo sostenido tal como contacto de piel a piel. La mayoría de infecciones por VPH no provocan síntomas y se resuelven

espontáneamente. Sin embargo, en algunas personas la infección por VPH persiste y puede dar por resultado verrugas o lesiones pre-cancerosas que incrementan el riesgo de varios cánceres incluyendo cánceres cervicales, de vulva, de vagina, de pene, de ano, de boca y garganta. Las cepas de VPH se clasifican dependiendo del riesgo de cáncer genital asociado con la infección por VPH. Como tal, VPH-16, VPH-18, VPH-31 y VPH-45 son los tipos de VPH de riesgo más alto para cánceres genitales, mientras que VPH-33, VPH-35, VPH-39, VPH-51, VPH-52, VPH-56, VPH-58 y VPH-59 se clasifican como tipos de VPH de riesgo alto, y VPH-66, VPH-68 y VPH-73 se clasifican como tipos de VPH probablemente de riesgo alto. Como se utiliza en la presente, "cepas de VPH de riesgo alto" se refiere tanto a tipos de VPH de riesgo más alto como de riesgo alto sin distinción adicional. El VPH-16 también se asocia con el desarrollo de cánceres oro-laringo-faríngeos. Casi todos los casos de cáncer cervical se asocian con una infección por VPH. La Tabla 23 lista el fragmento de L1 de VPH utilizado para identificar los genotipos de cepa.

SEQ ID NO	Nombre de VPH	Cepa VPH	Fragmento de la secuencia de gen LI
SEQ ID NO:68	VPHA	Fragmento de gen L1 de VPH-16	GCTGGTRCTGTTGGTGAAAATGTACCAGACGATTTATAC ATTAAAGGCTCTGGGTCTACTGCAAATTTAGCCAGTTCA AATTATTTTCTACACCTAGTGGTTCTATGGTTACCTCT GATGCCCAAATATTYAATAAACCTTATTGGTTACAACGA GCACAGGGCCACAATAATGGCATTGTTGGGGTAACCAA CTATTTGTTACTGTTGTTGATACTACACGCAGTACAAAT ATGTCATTATGTGCTG
SEQ ID NO:69	VPHB	Fragmento de gen L1 de VPH-18	GTGGGCATCCATTTTATAATAAATTAGATGACACTGAAA GTTCCCATGCCGCYACGTCTAATGTTTCTGAGGACGTTA GGGACAATGTGTCTGTAGATTATAAGCAGACACAGTTAT GTATTTTGGGCTGTGCCCTGCTATTGGGGAACACTGGG CTAAAGGCACTGCTTGTAATCGCGTCCTTTATCACAGG

			GCGATTGCCCCCTTTAGAACTTAAAAACACAGTTTTGG AAGATGGTGATATGGT
SEQ ID NO:70	VPHC	Fragment o de gen L1 de VPH-31	ACACTGAAAACCTAATAGATATGCCGGTGGTCCTGGCA CTGATAATAGGGAATGTATATCRATGGATTATAAACAAA CACARCTGTGTTTACTTGGTTGCAAACCACCTATTGGAG AGCATTGGGGTAARGGTAGTCCTTGTAGTAAAYAATGCTA TTACCCCTGGTGATTGTCCTCCATTAGAATTAARAATW CAGTTATACAAGATGGGGATATGGTTGATACAGGCTTTG GAGCTATGGATTTTAC
SEQ ID NO:71	VPHD	Fragment o de gen L1 de VPH-33	ATGGGCATGTGTAGGCCTTGAAATAGGTAGAGGGCAGCC ATTAGGCCTTGGCATAAGTGGTCATCCTYTATTAACAA ATTTGATGACACTGAAACCRGTAACARGTATCCTGGACA ACCGGGTGCTGATAATAGGGAATGTTTATCCATGGATTA TAAACAAACACAGTTATGTTTACTTGGATGTAAGCCTCC AACAGGGGAACATTGGGGTAAAGGTGTTGCTTGTACTAA TGCAGCACCTGCCAAT
SEQ ID NO:72	VPHE	Fragment o de gen L1 de VPH-35	TAAGGCATGGTGAAGAATATGATTTACAGTTTATTTTTTC AGTTATGTAAAATAACACTAACAGCAGATGTTATGACAT ATATTCATAGTATGAACCCGTCCATTTTAGAGGATTGGA ATTTTGGCCTTACACCACCGCCTTCTGGTACCTTAGAGG ACACATATCGCTATGTAACATCACAGGCTGTAACCTTGTC AAAAACCCAGTGCACCAAACCTAAAGATGATCCATTAA AAAATTATACTTTTTG
SEQ ID NO:73	VPHF	Fragment o de gen L1 de VPH-39	GTGTATTTGCCTCCACCTTCTGTGGCGAAGGTTGTCAAT ACTGATGATTATGTTACACGCAC CAGGCATATATTATTAT GCTGGCAGCT CTAGATTATTAACAGTAGGACATCCATAT TTTAAAGTGGGTATGAATGGTGGTCGCAAGCAGGACATT CCAAAGGTGTCTGCATATCAATATAGGGTATTTTCGCGTG ACATTGCCCGATCCTAATAAATTCAGTATTCCAGATGCA TCCTTATATAATCCAG

SEQ ID NO:74	VPHG	Fragment o de gen L1 de VPH-45	CGTGGCACTGTTAGRTTTAGTAGATTGGGTCAAAGGGCA ACCATGTTTACACGTAGTGGTAAACAAATAGGGGGTAGG GTACATTTTTACCATGATATAAGCCCCATTGCTGCTACA GAGGAAATTGAATTGCAGCCTTTAMTTAGTGTACAGAT GATAGTGACCTGTTTGATGTATATGCAGACTTYCCACCT CCTGCGTCCACTACACCTAGCACTATAAACAAATCATT ACATATCCAAAGTATT
SEQ ID NO:75	VPHH	Fragment o de gen L1 de VPH-51	GAGTGGGTTRGGTATATTTTTGGGTGGCCTAGGTATTGG TACKGGGTCTGGATCTGGGGGGCGTACTGGATATATCCC TTTAGGTGGTGGGGGTGCGCCAGGCGTGGTGGATATTGC TCCTGCAAGGCCACCTATTATAATTGAACCTATAGCACC TACTGAACCTTCTATAGTAAATTTGGTTGAVGACTCTAG TATTATTCAGTCTGGGTCTCCTATACCTACCTTTACTGG TACCGATGGCTTTGAA
SEQ ID NO:76	VPHI	Fragment o de gen L1 de VPH-52	GTACAAAGCAGTGCTTTTTTTCCTACTCCTAGTGGTTCT ATGGTAACCTCAGAATCCCAATTATTTAATAAACCGTAC TGGTTACAACGTGCGCAGGGCCACAATAATGGCATATGT TGGGGCAATCAGTTGTTTGTACAGTTGTGGATAACCACT CGTAGCACTAACATGACTTTATGTGCTGAGGTTAAAAAG GAAAGCACATATAAAAATGAAAATTTTAAGGAATACCTT CGTCATGGCGAGGAAT
SEQ ID NO:77	VPHJ	Fragment o de gen L1 de VPH-56	AAATAATAATGTTATAGAAGATAGTAGGGACAATATATC AGTTGATGGCAAGCAAACACAGTTGTGTATTGTTGGATG TACTCCCGCTATGGGTGAACATTGGACTAAAGGTGCTGT GTGTAAGTCCACACAAGTTACCACAGGGGACTGCCCGCC TCTTGCATTAGTTAATACACCTATAGAGGATGGGGACAT GATAGACACAGGATTTGGCGCTATGGACTTTAAGGTGTT GCAGGAATCTAAGGCT

SEQ ID NO:78	VPHK	Fragment o de gen L1 de VPH-58	TGCGTCGCAGACGTAAACGTTTTCCATATTTTTTTGCAG ATGTCCGTGTGGCGCCTAGTGAGGCCACTGTGTACCTG CCTCCTGTGCCTGTGTCTAAGGTTGTAAGCACTGATGAA TATGTGTCACGCACAAGCATTTATTATTATGCTGGCAGT TCCAGACTTTTGGCTGTTGGCAATCCATATTTTTCCATC AAAAGTCCCAATAACAATAAAAAAGTATTAGTTCCCAAG GTATCAGGCTTACAGT
SEQ ID NO:79	VPHL	Fragment o de gen L1 de VPH-59	TTCCCTAAGGTGTCTGCATATCAATACAGAGTATTTAGGG TTAAKTACCTGATCCYAATAAATTYGGCCTTCCAGATA ACACAGTATATGATCCTAACTCTCAACGCYTGCTCWGGG CCTGTGTAGGTGTTGAAATCGGTGGGGCCAACCTTTAG GGGTAGGACTYAGTGGTCATCCATTMTATAATAAATTRG ATGACACTGAAAACCTCATGTAGCATCTGCTGTTGATA MCAAAGATACACGTGA
SEQ ID NO:80	VPHM	Fragment o de gen L1 de VPH-66	ATATATACAGGGAGCYACATTTGCACTATGGCCTGTATA TTTTTTTAAACGTAGGCGCCGTAAACGTATTCCCTATTK TTTTGTCAGATGGCGATGTGGCGGCCTAGTGACAATAAGG TGTACCTACCTCCAACACCTGTTTCAAAGGTTGTGGCAA CGGATACATATGTAAAACGTACCAGTATATTTTATCATG CAGGTAGCTCTAGGTTGCTTGCTGTTGGCCATCCTTATT ACTCTGTTTCYAAATC
SEQ ID NO:81	VPHN	Fragment o de gen L1 de VPH-68	ATGGCATTGTGGCGMKCTAGCGACAACATGGTGTATTTG CCTCCCCCTCAGTGGCGAAGGTTGTCAATACAGATGAT TAYGTRACACGCACTGGCATKTATTAYTATGCTGGTACA TCTAGGTTATTAAGTGTAGGCCATCCATATTTTAARGTY CCTATGTCTGGGRGCCGYAAGCAGGRCATTCCCTAAGGTG TCTGCATATCAATAYAGRGTGTTMGRRTTWCCYTRCCY GATCCTAATAAATTTA
SEQ ID	VPHO	Fragment	CCTTTTATAATCCTGATAAGGAGCGCCTAGTATGGGCCT

NO:82		o de gen L1 de VPH-16	GTTCTGGTGTGGAGGTTGGACGTGGACAACCCTTAGGTA TAGGTA TAGTGGCAATCCATTTATGAATAAATTRGATG ATACTGAAAATGCTCCTAAATACATTGCTGGACAAAATA CAGATGGTAGAGAATGTATGTCAGTGGATTATAAACAAA CACAGTTGTGTATTTTAGGTTGTAGGCCTCCCTTAGGGG AACATTGGGGTCCAGG
-------	--	-----------------------------	---

Tabla 23: Secuencias de la cepa de VPH

Las infecciones con las cepas de VPH de alto riesgo se han asociado con cánceres. Se ha reportado que VPH-16 y VPH-18 provocan aproximadamente 80% de cánceres cervicales en el mundo, mientras que el 20% restante de cánceres cervicales se asocian predominantemente con otro VPH-31, VPH-33, VPH-45 y VPH-58. Las cepas de VPH de alto riesgo también se han reportado que es asocian con cáncer de próstata. La más común de estas cepas de VPH son VPH-16, VPH-31, VPH-33 y VPH-18 junto con VPH-58. VPH-11 y VPH-6 a un menor grado. La prueba de ADN se h utilizado para la identificación de cepas de VPH. De esta manera, el ADN viral se puede fijar como objetivo en los métodos y kits en la presente para detectar la presencia de serotipos de VPH de alto riesgo.

La infección por VPH también se ha reportado que se asocia con riesgos más altos de desarrollar cánceres no genitales u oro-laringo-faríngeos.

En un aspecto, la identificación del uno o más genes marcadores de susceptibilidad al cáncer es al amplificar una muestra de ADN sin células del sujeto utilizando cebadores para el uno o más genes marcadores de susceptibilidad al cáncer; y detectar el ADN amplificado. En otro aspecto, la amplificación de la muestra de ADN sin células también usa cebadores para el uno o más genotipos de la cepa VPH.

El término "muestra", puede incluir sangre entera, plasma, suero, capa leucocitaria, un fluido corporal, linfocitos, tejido, células cultivadas y similar y, en particular, el término "muestra" puede referirse a muestras
5 de orina, muestra de saliva, muestra de sangre, ADN sin células de sangre y espécimen de o de la piel, membrana mucosa u otra área corporal o superficie que se examina por medio de un hisopo.

Una muestra de orina del paciente se puede recolectar
10 en una tasa de muestra de recolección de orina. La tasa se puede pre-llenar con un líquido adecuado para conservar la muestra de orina. En varias modalidades, el kit puede contener una tasa de muestra de recolección de orina, rellena con un líquido conservador. El líquido
15 conservador puede incluir tales conservadores como ácido clorhídrico, ácido bórico, ácido acético, tolueno o timol.

La muestra de orina, sangre o saliva puede ser una muestra aleatoria recolectada en cualquier momento siguiendo los métodos estándares de recolección.

20 El ADN sin células se puede extraer de la muestra, incluyendo una muestra de orina, o cualquier método conocido en la técnica incluyendo al utilizar solventes orgánicos tal como una mezcla de fenol y cloroformo, o seguido por precipitación con etanol. Entre otros métodos
25 para extraer el ADN sin células, un tal método incluye, por ejemplo, utilizar partículas de sílice recubiertas con polilisisina. Alternativamente, el ADN sin células se puede extraer de la orina utilizando un kit comercialmente disponible tal como, por ejemplo, mini-kit de ADN QIAamp^{MR}
30 (Qiagen, Germantown, MD).

El ADN extraído se amplifica por uno de los métodos alternativos para amplificación de ADN bien conocido en la técnica, que incluye por ejemplo: la tecnología Xmap^{MR} de Luminex que permite el análisis simultáneo de hasta 500

bioensayos a través de la lectura de la prueba biológica sobre la superficie de la cuenta de poliestireno microscópica; la PCR multiplex que permite la amplificación simultánea de varias secuencias de ADN; la amplificación de sonda dependiente de ligación multiplex (MLPA) para la amplificación de múltiples objetivos utilizando un par individual de cebadores; la PCR cuantitativa (qPCR), que mide y cuantifica la amplificación en tiempo real; la reacción en cadena de ligación (LCR) que utiliza cebadores que cubren la secuencia completa para amplificar, previniendo de esta manera la amplificación de las secuencias con una mutación; la amplificación de círculo rodante (RCA), en donde los dos extremos de las secuencia se unen por una ligasa antes de la amplificación del ADN circular; la amplificación dependiente de helicasa (HDA) que depende de una helicasa para la separación del ADN de doble hebra; la amplificación isotérmica mediada por bucle (LAMP) que emplea un ADN polimerasa con actividad de desplazamiento de hebra alta; la amplificación basada en secuencia de ácido nucleico, específicamente diseñada para objetivos de ARN; la amplificación de desplazamiento de hebra (SDA) que depende de un ADN polimerasa de desplazamiento de hebra, para iniciar la replicación en hendiduras creada por una endonucleasa de restricción limitada a hebra, o enzima formadora de hendiduras en un sitio contenido en un cebador; y la amplificación de desplazamiento múltiple (MDA), basada en el uso de la ADN polimerasa de desplazamiento sumamente procesiva y de hebra del bacteriófago Ø29. Los métodos de PCR como se utilizan en la presente se han utilizado en las pruebas de diagnóstico y son bien conocidos en la técnica.

El ADN genómico extraído es por ejemplo amplificar utilizando la reacción de PCR multiplex llevada siguiendo las condiciones detalladas en la Tabla 1.

	Desnaturalización inicial		Desnaturalización		Alineación		Extensión		Extensión Final	
	1 ciclo		40 ciclos						1 ciclo	
	°C	min.	°C	Seg.	°C	Seg.	°C	Seg.	°C	min.
Mama, próstata, pulmón, colon, gástrico, leucemia, páncreas, próstata, cervical	95	5	95	30	61-65	60	72	20	72	5

Tabla 1: Condiciones para la amplificación del ADN genómico por PCR multiplex

Un cebador es una hebra corta de ARN o ADN (en general de aproximadamente 18-22 bases) que sirve como un punto de partida para la síntesis de ADN. Los cebadores se utilizan en los métodos para amplificar ADN. En un aspecto, los

5 cebadores para el uno o más genes marcadores de susceptibilidad al cáncer se diseñan para amplificar genes marcadores de susceptibilidad al cáncer CaCuA, CaCuB, CaCuC, CaCuD, CaCuE, CaCuF, CaCuG, CaCuH, CaCuI, CaCuJ, CaPA, CaPB, CaPC, CaPD, CaPE, CaPF, CaPG, CaPH, CaPI, CaPJ,

10 COLA, COLB, COLC, COLD, COLE, COLF, COLG, GASA, GASB, GASC, GASD, GASE, GASG, LEUA, LEUB, LEUC, LEUD, LEUE, LEUF, MAMA, MAMB, MAMC, MAMD, MAME, MAMF, MAMG, PROA, PROB, PROC, PROD, PROE, PROF, PANA, PANB, PANC, PAND, PULA, PULB, PULC, PULD, PULE, PULF, PULG, GENA, GENB, GEND, GENE, GENG, GENH y/o

15 GENI y/o SEQ ID NOs: 1-67 y los cebadores para el uno o más genotipos de la cepa VPH se diseñan para amplificar VPH-16, VPH-18, VPH-31, VPH-33, VPH-35, VPH-39, VPH-45, VPH-51, VPH-52, VPH-56, VPH-58, VPH-59, VPH-66, VPH-68, VPH-73 y/o SEQ ID NOs:68-82.

Como se utiliza en la presente "ADN amplificado" o "producto de PCR" se refiere a un fragmento amplificado de ADN de tamaño definido. Varias técnica con disponibles y bien conocidas en el campo para detectar productos de PCR.

5 Los métodos de detección de producto de PCR incluyen, pero no se restringen a, electroforesis en gel utilizando gel de agarosa o poliacrilamida y agregando tinción de bromuro de etidio (un intercalante de ADN), sondas etiquetadas (etiquetas radioactivas o no radioactivas, análisis de

10 southern blotting), desoxiribonucleótidos etiquetados (para la incorporación directa de etiqueta radioactivas o no radioactivas) o tinción de plata para la visualización directa de los productos de PCR amplificados; digestión de endonucleasa de restricción, que depende de gel de agarosa

15 o poliacrilamida o cromatografía líquida de alto desempeño (HPLC); tinciones de puntos, que utiliza la hibridación del ADN amplificado en las sondas etiquetadas específicas (etiquetas radioactivas o no radioactivas); cromatografía líquida de alta presión utilizando detección ultravioleta;

20 electroquimioluminiscencia acoplada con reacción química iniciada por voltaje/detección de fotones; y secuenciación directa utilizando desoxiribonucleótidos radioactivos o fluorescentemente etiquetados para la determinación del orden preciso de nucleótidos con un fragmento de ADN de

25 interés, ensayo de oligo-ligación (OLA), PCR, qPCR, secuenciación de ADN, fluorescencia, electroforesis de gel, cuentas magnéticas, extensión de cebador específico de alelo (ASPE) e/o hibridación directa.

Los métodos de ensayo de ligación de oligonucleótidos

30 (OLA) también son bien conocidos en la técnica. Brevemente, este método permite la detección de secuencias objetivo previamente amplificadas por PCR. El método OLA requiere sondas específicas que incluyen una secuencia TAG. La secuencia anti-TAG se acopla a la superficie de una

microesfera magnética para la detección.

Como se utiliza en la presente, una "sonda" o "sonda OLA" se refiere al polinucleótido capaz de hibridarse selectivamente a una secuencia objetivo de ADN amplificado durante el ensayo de ligación de oligonucleótidos. La sonda 5 OLA de la invención incluye una región común, en el extremo de cebador 3, que puede incluir una etiqueta de tinte; una región específica de secuencia que reconoce selectivamente la secuencia objetivo y una etiqueta, en el extremo de 10 cebador 5, para el reconocimiento por las secuencias anti-etiqueta enlazada a las microesferas magnéticas. En ciertos aspectos, las sondas se diseñan para detectar CaCuA, CaCuB, CaCuC, CaCuD, CaCuE, CaCuF, CaCuG, CaCuH, CaCuI, CaCuJ, CaPA, CaPB, CaPC, CaPD, CaPE, CaPF, CaPG, CaPH, CaPI, CaPJ, 15 COLA, COLB, COLC, COLD, COLE, COLF, COLG, GASA, GASB, GASC, GASD, GASE, GASG, LEUA, LEUB, LEUC, LEUD, LEUE, LEUF, MAMA, MAMB, MAMC, MAMD, MAME, MAMF, MAMG, PROA, PROB, PROC, PROD, PROE, PROF, PANA, PANB, PANC, PAND, PULA, PULB, PULC, PULD, PULE, PULF, PULG, GENA, GENB, GEND, GENE, GENG, GENH, GENI, 20 VPH-16, VPH-18, VPH-31, VPH-33, VPH-35, VPH-39, VPH-45, VPH-51, VPH-52, VPH-56, VPH-58, VPH-59, VPH-66, VPH-68 VPH-73 y/o SEQ ID NOs: 1-82.

Los métodos de ensayo y kits en la presente se pueden llevar a cabo en un sistema de multiplexación para lectura 25 de cuentas magnéticas tal como, por ejemplo, MAGPIX^{MR} (Luminex Corp. Madison, WI) o BioCode 2500 Analyzer^{MR} (Applied BioCode, Inc).

En un aspecto adicional, la presente invención proporciona un kit que contiene al menos cebadores para uno 30 o más genes marcadores de susceptibilidad al cáncer; cebadores para uno o más genotipos de cepa del virus de papiloma humano (VPH); e instrucciones para el uso. En un aspecto, el uno o más genes marcadores de susceptibilidad al cáncer son CaCuA, CaCuB, CaCuC, CaCuD, CaCuE, CaCuF,

CaCuG, CaCuH, CaCuI, CaCuJ, CaPA, CaPB, CaPC, CaPD, CaPE, CaPF, CaPG, CaPH, CaPI, CaPJ, COLA, COLB, COLC, COLD, COLE, COLF, COLG, GASA, GASB, GASC, GASD, GASE, GASG, LEUA, LEUB, LEUC, LEUD, LEUE, LEUF, MAMA, MAMB, MAMC, MAMD, MAME, MAMF, 5 MAMG, PROA, PROB, PROC, PROD, PROE, PROF, PANA, PANB, PANC, PAND, PULA, PULB, PULC, PULD, PULE, PULF, PULG, GENA, GENB, GEND, GENE, GENG, GENH y/o GENI; un polimorfismo de nucleótido individual (SNP) situado dentro del gen para IL10, TGF- β 1, CYP1A1, ST3GAL4, IL4, AGTR1, ERBB2, HOXB13, 10 Chr8, MSMB, RNASEL, CYP19, ABO, ABL1, ARID5B, Chr13, CCKBR, JAK2, NQO1, EGFR, EPHX1, CHRNA3, IRF4, PIK3CA, CXCL8, BRCA2, BRCA1, ATM, TCF2, TGFB1, KiSS1, APC, PGR, MTHFR, MUTYH, CDH1, IL1B, IL6, TLR4, TNF- α , MDM2, MLH1, BRAF, TP53, BCAR1, STK11, KRAS, FGFR2, SRD5A2, EIF3H y/o MSH6; 15 y/o SEQ ID NOs: 1-67. En otro aspecto, el uno o más genotipos de la cepa VPH VPH-16, VPH-18, VPH-31, VPH-33, VPH-35, VPH-39, VPH-45, VPH-51, VPH-52, VPH-56, VPH-58, VPH-59, VPH-66, VPH-68 y/o VPH-73. En un aspecto adicional, el kit también contiene sonda para una o más genes 20 marcadores de susceptibilidad al cáncer y/o sondas para uno o más genotipos de la cepa.

Ya que varios cambios se podrían hacer en los métodos y composiciones anteriores sin apartarse del alcance de la invención, se propone que toda la materia contenida en la 25 descripción anterior se debe interpretar como ilustrativa y no en un sentido limitante.

Otras Modalidades

La descripción detallada expuesta en lo anterior se proporciona para ayudar a aquellos expertos en la técnica 30 en practicar la presente invención. Sin embargo, la invención descrita y reclamada en la presente no se va a limitar en alcance por las modalidades específicas en la presente descritas debido a que estas modalidades se proponen como ilustración de varios aspectos de la

invención. Cualquiera de las modalidades equivalentes se proponen para estar dentro del alcance de esta invención. De hecho, varias modificaciones de la invención además de aquellas mostradas y descritas en la presente serán evidentes para aquellos expertos en la técnica a partir de la descripción anterior que no se aparte del espíritu o alcance del presente descubrimiento inventivo. Estas modificaciones también se proponen para estar dentro del alcance de las reivindicaciones adjuntas.

Adicionalmente, en algunas modalidades los métodos pueden incluir adicionalmente un paso de tratamiento. El término "tratamiento" se refiere tanto 1) tratamientos o medidas terapéuticas que curan o desaceleran, reducen los síntomas de, y/o detienen la progresión de unas afecciones o trastornos patológicas diagnosticadas, y 2) y medidas profilácticas/preventivas. Aquellos en necesidad de tratamiento pueden incluir individuos que ya tienen un trastorno médico particular así como aquellos que pueden adquirir finalmente el trastorno (es decir, aquellos que necesitan medidas preventivas).

"Tratamientos contra el cáncer" o "tratamientos anti-cáncer" incluyen cirugía, quimioterapia, terapia de radiación, terapia orientada, inmunoterapia y combinación de las mismas. Los tratamientos anti-cáncer específicos se definen y se administran dependiendo del tipo de cáncer y el estado de la enfermedad. Los tratamientos y combinaciones específicos de cáncer son bien descritos en la técnica.

"Agentes quimioterapéuticos y agentes antineoplásicos" son bien conocidos en la técnica e incluyen: agentes anti-microtúbulos; agentes anti-metabolitos; inhibidores de topoisomerasa; agentes de alquilación; agentes antraciclina; y agentes inhibidores de enzimas.

Se presentan a continuación ejemplos que plantean la

detección simultánea de la infección por VPH y la genotipificación de los marcadores de susceptibilidad al cáncer contemplados para las aplicaciones planteadas. Los siguientes ejemplos se proporcionan para ilustrar 5 adicionalmente las modalidades de la presente invención, pero no se limitan para limitar el alcance de la invención. Aunque son típicos de aquellos que podrían ser utilizados, otros procedimientos, metodologías, o técnicas conocidas por aquellos expertos en la técnica se pueden utilizar 10 alternativamente.

Ejemplos

Ejemplo 1

Obtención de ADN sin células de una muestra

El ADN sin células se extrajo de una muestra que utiliza 15 solventes orgánicos tal como una mezcla de fenol y cloroformo, seguido por precipitación con etanol. El ADN sin células también se puede obtener utilizando partículas de sílice recubiertas con polilisina. Alternativamente, el ADN sin células se puede extraer de la muestra utilizando 20 un kit comercialmente disponible tal como, por ejemplo, minikit de ADN QIAamp^{MR} (Qiagen, Germantown, MD). La muestra de ADN debe tener una alta pureza, es decir superior a 1.6 (260/280 nm) y su funcionalidad debe haber sido corroborada por la amplificación de una muestra de 25 referencia general y con 100 ng de ADN de una reacción de PCR multiplex.

Ejemplo 2

Preparación de la muestra y evaluación de cebadores para detectar SNPs de riesgo CaCu

30 La muestras de ADN sin células de ADN sintético o aislado de M1, *C. lupus familiaris*, *E. coli* y virus de inmunodeficiencia humano (VIH) se obtuvieron y se prepararon para una concentración final de 50 ng/ μ L. Cada análisis debe incluir un control negativo (agua), un

control positivo - tipo natural (WT), un control positivo mutante (MT) y un control positivo heterocigoto (HET).

Preparación de las mezclas de controles sintéticos para tipo natural (WT) y mutante (MT) para la amplificación por PCR de punto final de alto riesgo a CaCu. Las mezclas de ADN WT y MT de control sintético de oligonucleótido para cáncer cervical (CaCu) SNPs CaCuA, CaCuB, CaCuC, CaCuD, CaCuE, CaCuF, CaCuG, CaCuH, y CaCuJ se prepararon a una concentración de 30 μM de la concentración de solución madre de 200 μM . Una dilución secuencial se llevó a cabo hasta que una concentración final de 0.03 μM se alcanzó para cada uno de los controles sintéticos de SNPs A-J CaCu WT y MT.

Preparación de la mezcla de controles sintéticos heterólogos (HET). Se prepararon controles sintéticos HET al colocar 5 μL de la mezcla de controles sintéticos WT en 0.03 μM y 5 μL de la mezcla de controles sintéticos MT a 0.03 μM del panel CaCu en un tubo de polipropileno de 0.2mL.

Preparación de los oligonucleótidos de sentido (L1) e inversos (L2). Separadamente, los oligonucleótidos de sentido (L1) e inverso (L2) se diluyeron a 100 μM de CaCu SNPs A-J de la solución madre en una concentración de 200 μM .

Preparación de la mezcla de oligonucleótidos y PCR de punto final de Mezcla Maestra. El volumen de cada oligonucleótido de sentido (L1) e inverso (L2), como se indica en la Tabla 2, se colocaron en un tubo. Al tubo que contiene los oligonucleótidos de sentido e inversos 15 μL de PCR de punto final 2X de Mezcla Maestra (Thermo Scientific) se agregó como se describe en la Tabla 3. La mezcla se homogenizó con una pipeta y el volumen se ajustó para el número de reacciones requeridas por la amplificación por PCR del panel CaCu de 5 muestras, más una

reacción extra (como se describe en la Tabla 4). La Mezcla Maestra se agregó a la mezcla de oligonucleótidos para la amplificación de PCR de punto final para el panel de 8 oligonucleótidos CaCu para el análisis de 5 muestras, más una reacción extra, como se indica en la Tabla 5.

Marcador	Alícuota	C _{Final} (µM)
CACUA	L1 y L2	0.5
CACUB	L1 y L2	0.5
CACUC	L1 y L2	0.2
CACUD	L1 y L2	0.4
CACUF	L1 y L2	0.2
CACUG	L1 y L2	0.2
CACUH	L1 y L2	0.3
CACUJ	L1 y L2	0.5
Volumen Total de L1 y L2		
Volumen de Reacción Final		

Tabla 2. Volumen de los oligonucleótidos de sentido (L1) e inversos (L2) requeridos para la mezcla de reacción de PCR del disposición CaCu

Reactivo	C Inicial	C Final	Volumen 1 rxn (µL)
Mezcla maestra	2X	1.5X	15
Volumen de Reacción Final			20 µL

10 Tabla 3. Volumen de la mezcla maestra agregada a la mezcla de oligonucleótidos para la mezcla de reacción de PCR del disposición CaCu.

Marcador	Alícuota	C _{Inicial} (µM)	C _{Final} (µM)	Volumen 1 rxn (µL)	Volumen 6 rxn (µL)
CACUA	L1 y L2	100	0.5	0.10	0.60
CACUB	L1 y L2	100	0.5	0.10	0.60

CACUC	L1 y L2	100	0.2	0.04	0.24
CACUD	L1 y L2	100	0.4	0.08	0.48
CACUF	L1 y L2	100	0.2	0.04	0.24
CACUG	L1 y L2	100	0.2	0.04	0.24
CACUH	L1 y L2	100	0.3	0.06	0.36
CACUJ	L1 y L2	100	0.5	0.10	0.60
Volumen Total de L1 y L2				1.12 μ L	6.72 μ L (3.36 μ L de L1 y L2)
Volumen de Reacción Final				20 μ L	120 μ L

Tabla 4: Volumen de oligonucleótidos de sentido (L1) e inversos (L2)

Reactivo	C Inicial	C Final	Volumen rxn (μ L)	Volumen rxn (μ L)
Mezcla maestra	2X	1.5X	15	90
Volumen de Reacción Final			20 μ L	120 μ L

Tabla 5. Volumen agregado de Mezcla Maestra

Preparación de la mezcla de reacción de PCR. La Tabla 6 indica que el número de muestras de reacción de PCR fue dependiente de la cantidad total de la muestra de ARN que se analizaron. Incluyeron 4 controles por ensayo de PCR del panel de CaCu de 8 oligonucleótidos. Las mezclas de

reacción se prepararon en tubos de polipropileno en el siguiente orden: agua, Mezcla maestra + oligonucleótidos (L1 y L2), y ADN de las muestras o de los controles sintéticos. La amplificación por PCR se llevó a cabo utilizando condiciones estándares. Los productos de PCR se analizaron por electroforesis. Lo productos de PCR se pueden analizar adicionalmente por tecnología multiplex o secuenciación.

Tubo de reacción	C Inicial	C Final	Volumen de muestra (μL)	Volumen de H ₂ O (μL)	Volumen de Mezcla maestra + Oligonucleótidos (μL)
Control negativo	---	---	---	3.88	16.12
Control sintético WT	0.03 μM	0.003 μM	2	1.88	16.12
Control sintético MT	0.03 μM	0.003 μM	2	1.88	16.12
Control sintético HET	0.03 μM	0.003 μM	2	1.88	16.12
ADN de muestra biológica	50 ng/μL	100 ng	2*	1.88	16.12

Tabla 6 componentes de cada tubo de reacción de PCR para la amplificación del panel CaCu en ADN tomado de muestras de orina y sangre. *El volumen indicado se mide comenzando con una muestra de ADN a 50 ng/μL de concentración inicial. En caso de que la muestra presente en una concentración menor, el volumen se debe ajustar a 100 ng para la reacción de PCR.

Los productos de PCR se evaluaron por electroforesis. Alternativamente, las secuencias objetivo se pueden identificar por qPCR utilizando las sondas SYBR^{MR} Green o TaqMan^{MR} etiquetadas con diferentes fluoróforos como se ilustra en las FIGURAS 11 y 12.

Para la detección y amplificación de los SNPs asociados con el riesgo de cáncer cervical, se utilizaron 8 pares de oligonucleótidos específicos para cada sitio de interés. Los oligos de inicio flanquearon el sitio de interés en los genes o en las secuencias importantes de la regulación de los genes (es decir IL10, TGF-B1, CYP1A1, ST3GAL4 e IL4). Los oligos de inicio tuvieron una complementariedad con su secuencia objetivo de 80%, 90% y 100%. Los oligonucleótidos "cebadores" diseñados para los SNPs en riesgo para cáncer cervical tuvieron un intervalo de temperatura de alineación (Tm) entre 62°C y 64°C. Los oligonucleótidos "cebadores" para la detección de SNPs de riesgo de cáncer cervical tuvieron un intervalo de concentración entre 0.2 µM y 0.5 µM (Tabla 7).

Pane	Cebadores (intervalo de concentración en µM)	OLA (intervalo de concentración en µM)	Sonda reportera OLA (intervalo de concentración en µM)
CaCu	0.2 - 0.5	0.1 - 0.5	4 - 6

Tabla 7. Condiciones de cebadores de oligonucleótidos, OLA y sonda reportera OLA

Las FIGURAS 1A-1E muestran que los oligonucleótidos "cebadores" diseñados para la identificación de los SNPs de riesgo para cáncer cervical no tuvieron reactividad cruzada con otro ADN genómico diferente al H. sapiens. Específicamente, la FIGURA 1A muestra la detección de SNPs A-J de riesgo CaCu utilizando controles sintéticos (CS WT, CS MT y CS HET). La FIGURA 1B muestra la detección de SNPs A-J de riesgo CaCu utilizando ADN aislado de un control biológico M1. Las FIGURAS 1C-1E muestran que el SNPs A-J de riesgo CaCu no se detectaron en el ADN aislado de *C. lupus familiaris*, *Escherichia coli*, o el virus de Inmunodeficiencia Humano (VIH) (p<0.00001). Las barras representan la Media ± Desviación Estándar 1 de 4

replicados. El valor P representa la diferencia estadísticamente significativa de los valores MFI registrados en cada prueba con respecto a los valores MFI registrados en la gráfica A y en la gráfica B, 5 determinado por la prueba de Kruskal-Wallis ($\alpha = 0.05$). PC = 296.08 MFI (n = 60, 95% CI).

Los productos de PCR se analizaron para determinar la especificidad intra-ensayo de las sondas CaCu para la detección de SNPs A-J de riesgo CaCu. Las FIGURAS 2A-2B 10 ilustran la especificidad de intra-ensayo en la detección de SNPs A-J de riesgo CaCu utilizando el control biológico M1. La FIGURA 2A muestra la detección de los SNPs A-J de riesgo CaCu utilizando sondas CaCu específicas. La FIGURA 2B muestra la falta de detección de SNPs A-J de riesgo CaCu 15 utilizando sondas específicas para la detección de VPH. Las barras representan la Media \pm Desviación Estándar 1 de 4 replicados, el valor de P representa la diferencia estadísticamente significativa entre los valores registrados en la FIGURA 2B con respecto a los valores MFI 20 registrados en la FIGURA 2A, determinado por la prueba de Kruskal-Wallis ($\alpha = 0.05$), PC = 296.08 MFI (n = 64, 95% CI).

Como se ilustra en la FIGURA 3, las secuencias objetivo de SNP de susceptibilidad al cáncer que contiene 25 ADN se detectaron en las muestras de sangre y orina. Los resultados de las amplificaciones de PCR de CaCuH mostraron que ambas muestras de orina (U) y sangre (B), fueron adecuadas para la extracción de ADN y genotipificación de estos marcadores, con los productos de PCR equivalentes a 30 aquellos obtenidos con ya sea un control positivo (WT, marcador de tipo natural), un ADN de control que comprende el marcador mutante (MT), o ADN extraído de una línea de células que presentó el SNP (CL).

Estos análisis mostraron que las muestras de sangre y

orina fueron adecuadas para la genotipificación de los marcadores de susceptibilidad al cáncer y que la amplificación de ADN combinada con un OLA detectaron los marcadores de susceptibilidad al cáncer en un paciente y de esta manera establecieron si el paciente presenta un riesgo de susceptibilidad de desarrollar el cáncer correspondiente.

Ejemplo 3

Evaluación de la reactividad cruzada de los cebadores para detectar SNPs de riesgo CaP

El análisis de los cebadores para detectar los polimorfismos de riesgo de cáncer de próstata se llevó a cabo similarmente como es describe en el Ejemplo 3. Se utilizaron diez pares de oligonucleótidos "cebadores" específicos para cada sitio de interés. Los oligos de inicio flanquearon el sitio de interés en los genes o en las secuencias importantes de la regulación de los genes (es decir AGTR1, HOXB13, SRD5A2, Chr8, MSMB, RNASEL y CYP19). El oligo "iniciadores" diseñados para los SNPs de riesgo al cáncer de próstata tuvieron complementariedad con su secuencia objetivo de 80%, 90% y 100%. Los oligonucleótidos "cebadores" para SNPs en riesgo de cáncer de próstata tuvieron un intervalo de temperatura de alineación (Tm) entre 63°C y 65°C. Los oligonucleótidos "cebadores" para SNPs en riesgo de cáncer de próstata tuvieron un intervalo de concentraciones entre 0.3 µM y 0.5 µM (Tabla 8).

Panel	Cebadores (intervalo de concentración en µM)	OLA (intervalo de concentración en µM)	Sonda reportera OLA (intervalo de concentración en µM)
CaP	0.3 - 0.5	0.1 - 0.4	4-6

Tabla 8. Condiciones de oligonucleótidos cebadores, OLA y

sonda reportera OLA

Como se ilustra en las FIGURAS 4A-4E, los cebadores utilizados para la detección de SNPs (CaP) A-J de riesgo de cáncer de próstata fueron adecuados para esta detección en los controles sintéticos (FIGURA 4A) y en el ADN aislado de un control biológico (FIGURA 4B). Sin embargo, no hubo detección de los SNPs de riesgo CaP cuando los cebadores se utilizaron en el ADN aislado de *C. lupus familiaris* (FIGURA 4C, $p < 0.0001$), *E. coli* (FIGURA 4D, $p < 0.0001$) o VIH (FIGURA 4E, $p < 0.0001$). Las barras representan la Desviación Estándar Media ± 1 de 4 replicados, el valor P representa la diferencia estadísticamente significativa de los valores MFI y registrados en cada ensayo con respecto a los valores MFI y registrados en la FIGURA 4A y en la FIGURA 4B, $PC = 402.90$ MFI ($n = 80$, 95% CI).

Los oligonucleótidos "cebadores" diseñados para la identificación de SNPs de riesgo para cáncer de próstata no reaccionaron de manera cruzada con otro ADN genómico (FIGURAS 4A-4E).

Como se ilustra en las FIGURAS 5A-5B, los oligonucleótidos "cebadores" diseñados para la identificación de los SNPs de cáncer de próstata no fueron reactivos de manera cruzada con las "sondas reporteras OLA" específicas de VPH (FIGURAS 5A-5B). La FIGURA 5A muestra la detección de SNPs A-J de riesgo CaP utilizando sondas CaP específicas. La FIGURA 5B muestra la no detección de los SNPs A-J de riesgo CaP utilizando sondas específicas para la detección de VPH. Las barras representan la Desactivación Estándar Media ± 1 de 4 replicados, el valor de P representa la diferencia estadísticamente significativa entre los valores MFI registrados en la gráfica B con respecto a los valores MFI registrados en la FIGURA 5A, determinado por la prueba Kruskal-Wallis ($\alpha = 0.05$), $PC = 264.35$ MFI ($n = 80$, 95% CI).

Ejemplo 4**Preparación de la muestra y evaluación de productos de PCR
SNPs de riesgo CaP**

La preparación de la muestra de ADN, mezclas de control
5 sintético WT, MT, y HET y oligonucleótidos de sentido (L1)
e inverso (L2) de la detección de SNPs de cáncer de
próstata (CaP) CaPA, CaPB, CaPC, CaPD, CaPE, CaPF, CaPG,
CaPH, CaPI y CaPJ se prepararon como se describe
previamente para los SNPs de riesgo CaCu.

10 Preparación de la mezcla de oligonucleótidos y Mezcla
Maestra de punto final de PCR. El volumen de cada
oligonucleótido de sentido (L1) e inverso (L2) se colocó en
un nuevo tubo de propileno y estéril como se indica en la
Tabla 9. Como se ilustra en la Tabla 10, 15 μ L de Mezcla
15 Maestra 2X de punto final de PCR (Thermo Scientific) se
agregó. Como se describe y como se indica a continuación, 5
muestras se analizaron (1 muestra de ADN y 4 controles;
negativo, WT, MT y HET) más una reacción extra (ver Tabla
11). La mezcla maestra se agregó a la mezcla de
20 oligonucleótido para la amplificación de punto final de PCR
del disposición de 10-oligonucleótidos de SNPs CaP como se
describe en la Tabla 12.

Marcado r	Alícuota	C Inicial (μ M)	C Final (μ M)	Volumen 1 rxn (μ L)
CAPE	L1 y L2	100	0.3	0.06
CAPH	L1 y L2	100	0.3	0.06
CAPJ	L1 y L2	100	0.3	0.06
CAPA	L1 y L2	100	0.4	0.08
CAPC	L1 y L2	100	0.4	0.08
CAPI	L1 y L2	100	0.4	0.08
CAPG	L1 y L2	100	0.5	0.10
CAPB	L1 y L2	100	0.5	0.10
CAPD	L1 y L2	100	0.5	0.10
CAPF	L1 y L2	100	0.5	0.10

Volumen total de L1 y L2	1.64 μ L (0.82 μ L L1 y L2)
Volumen total de la reacción	20 μ L

Tabla 9. Volumen de oligonucleótidos de sentido (L1) e inversos (L2) requeridos para la mezcla de reacción de PCR 10-plex del disposición CaP.

Reactivo	C _{Inicial}	C _{Final}	Volumen rxn (μ L)
Mezcla Maestra	2X	1.5X	15
Volumen de reacción final			20 μ L

Tabla 10. Volumen de la mezcla maestra agregada a la mezcla de oligonucleótidos para la mezcla de reacción de 10 oligonucleótidos PCR del disposición CaP

Marcador	Alícuota	C _{Inicial} (μ M)	C _{Final} (μ M)	Volumen 1 rxn (μ L)	Volumen 6 rxn (μ L)
CAPE	L1 y L2	100	0.3	0.06	0.36
CAPH	L1 y L2	100	0.3	0.06	0.36
CAPJ	L1 y L2	100	0.3	0.06	0.36
CAPA	L1 y L2	100	0.4	0.08	0.48
CAPC	L1 y L2	100	0.4	0.08	0.48
CAPI	L1 y L2	100	0.4	0.08	0.48
CAPG	L1 y L2	100	0.5	0.10	0.60
CAPB	L1 y L2	100	0.5	0.10	0.60

CAPD	L1 y L2	100	0.5	0.10	0.60
CAPF	L1 y L2	100	0.5	0.10	0.60
Volumen total de L1 y L2				1.64 μL	9.84 μL (4.92 μL L1 y L2)
Volumen de reacción final				20 μL	120 μL

Tabla 11. Volumen de oligonucleótidos de sentido (L1) e inversos (L2) requeridos para la amplificación por PCR del panel de 10 oligonucleótidos de CaP de 5 muestras más una reacción extra

Reactivo	C _{Inici} al	C _{Fin} al	Volumen 1 rxn (μL)	Volumen 6 rxn (μL)
Mezcla Maestra	2X	1.5 X	15	90
Volumen de reacción final			20 μL	120 μL

Tabla 12: Volumen de la mezcla maestra

Preparación de la mezcla de reacción de PCR. Los componentes de la reacción de PCR se agregaron en el siguiente orden: agua, Mezcla Maestra + oligonucleótidos (L1 y L2), y el último, el ADN de las muestras o controles sintéticos (ver Tabla 13). La PCR se llevó a cabo utilizando condiciones estándares. Los productos de PCR se analizaron por electroforesis y se pueden analizar adicionalmente por tecnología multiplex o secuenciación.

Tubo de Reacción	C _{Inicial}	C _{Final}	Volumen de Muestra (μL)	Volumen de H ₂ O (μL)	Volumen de Mezcla Maestra+ Oligonucle ótidos (μL)

Control Negativo	---	---	---	3.36	16.64
Control Sintético WT	0.03 μM	0.003 μM	2	1.36	16.64
Control Sintético MT	0.03 μM	0.003 μM	2	1.36	16.64
Control Sintético HET	0.03 μM	0.003 μM	2	1.36	16.64
ADN de muestra biológica	50 ng/ μL	100 ng	2*	1.36	16.64
Volumen de reacción final : 20 μL					

Tabla 13. Los componentes de cada tubo de reacción de PCR para la amplificación del panel de 10 oligonucleótidos de CaP en muestras de ADN de orina y sangre.* El volumen indicado se toma de la muestra de ADN que está en una concentración inicial de 50 ng/ μL . En el caso que la muestra presente una baja concentración, el volumen se debe ajustar a 100ng para la reacción de PCR.

Como se ilustra en la FIGURA 6, los SNPs de susceptibilidad al cáncer se detectaron en ambas muestras de sangre y orina. Los resultados de las amplificaciones de PCR de CaPG, CaPD y CaPH (marcadores de susceptibilidad al cáncer de próstata) muestran que las muestras tanto de orina (U) como de sangre (B), fueron adecuadas para la extracción de ADN y de genotipificación de tales marcadores, con los productos de PCR equivalentes aquellos obtenidos con ya sea un control positivo (WT, marcador de tipo natural), un ADN de control que comprende el marcador mutante (MT), o ADN extraído de una línea de células que presentó el SNP (CL).

Se determinó que las muestras de sangre y orina fueron adecuadas para la genotipificación de los marcadores de susceptibilidad al cáncer y que la amplificación de ADN combinada con un OLA detectó los marcadores de susceptibilidad al cáncer en un paciente y estableció de

esta manera si el paciente presentó riesgo de susceptibilidad a desarrollar el cáncer correspondiente.

Ejemplo 5

Análisis de PCR de virus de papiloma humano de alto riesgo

5 Los oligonucleótidos "cebadores" para la identificación de los tipos de alto riesgo de VPH no reaccionan de manera cruzada con otro ADN genómico diferente al VPH (FIGURAS 7A-7E).

La detección y amplificación de cada uno de los tipos de alto riesgo de VPH se determinó al utilizar los oligonucleótidos "cebadores" específicos diseñados para cada tipo de VPH de alto riesgo, que contienen secuencias de nucleótidos complementarios a la región de interés dentro del gen VPH L1. Los cebadores se diseñaron para amplificar SEQ ID NOs:67-82. Los oligos de inicio flaquearon la región específica de cada tipo de VPH en el gen L1. Los oligonucleótidos "cebadores" diseñados para la detección de los 15 tipos de VPH de alto riesgo tuvieron complementariedad con su secuencia objetivo de 80%, 90% y 100%. Los oligonucleótidos "cebador" degenerados se diseñaron para detectar los subtipos de VPH de interés. Los oligonucleótidos "cebadores" para los 15 tipos de VPH tuvieron un intervalo de Temperatura de Alineación (Tm) entre 61°C y 63°C. Los oligonucleótidos "cebadores" tuvieron un intervalo de concentración entre 0.4 µM y 0.6 µM (Tabla 14).

Panel	Cebadores (intervalo de concentración en µM)	OLA (intervalo de concentración en µM)	Sonda reportera OLA (intervalo de concentración en µM)
VPH	0.3 - 0.6	0.1-0.4	4-6

Tabla 14. Condiciones de oligonucleótido cebadores, OLA y sonda reportera OLA.

Como se ilustra en las FIGURAS 7A-7E, los cebadores utilizados para la detección de picos de alto riesgo de VPH fueron adecuados para tal detección en los controles sintéticos (FIGURA 7A) y en el ADN aislado de un control biológico (FIGURA 7B). Sin embargo, no hubo detección cuando los cebadores se utilizaron en el ADN aislado de *C. lupus familiaris* (FIGURA 7C, $p < 0.0001$), *E. coli* (FIGURA 7D, $p < 0.0001$) o VIH (FIGURA 7E, $p < 0.0001$). Las barras representan la Media \pm Desviación Estándar 1 de 4 replicados, el valor P representa la diferencia estadísticamente significativa de los valores MFI registrados en cada prueba con respecto a los valores MFI registrados en los controles sintéticos y en los controles biológicos determinados por la prueba de Kruskal-Wallis ($\alpha = 0.05$), PC = 359.38 MFI (n = 60, 95% CI).

Los oligonucleótidos "cebadores" diseñados para la identificación de tipos de alto riesgo de VPH no designaron de manera cruzada con otro ADN genómico (FIGURAS 7A-7E).

Como se ilustra en las FIGURAS 8A-8C, los oligonucleótidos "cebadores" diseñados para la identificación de los 15 tipos de VPH de alto riesgo no reaccionaron de manera cruzada con las "sondas reporteras OLA" específicas para cáncer cervical (FIGURA 8B) y cáncer de próstata (FIGURA 8C). Las barras representan la Media \pm Desviación Estándar 1 de 4 replicados, el valor de P representan la diferencia estadísticamente significativa entre los valores MFI registrados en la gráfica B con respecto a los valores MFI registrados en la FIGURA 5A, determinado por la prueba de Kruskal-Wallis ($\alpha = 0.05$), PC = 440.47 MFI (n = 60, 95% CI).

Para la preparación de la muestra de ADN, las mezclas de los controles de VPH sintéticos (identificados como A, B, C, D, E, F, G, H, I, J, K, L, M, N, O), y los oligonucleótidos de sentido (L1) e inversos (L2) CaPA,

CaPB, CaPC, CaPD, CaPE, CaPF, CaPG, CaPH, CaPI y CaPJ, se prepararon como se describe previamente para los SNPs de riesgo CaCu. De los 200 μM de solución madre de los controles VPH sintéticos se preparó una alícuota en una concentración final de 30 μM y de esta concentración se hicieron diluciones secuenciales para obtener una concentración final que sería 0.003 μM . Para preparar la mezcla de los controles sintéticos utilizados en el sistema multiplex de panel VPH 1 μL de la dilución 0.003 μM de cada control sintético se agregó en un tubo para obtener un volumen final de 15 μL . La concentración final de la mezcla de controles sintéticos fue 0.0002 μM .

Preparación de la mezcla de oligonucleótido y punto final de PCR de Mezcla Maestra. El volumen de cada oligonucleótido de sentido (L1) e inverso (L2) como se indica en la Tabla 15 se agregó en un tubo. 15 μL de punto final PCR 2X Mezcla Maestra (ThermoScientific) se agregó al tubo que contiene los oligonucleótidos de sentido e inversos y se homogenizó.

Preparación de la mezcla de reacción por PCR. Para este caso 4 reacciones y 1 reacción extra se llevaron a cabo, considerando un control negativo, control sintético: es decir una mezcla de secuencia sintética es idéntica a la región parcial de cada uno de los tipos VPH identificados, muestra de ADN de una muestra biológica A y la muestra de ADN de una muestra biológica B. La cantidad necesaria de la mezcla maestra se colocó en un tubo de 0.6 ml estéril, para 5 reacciones (como se detalla en la Tabla 16). Para llevar a cabo la amplificación por punto final de PCR del panel VPH en el formato 15-Plex, los oligonucleótidos L1 y L2 deben estar disponibles. La Tabla 16 describe las concentraciones y volúmenes para 5 reacciones, como en la Tabla 17. Las mezclas de reacción se prepararon en tubos al agregar los componentes de la reacción de PCR en el

siguiente orden: agua, mezcla de Mezcla Maestra + oligonucleótidos (L1 y L2), y finalmente el ADN de las muestras de los controles sintéticos (Tabla 18). Se lleva a cabo la amplificación por PCR bajo condiciones estándares.

- 5 Los productos de PCR se analizaron por electroforesis. Una vez que los productos de interés se habían verificado se procedió al análisis utilizando la plataforma Luminex.

Como se ilustra en las FIGURAS 9A-9B, las secuencias objetivo de VPH ADN viral se detectó por PCR multiplex. Los resultados de la amplificación por PCR de VPHA y VPHB muestran que el ADN extraído de una línea de células conocida por contener el virus correspondiente (CL) fue una muestra adecuada para la detección de la infección por VPH, con los productos de PCR equivalentes a aquellos obtenidos con ya sea un control positivo sintético (C+1), o indica el ADN viral (C+2). Al detectar la presencia del ADN viral de una o más de las cepas de VPH probadas en una muestra recolectadas de un paciente, una amplificación de ADN combinada con un OLA detectó la infección por VPH en un paciente y de esta manera estableció si el paciente presentó un riesgo de susceptibilidad al desarrollar el cáncer correspondiente.

Marcador	Alícuota	C Inicial (μM)	C Final (μM)	Vol. lrxn (μL)
VPHA	L1 y L2	200	0.5	0.05
VPHB	L1 y L2	200	0.4	0.04
VPHC	L1 y L2	200	0.6	0.06
VPHD	L1 y L2	200	0.4	0.04
VPHE	L1 y L2	200	0.4	0.04
VPHF	L1 y L2	200	0.5	0.05
VPHG	L1 y L2	200	0.5	0.05
VPHH	L1 y L2	200	0.5	0.05
VPHI	L1 y L2	200	0.5	0.05
VPHJ	L1 y L2	200	0.4	0.04
VPHK	L1 y L2	200	0.4	0.04

VPHL	L1 y L2	200	0.6	0.06
VPHM	L1 y L2	200	0.5	0.05
VPHN	L1 y L2	200	0.5	0.05
VPHO	L1 y L2	200	0.4	0.04
Volumen Final de L1 y L2				1.42 μ L (0.71 μ L de L1 y L2)
Volumen de reacción final				20 μ L
Tabla 15. Volumen de los oligonucleótidos de sentido (L1) e inverso (L2) requeridos para los oligonucleótidos de panel de 15 VPH de amplificación por PCR para una reacción.				

Reactivo	C Inicial (μ M)	Cfinal (μ M)	Vol. 1rxn (μ L)	Vol. 5 rxn (μ L)
Mezcla Maestra	2X	1.5X	15	75
Volumen final			20	100

Tabla 16

16. Volumen de la Mezcla maestra requerida para 5 reacciones.

10 Tabla 17. Volumen de oligonucleótidos de sentido (L1) e inversos (L2) requeridos para la amplificación por PCR de panel de oligonucleótidos de 15 VPH, 1 reacción.

Marcador	Alícuota	C _{Inic} (μ M)	C _{Final} (μ M)	Vol. 1rx (μ L)	Vol. 5rx (μ L)
VPHA	L1 y L2	200	0.5	0.05	0.25
VPHB	L1 y L2	200	0.4	0.04	0.2
VPHC	L1 y L2	200	0.6	0.06	0.3
VPHD	L1 y L2	200	0.4	0.04	0.2

	L2					
VPHE	L1 y L2	200	0.4	0.04	0.2	
VPHF	L1 y L2	200	0.5	0.05	0.25	
VPHG	L1 y L2	200	0.5	0.05	0.25	
VPHH	L1 y L2	200	0.5	0.05	0.25	
VPHI	L1 y L2	200	0.5	0.05	0.25	
VPHJ	L1 y L2	200	0.4	0.04	0.2	
VPHK	L1 y L2	200	0.4	0.04	0.2	
VPHL	L1 y L2	200	0.6	0.06	0.3	
VPHM	L1 y L2	200	0.5	0.05	0.25	
VPHN	L1 y L2	200	0.5	0.05	0.25	
VPHO	L1 y L2	200	0.4	0.04	0.2	
Volumen de L1 y L2				1.42 μ L (0.71 μ L de L1 y L2)	7.1 μ L (3.55 μ L de L1 y L2)	
Volumen de reacción final				20 μ L	100 μ L	

Oligonucleótidos 15 VPH de panel, reacción 1

Tubo de Reacción	C _{Inicial}	C _{Final}	Volumen de	Volumen de H ₂ O	Volumen de Mezcla
------------------	----------------------	--------------------	------------	-----------------------------	-------------------

			Muestra (μ L)	(μ L)	Maestra+ oligonucle ótidos (μ L)
Control Negativo	---	---	---	3.58	16.42
Control sintético	0.0002 μ M	0.000 02 μ M	2	1.58	16.42
ADN de la muestra biológica A	50 ng/ μ L	100 ng	2*	1.58	16.42
ADN de la muestra biológica B	50 ng/ μ L	100 ng	2*	1.58	16.42
Volumen de reacción final: 20 μ L					

Tabla 18. Componentes de cada tubo de reacción de PCR para oligonucleótidos de 15 VPH de amplificación de panel en las muestras de ADN de las muestras biológicas. *El volumen
5 indicado se toma de una muestra de ADN que está en una concentración inicial de 50 ng/ μ L.

Ejemplo 6

Amplificación por PCR de punto final en el formato multiplex de SNPs asociado con el riesgo de cualquier tipo de cáncer.
10

Las muestras de ADN se prepararon de la misma manera como en los ejemplos previos, sin embargo, para la detección y amplificación de SNP asociado con el riesgo de cualquier tipo de cáncer y de 7 tipos diferentes de cáncer
15 (incluyendo cáncer de mama, próstata, colon, leucemia, pulmón, gástrico y páncreas), 41 pares de oligonucleótidos "cebador" específicos para cada sitio de interés se utilizaron. Los oligos "iniciadores" flanquearon el sitio de interés en los genes o en las secuencias importantes de

la regulación de los genes (es decir IL10, TGF- β 1, CYP1A1, ST3GAL4, IL4, AGTR1, ERBB2, HOXB13, Chr8, MSMB, RNASEL, CYP19, ABO, ABL1, ARID5B, Chr13, CCKBR, JAK2, NQO1, EGFR, EPHX1, CHRNA3, IRF4, PIK3CA, CXCL8, BRCA2, BRCA1, ATM, 5 TCF2, TGFB1, KiSS1, APC, PGR, MTHFR, MUTYH, CDH1, IL1B, IL6, TLR4, TNF- α , MDM2, MLH1, BRAF, TP53, BCAR1, STK11, KRAS, FGFR2, SRD5A2, EIF3H y/o MSH6). Los oligos "iniciadores" para los SNPs de riesgo a cáncer tuvieron complementariedad con su secuencia blanca de 80%, 90% y 10 100%. Los oligonucleótidos "cebadores" para los SNPs de riesgo de cáncer tuvieron un intervalo de Temperatura de Alineación (Tm) entre 62°C y 65°C como se describe previamente. Los oligonucleótidos "cebadores" para SNPs en riesgo de cáncer tuvieron un intervalo de concentración 15 entre 0.2 μ M y 0.5 μ M.

La FIGURA 10 muestra la identificación de 20 polimorfismos de riesgo de cáncer utilizando los controles sintéticos por la prueba GanPlex MR (Panel A). La gráfica muestra los valores MFI registrados en cada uno de los polimorfismos de riesgo de cáncer cuando se utilizaron los 20 controles sintéticos de tipo natural (CS WT), Mutantes (MT) y Heterocigotos (HET). La barras representan el Promedio \pm 1 D.E. de 2 réplicas.

La FIGURA 11 muestra la identificación de 22 25 polimorfismos de riesgo de cáncer utilizando controles sintéticos por la prueba GanPlex MR (Panel B). La gráfica muestra los valores MFI registrados en cada uno de los polimorfismos de riesgo de cáncer cuando se utilizaron los controles sintéticos de tipo natural (CS WT), Mutantes (MT) 30 y Heterocigotos (HET). Las barras representan el Promedio \pm 1 D.E. de 2 réplicas.

Ejemplo 7

Análisis ola de los productos de PCR

Después de la PCR multiplex, cada muestra se sometió a una

reacción OLA, donde una alícuota de producto de PCR se utilizó a través de la reacción OLA.

Para la reacción de ligación. De los productos de PCR obtenidos en los ejemplos previamente descritos se sometió a reacciones de ligación. La mezcla de reacción se llevó a cabo de las alícuotas que estuvieron en una concentración de 10 μM con una concentración final de cada 20? O 22?; 3 μl de marcadores se agregaron y el volumen se ajustó a 20 μL (mezcla de sonda OLA). La mezcla de sonda OLA se preparó en una concentración final de 5 μM en 20 μL . La mezcla OLA-2X se preparó considerando que cada uno de los componentes debe tener la siguiente concentración final: Solución amortiguadora de ligasa 2X μM , Taq ADN ligasa 1 U μM , Mezcla de OLA-TAG 0.015 μM y Sonda OLA a 0.5 μM , en 18 μL . La mezcla OLA 2X debería tener una concentración final de 1 (?), y la reacción de ligación se llevó a cabo como se describe en la Tabla 19.

Ensayo de hibridación. Después de la reacción de ligación se llevó a cabo una prueba de hibridación utilizando el formato de "distribución TAG". Las cuenta se asignaron a cada marcador y se volvieron a suspender en una solución amortiguadora 1X T_m . Las mezclas de microesferas se prepararon para cada panel (40 esferas). Siete reacciones por panel se llevaron a cabo: C. -, C. WT, C. MT, C. HT, ADN de saliva, ADN de sangre y fondo, de acuerdo con la tabla 20: las mezclas de microesferas para la hibridación múltiple se prepararon con la siguiente concentración final de cada uno de los siguientes componentes: microesferas WT 1000 microesferas/ μL , microesfera WT 1000 microesferas/ μL y solución amortiguadora T_m 1X y se mezclaron nuevamente por vórtice durante 30 segundos. Colocar 22.5 μL de la mezcla de microesferas por pocillo en una placa de fondo en V. 2.5 μL de producto enlazado a agua, se agregaron, como sea

apropiado. La placa después se cubrió con una película y la hibridación se llevó a cabo en un ciclador térmico, como en la Tabla 20.

Fabricación de microsferas y lectura en el equipo
 5 Magpix. Conjugado de estreptavidina, R-Ficoeritrina (SAPE) se preparó en una concentración final de 2 µg / mL en solución amortiguadora Tm 1X como se indica en la Tabla 21. Una vez que la hibridación se completó se colocó en la placa de 96 pocillos en la placa magnética. El sobrenadante
 10 se removió y se enjuagó dos veces con 100µl de solución amortiguadora Tm 1X. La placa se colocó, la placa de 96 pocillos en la placa de metal negro y 75 µL de la muestra se agregó SAPE a 2 µg/mL a cada pocillo. La placa se incubó durante 15 minutos a 37°C en la oscuridad y las muestras se
 15 analizaron.

Analizar en el equipo MagPix, 50 µL de muestra a 37°C

Temperatura (°C)	Tiempo	Ciclo
96 °C	2 min.	1
94 °C	15 seg.	30
58 °C	1 min	
4 °C	∞	----

Tabla 19. Condiciones de termociclado para la reacción de Ligación Multiplex

Temperatura (°C)	Tiempo	Ciclo
96 °C	90 seg.	1
37 °C	30 min	
37 °C	∞	----

20 Tabla 20. Condiciones de termociclado para la hibridación multiplex

Reactivo	C. Inicial (µg /mL)	C. Final (µg/mL)	V.1rxn (µL)	V.16 rxn (µL)
SAPE	600	2	0.25	4

Solución Amortiguadora Tm	1X	1X	74.75	1,196
		Vol. Final	110	1,200

Tabla 21. Preparación de la solución amortiguadora Tm, para la lectura de 7 muestras en duplicado.

Ejemplo 8

5 Evaluación de la susceptibilidad al cáncer

El riesgo o susceptibilidad al cáncer de un sujeto a desarrollar cáncer se determina por la identificación y detección simultánea tanto de infección por VPH como genotipificación de SNP de susceptibilidad al cáncer.

10 Para la genotipificación de SNPs de susceptibilidad al cáncer, alelos de tipo natural y mutantes se discriminaron al evaluar la diferencia de fluorescencia en un ensayo de discriminación alélica. Las cuentas coloreadas se utilizaron para llevar a cabo el análisis. Las cuentas
 15 incluyeron dos tintes donde A) una longitud de onda de excitación permite la observación de dos longitudes de onda de emisión de fluorescencia separadas, B) producir aproximadamente 100 conjuntos de cuentas únicas, en este caso se utilizaron 50 conjuntos de cuentas diferentes, cada
 20 conjunto de cuentas se puede poner en contacto con una molécula de captura de ácido nucleico (antifigura 10-TAG) específico para un objetivo biológico particular en este caso podría ser SNPs o diferentes tipos de VPH. Este objetivo si se clausura por el ácido nucleico unido a la
 25 superficie de las cuentas en marca con SAPE (Ficoeritrina) si no en la muestra los investigadores no observarán SAPE en ese conjunto de cuentas. La diferencia de cada objetivo se hace por los conjuntos de cuentas. La identificación de cada objetivo se hace por Ficoeritrina (lo mismo en cada
 30 objetivo).

fluorescencia para identificar que el objetivo esté en la muestra, el parámetro es 5 veces sobre el fondo para considerar un positivo (mismo en VPH como en SNPs). Por otra parte, aproximadamente SNPs, los inventores encontrarán siempre un objetivo que signifique que siempre habrá un positivo, podrá ser WT, MT o HT, pero para discriminar y determinar si son WT, MT o HT los inventores usan la llamada alélica, que se calcula por proporciones de fluorescencia. Significa que más del 100% de la fluorescencia si la proporción de la fluorescencia total es de aproximadamente 70% para el objetivo WT y 25% del objetivo MT se establece como una muestra de WT o participante, la misma cosa para el MT. Pero si la proporción es 50/50 ambos objetivos están presentes y se considera como un HT. Las proporciones podrían ser 75/25, 80/20, 90/10 aún 70/30 depende de cada objetivo para los Homocigotos. Para HT podría ser 50/50, o aún 64/40 en algunos casos.

Como se ilustra en la FIGURA 12, utilizando un control de tipo natural sintético (WT), un control mutante sintético (MT) y un control heterocigoto sintético (WT/MT), al graficar el porcentaje de fluorescencia asociado con el alelo de tipo natural (WT) en el eje X, la fluorescencia asociada con un alelo mutante (MT) en el eje Y, el ensayo de discriminación alélica permite determinar las áreas de fluorescencia: un área mutante, un área WT y un área heterocigota que discrimina las muestras basadas en el genotipo de SNPs de susceptibilidad al cáncer. Una muestra se considera WT cuando la fluorescencia del tinte asociado con el alelo, está entre 25 y 100% y la fluorescencia del tinte está asociado con el alelo mutante es menor que 25%. Una muestra se considera mutante cuando la fluorescencia del tinte asociado con el alelo WT es menor que 25% y la fluorescencia del tinte asociado con el alelo mutante es

entre 25 y 100%. Una muestra se considera heterocigota cuando la fluorescencia del tinte asociado con el alelo WT es entre 25 y 100% y la fluorescencia del tinte asociado con el alelo mutante es entre 25 y 100%. Si tanto la
5 fluorescencia del tinte asociado con el alelo WT como la fluorescencia del tinte asociado con el alelo mutante son menores que 25% la muestra se considera no etiquetada y se puede explotar adicionalmente.

Al utilizar el VPH ADN viral, y graficar el porcentaje
10 de fluorescencia asociado con el VPH ADN, los ensayos permiten determinar un intervalo de fluorescencia que discrimina las muestras basadas en la presencia o ausencia del ADN viral. El intervalo de fluorescencia es diferente en cada análisis VPH, la fluorescencia de fondo es de
15 aproximadamente 200-300 MFI. El intervalo de fluorescencia para discriminar entre positivos al panel VPH es de aproximadamente 1500-7000 MFI.

Al definir las áreas de fluorescencia MT, WT y heterocigotas, y la presencia de VPH ADN en una muestra, el
20 ensayo de discriminación alélica se combina con el ensayo de determinación de infección por VPH que permite determinar si una muestra presenta un polimorfismo de susceptibilidad al cáncer y/o una infección VPH. La combinación de ambos ensayos de esta manera se utiliza para
25 determinar si un paciente presenta un riesgo o una susceptibilidad de desarrollar el cáncer correspondiente.

Los ejemplos específicos se muestran en las FIGURAS 20A-20V y 21A-21E. Las muestras obtenidas de los sujetos que tienen cáncer de colon y mama. Se obtuvo ADN sin
30 células de las muestras como se describe en lo anterior y el ADN se sometió a amplificación para los genes marcadores de susceptibilidad al cáncer de colon y mama y la detección de los genes marcadores con sondas específicas como se describe previamente. Los datos se analizaron y los

resultados se muestran en las FIGURAS 20A-20V y 21A-21E.

Aunque la invención se ha descrito con referencia a los ejemplos anteriores, se entenderá que las modificaciones y variaciones son abarcadas dentro del espíritu y alcance de la invención. Por consiguiente, la
5 invención se limita solo por las siguientes reivindicaciones.

NOVEDAD DE LA INVENCION

Habiendo descrito la presente invención, se considera como
novedad, y por lo tanto se reclama como propiedad lo
5 contenido en las siguientes:

10

15

20

25

30

REIVINDICACIONES

1. Un método para evaluar la susceptibilidad al cáncer en un sujeto, caracterizado porque comprende
5 identificar simultáneamente uno o más genes marcadores de susceptibilidad al cáncer y una o más cepas de genotipo de virus de papiloma humano (VPH), evaluando de esta manera la susceptibilidad al cáncer en el sujeto.

2. El método de conformidad con la reivindicación 1,
10 caracterizado porque la identificación del uno o más genes marcadores de susceptibilidad al cáncer comprende:

a) amplificar una muestra de ADN sin células de sujeto utilizando cebadores para el uno o más genes marcadores de susceptibilidad al cáncer; y

15 b) detectar el ADN amplificado.

3. El método de conformidad con la reivindicación 2, caracterizado además porque comprende amplificar la muestra de ADN sin células utilizando cebadores para el uno o más genotipos de la cepa VPH.

20 4. El método de conformidad con la reivindicación 1, caracterizado porque el cáncer se selecciona del grupo que consiste de cáncer cervical, de próstata, de colon, pancreático, de mama, de pulmón, leucemia y gástrico.

5. El método de conformidad con la reivindicación 1,
25 caracterizado porque el uno o más genes marcadores de susceptibilidad al cáncer se selecciona del grupo que consiste de CaCuA, CaCuB, CaCuC, CaCuD, CaCuE, CaCuF, CaCuG, CaCuH, CaCuI, CaCuJ, CaPA, CaPB, CaPC, CaPD, CaPE, CaPF, CaPG, CaPH, CaPI, CaPJ, COLA, COLB, COLC, COLD, COLE,
30 COLF, COLG, GASA, GASB, GASC, GASD, GASE, GASG, LEUA, LEUB, LEUC, LEUD, LEUE, LEUF, MAMA, MAMB, MAMC, MAMD, MAME, MAMF, MAMG, PROA, PROB, PROC, PROD, PROE, PROF, PANA, PANB, PANC, PAND, PULA, PULB, PULC, PULD, PULE, PULF, PULG, GENA, GENB, GEND, GENE, GENG, GENH y/o GENI.

6. El método de conformidad con la reivindicación 1, caracterizado porque el uno o más genes marcadores de susceptibilidad al cáncer es un polimorfismo de nucleótido individual (SNP) situado dentro del gen que codifica para
5 IL10, TGF- β 1, CYP1A1, ST3GAL4, IL4, AGTR1, ERBB2, HOXB13, Chr8, MSMB, RNASEL, CYP19, ABO, ABL1, ARID5B, Chr13, CCKBR, JAK2, NQO1, EGFR, EPHX1, CHRNA3, IRF4, PIK3CA, CXCL8, BRCA2, BRCA1, ATM, TCF2, TGFB1, KiSS1, APC, PGR, MTHFR, MUTYH, CDH1, IL1B, IL6, TLR4, TNF- α , MDM2, MLH1, BRAF,
10 TP53, BCAR1, STK11, KRAS, FGFR2, SRD5A2, EIF3H y/o MSH6.

7. El método de conformidad con la reivindicación 1, caracterizado porque el uno o más genes marcadores de susceptibilidad al cáncer se selecciona del grupo que consiste de SEQ ID NOs:1-67.

15 8. El método de conformidad con la reivindicación 1, caracterizado porque en el uno o más genotipo de la cepa VPH se selecciona del grupo que consiste de VPH-16, VPH-18, VPH-31, VPH-33, VPH-35, VPH-39, VPH-45, VPH-51, VPH-52, VPH-56, VPH-58, VPH-59, VPH-66, VPH-68 y/o VPH-73.

20 9. El método de conformidad con la reivindicación 7, caracterizado porque el uno o más genotipo de la cepa VPH es una cepa de genotipo VPH de alto riesgo.

10. El método de conformidad con la reivindicación 9, caracterizado porque la cepa VPH de alto riesgo es VPH-16,
25 VPH-18, VPH-31, VPH-45 y/o VPH-58.

11. El método de conformidad con la reivindicación 2, caracterizado porque los cebadores para el uno o más genes marcadores de susceptibilidad al cáncer se diseñan para amplificar CaCuA, CaCuB, CaCuC, CaCuD, CaCuE, CaCuF, CaCuG,
30 CaCuH, CaCuI, CaCuJ, CaPA, CaPB, CaPC, CaPD, CaPE, CaPF, CaPG, CaPH, CaPI, CaPJ, COLA, COLB, COLC, COLD, COLE, COLF, COLG, GASA, GASB, GASC, GASD, GASE, GASG, LEUA, LEUB, LEUC, LEUD, LEUE, LEUF, MAMA, MAMB, MAMC, MAMD, MAME, MAMF, MAMG, PROA, PROB, PROC, PROD, PROE, PROF, PANA, PANB, PANC, PAND,

PULA, PULB, PULC, PULD, PULE, PULF, PULG, GENA, GENB, GEND, GENE, GENG, GENH, GENI y/o SEQ ID NOs:1-67.

12. El método de conformidad con la reivindicación 3, caracterizado porque los cebadores para el uno o más
5 genotipos de la cepa VPH se diseñan para amplificar VPHA, VPHB, VPHC, HPCD, VPHE, VPHF, VPHG, VPHI, VPHJ, VPHK, VPHL, VPHM, VPHN, VPHO y/o SEQ ID NOs:68-82.

13. El método de conformidad con la reivindicación 2, caracterizado porque la detección del ADN amplificado se
10 lleva a cabo por el ensayo de oligo ligación (OLA), PCR, qPCR, secuenciación de ADN, fluorescencia, electroforesis en gel, cuentas magnéticas, extensión de cebador específico de alelo (ASPE) e/o hibridación directa.

14. El método de conformidad con la reivindicación
15 13, caracterizado porque el OLA utiliza sondas para el uno o más genes marcadores de susceptibilidad al cáncer.

15. El método de conformidad con la reivindicación 14, caracterizado además porque comprende utilizar sondas para uno o más genotipos de la cepa VPH.

20 16. El método de conformidad con la reivindicación 14 o 15, caracterizado porque las sondas se diseñan para enlazarse a SEQ ID NOs:1-82.

17. El método de conformidad con la reivindicación 2, caracterizado porque la muestra es una muestra de sangre u
25 orina.

18. Un método, caracterizado porque comprende:

a) amplificar una muestra de ADN sin células de un sujeto utilizando cebadores para uno o más genes marcadores de susceptibilidad al cáncer y para uno o más genotipos de
30 la cepa de virus de papiloma humano (VPH); y

b) detectar el ADN amplificado.

19. El método de conformidad con la reivindicación 18, caracterizado porque el uno o más de genes marcadores de susceptibilidad al cáncer es un marcador para cáncer

cervical, de próstata, de colon, pancreático, gástrico, de pulmón, leucemia y/o mama.

20. El método de conformidad con la reivindicación 18, caracterizado porque el uno o más genes marcadores de susceptibilidad al cáncer se selecciona del grupo que
5 consiste de CaCuA, CaCuB, CaCuC, CaCuD, CaCuE, CaCuF, CaCuG, CaCuH, CaCuI, CaCuJ, CaPA, CaPB, CaPC, CaPD, CaPE, CaPF, CaPG, CaPH, CaPI, CaPJ, COLA, COLB, COLC, COLD, COLE, COLF, COLG, GASA, GASB, GASC, GASD, GASE, GASG, LEUA, LEUB,
10 LEUC, LEUD, LEUE, LEUF, MAMA, MAMB, MAMC, MAMD, MAME, MAMF, MAMG, PROA, PROB, PROC, PROD, PROE, PROF, PANA, PANB, PANC, PAND, PULA, PULB, PULC, PULD, PULE, PULF, PULG, GENA, GENB, GEND, GENE, GENG, GENH y/o GENI; un polimorfismo de nucleótido individual (SNP) situado dentro del gen que
15 codifica para IL10, TGF- β 1, CYP1A1, ST3GAL4, IL4, AGTR1, ERBB2, HOXB13, Chr8, MSMB, RNASEL, CYP19, ABO, ABL1, ARID5B, Chr13, CCKBR, JAK2, NQO1, EGFR, EPHX1, CHRNA3, IRF4, PIK3CA, CXCL8, BRCA2, BRCA1, ATM, TCF2, TGFB1, KiSS1, APC, PGR, MTHFR, MUTYH, CDH1, IL1B, IL6, TLR4, TNF- α , MDM2,
20 MLH1, BRAF, TP53, BCAR1, STK11, KRAS, FGFR2, SRD5A2, EIF3H y/o MSH6; y/o SEQ ID NOS: 1-67.

21. El método de conformidad con la reivindicación 15, caracterizado porque el uno o más genotipos de la cepa VPH se seleccionan del grupo que consiste de VPH-16, VPH-
25 18, VPH-31, VPH-33, VPH-35, VPH-39, VPH-45, VPH-51, VPH-52, VPH-56, VPH-58, VPH-59, VPH-66, VPH-68 y/o VPH-73.

22. El método de conformidad con la reivindicación 18, caracterizado porque la detección del ADN amplificado se lleva a cabo por el ensayo de oligo ligación (OLA), PCR, secuenciación de ADN, fluorescencia, electroforesis en gel,
30 cuentas magnéticas, extensión de cebador específico de alelo (ASPE) e/o hibridación directa.

23. El método de conformidad con la reivindicación 22, caracterizado porque la PCR es qPCR.

24. El método de conformidad con la reivindicación 18, caracterizado porque la muestra es una muestra de sangre u orina.

25. Un kit, caracterizado porque comprende:

- 5 a) cebadores para uno o más genes marcadores de susceptibilidad al cáncer;
- b) cebadores para uno o más genotipos de la cepa del virus del papiloma humano (VPH); y
- c) instrucciones para el uso.

10 26. El kit de conformidad con la reivindicación 25, caracterizado porque los cebadores para uno o más genes marcadores de susceptibilidad al cáncer se selecciona del grupo que consiste de CaCuA, CaCuB, CaCuC, CaCuD, CaCuE, CaCuF, CaCuG, CaCuH, CaCuI, CaCuJ, CaPA, CaPB, CaPC, CaPD,
15 CaPE, CaPF, CaPG, CaPH, CaPI, CaPJ, COLA, COLB, COLC, COLD, COLE, COLF, COLG, GASA, GASB, GASC, GASD, GASE, GASG, LEUA, LEUB, LEUC, LEUD, LEUE, LEUF, MAMA, MAMB, MAMC, MAMD, MAME, MAMF, MAMG, PROA, PROB, PROC, PROD, PROE, PROF, PANA, PANB, PANC, PAND, PULA, PULB, PULC, PULD, PULE, PULF, PULG, GENA,
20 GENB, GEND, GENE, GENG, GENH y/o GENI, y/o SEQ ID NOs: 1-67.

27. El kit de conformidad con la reivindicación 25, caracterizado porque los cebadores para uno o más genotipos de la cepa VPH se selecciona del grupo que consiste de VPH-
25 16, VPH-18, VPH-31, VPH-33, VPH-35, VPH-39, VPH-45, VPH-51, VPH-52, VPH-56, VPH-58, VPH-59, VPH-66, VPH-68 y/o VPH-73.

28. El kit de conformidad con la reivindicación 25, caracterizado además porque comprende sondas para el uno o más genes marcadores de susceptibilidad al cáncer.

30 29. El kit de conformidad con la reivindicación 25, caracterizado además porque comprende utilizar sondas para el uno o más genotipos de la cepa VPH.

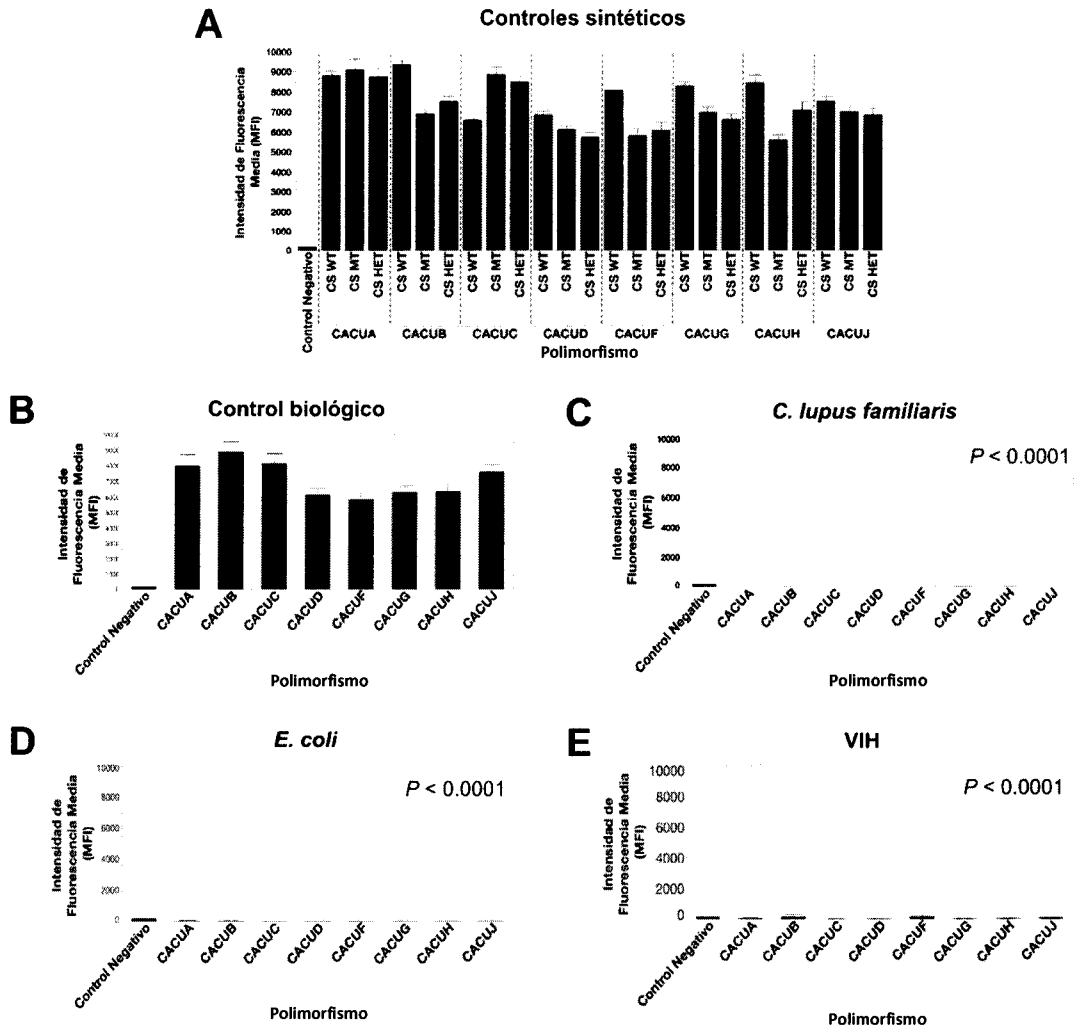


FIGURA 1A-E.

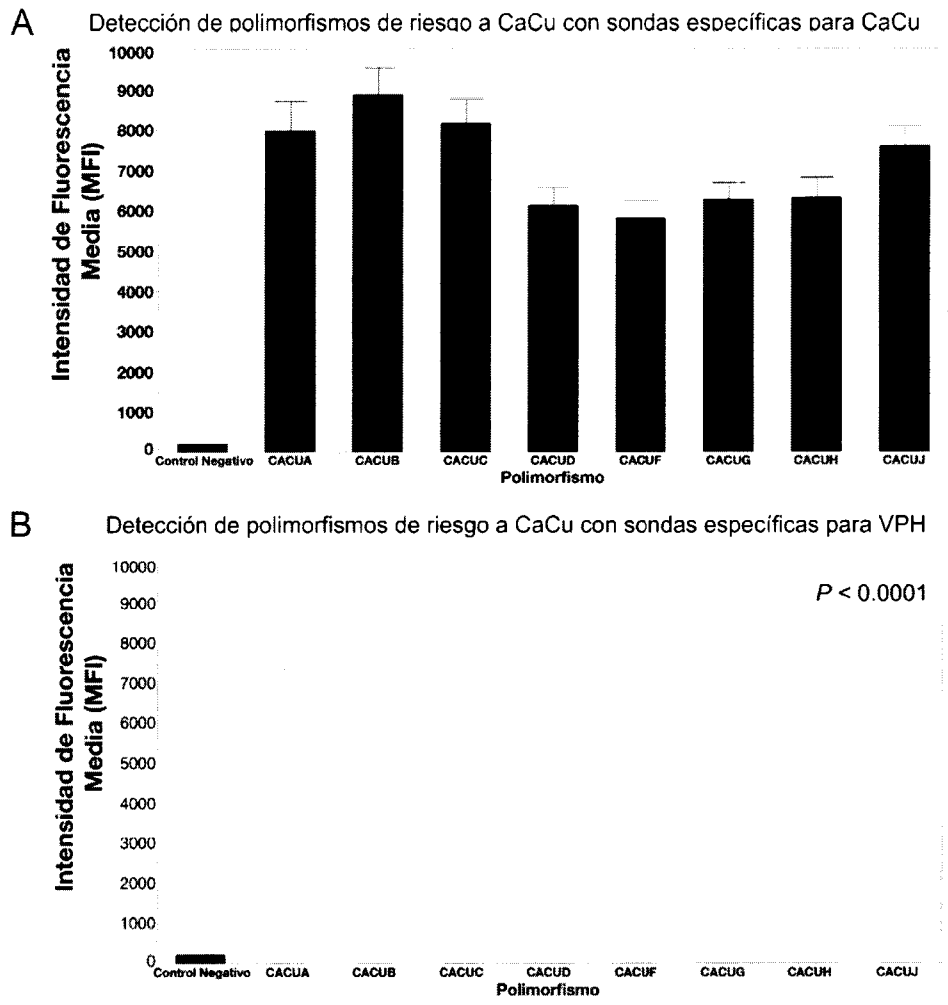


FIGURA 2A-B

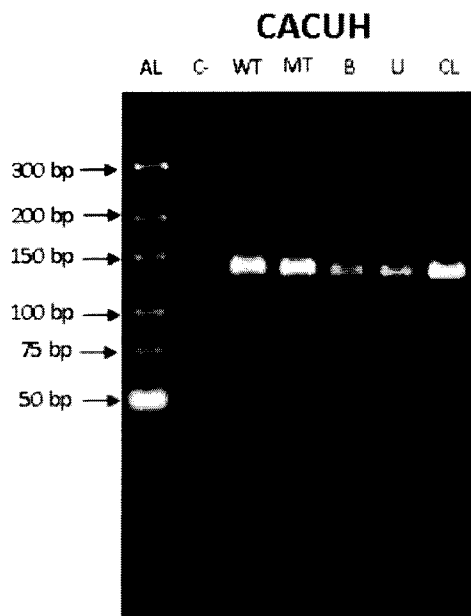


FIGURA 3

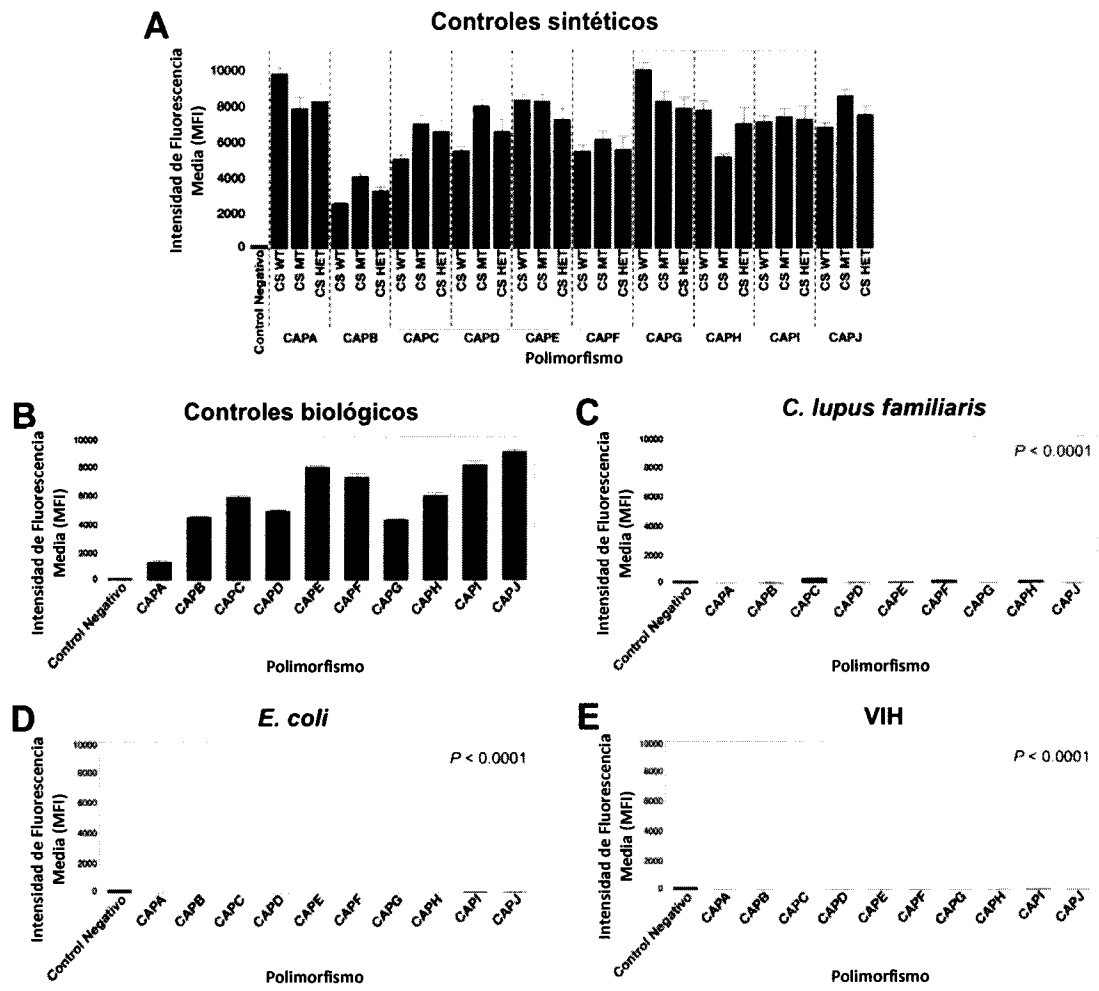
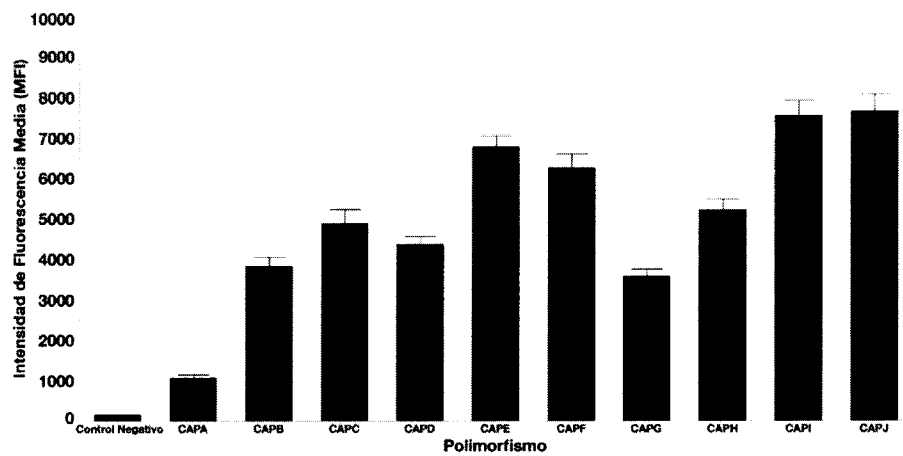


FIGURA 4A-E

A Detección de polimorfismos de riesgo a CaP con sondas específicas para CaP



B Detección de polimorfismos de riesgo a CaP con sondas específicas para VPH

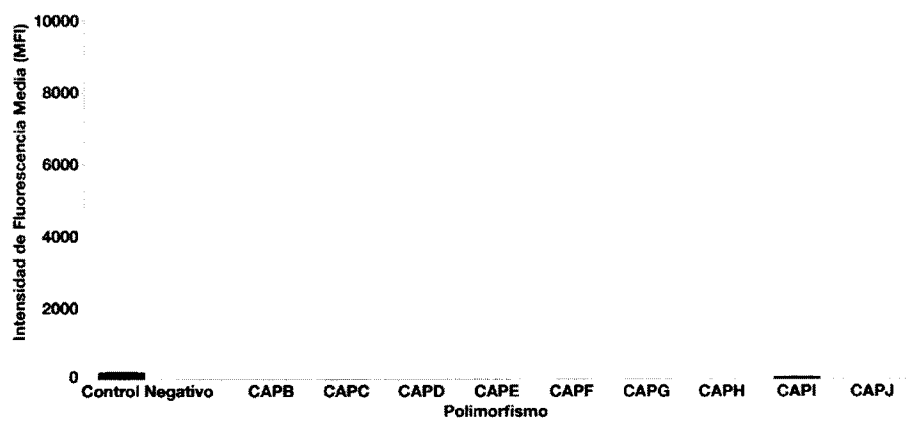


FIGURA 5A-B

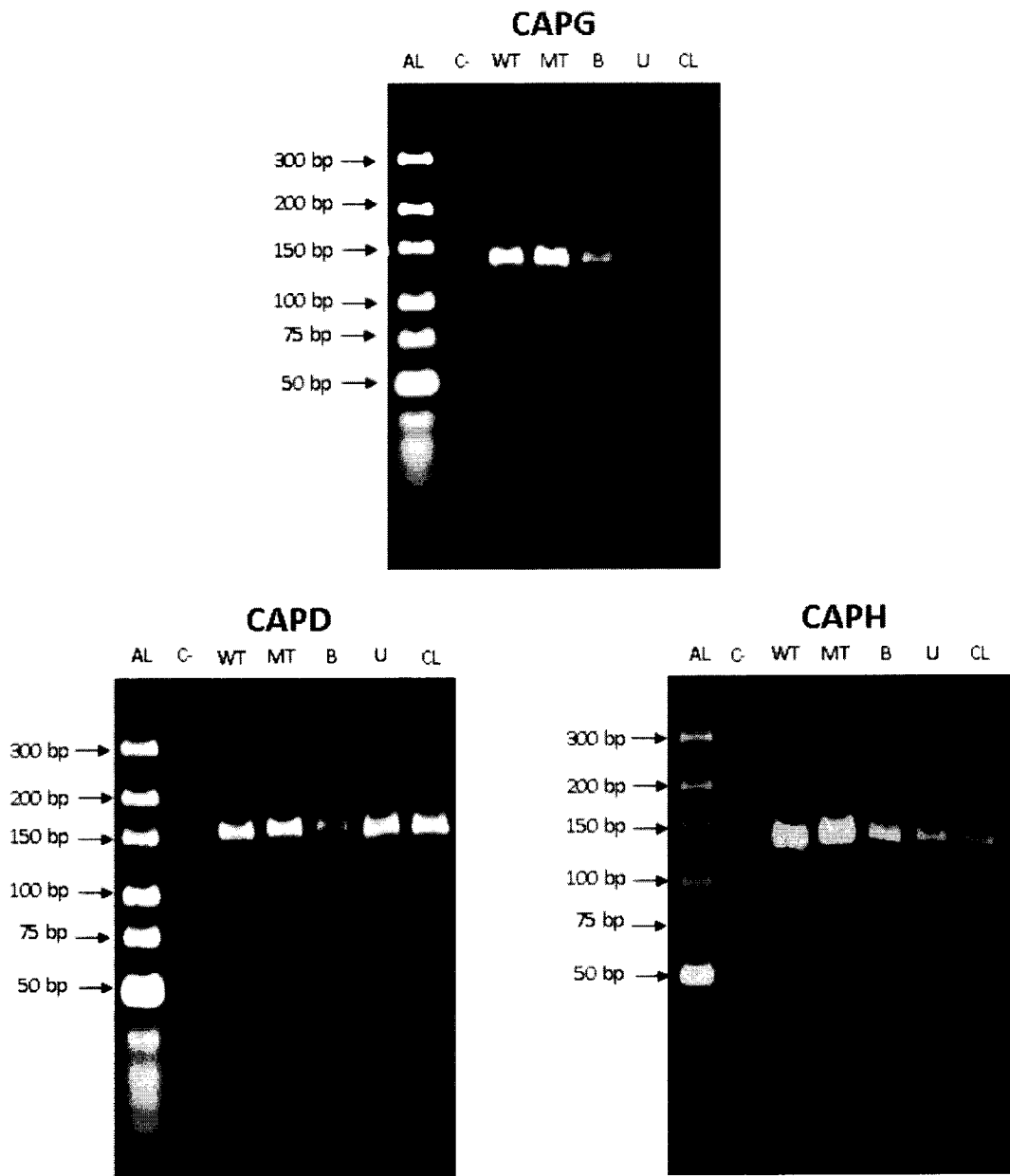


FIGURA 6

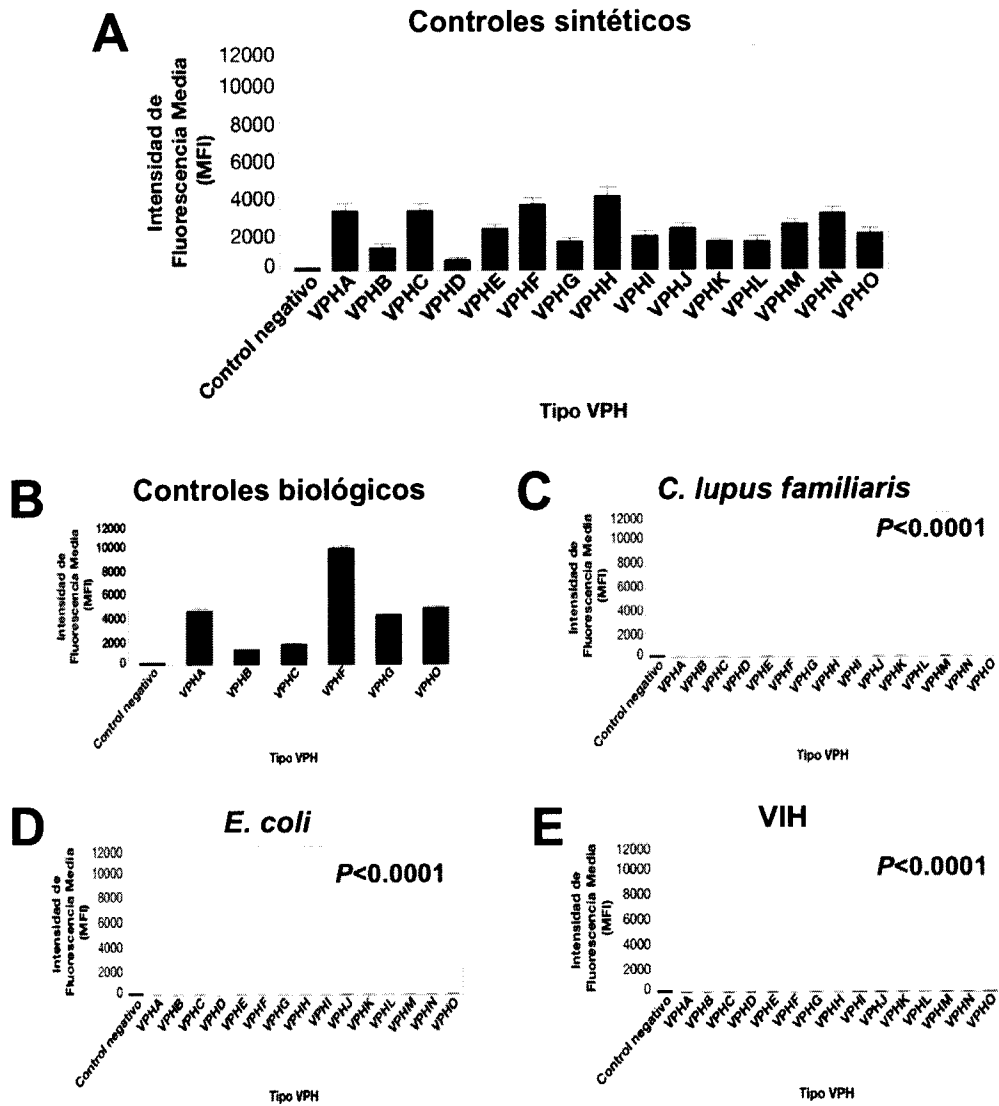


FIGURA 7A-E

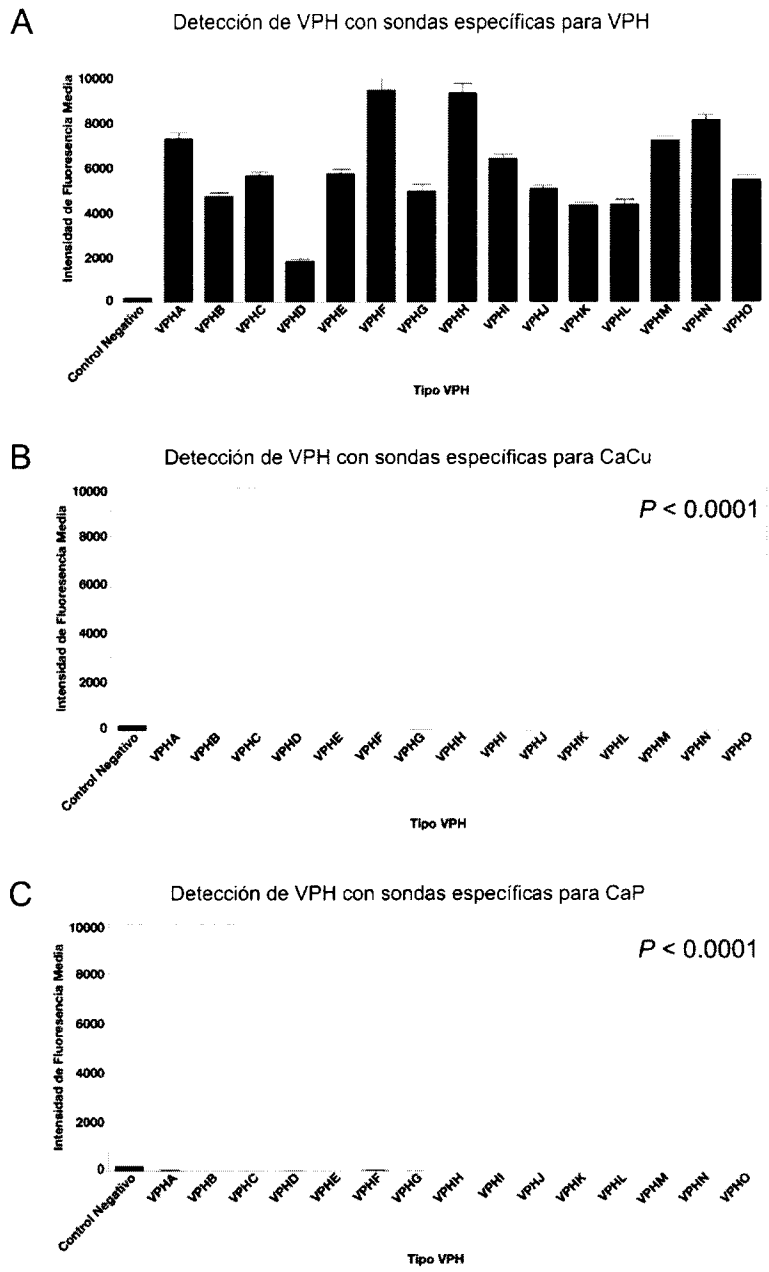


FIGURA 8A-C

Discriminación alélica de un marcador de riesgo de cáncer cervical con controles sintéticos

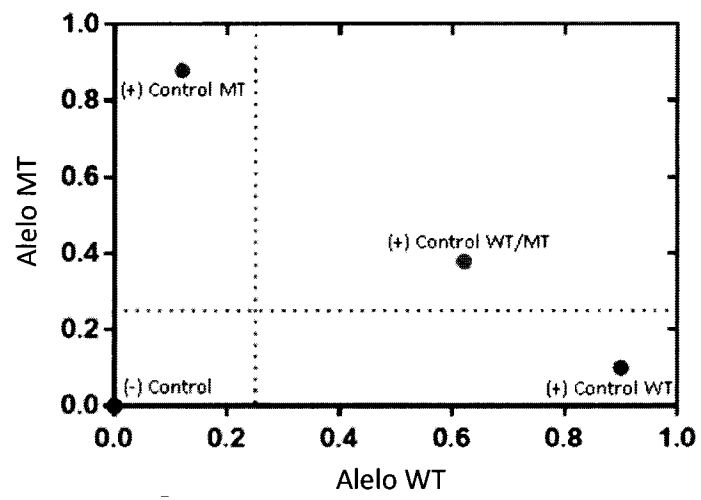
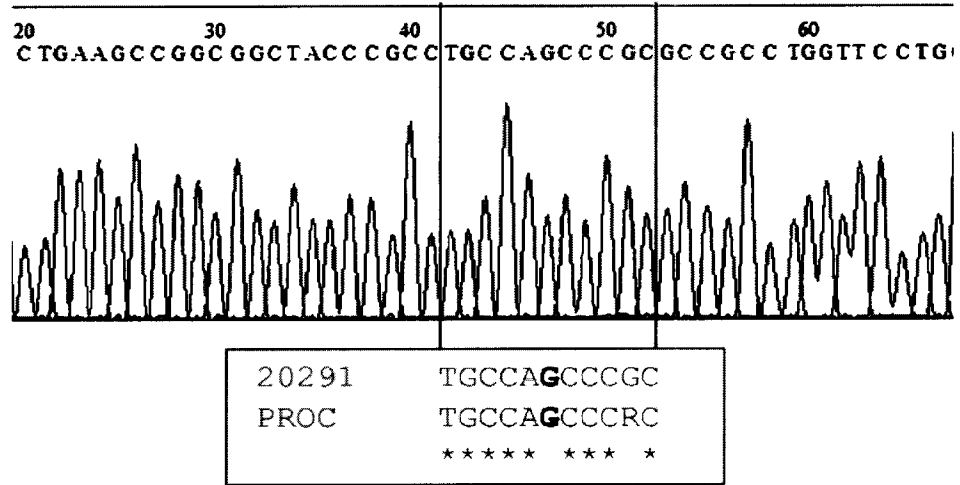


FIGURA 12

A)



B)

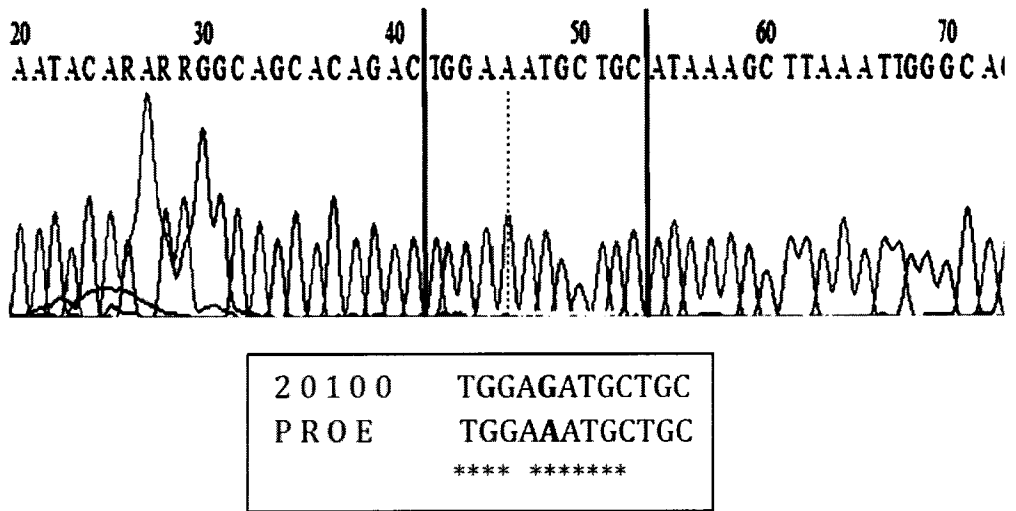


FIGURA 13A-B

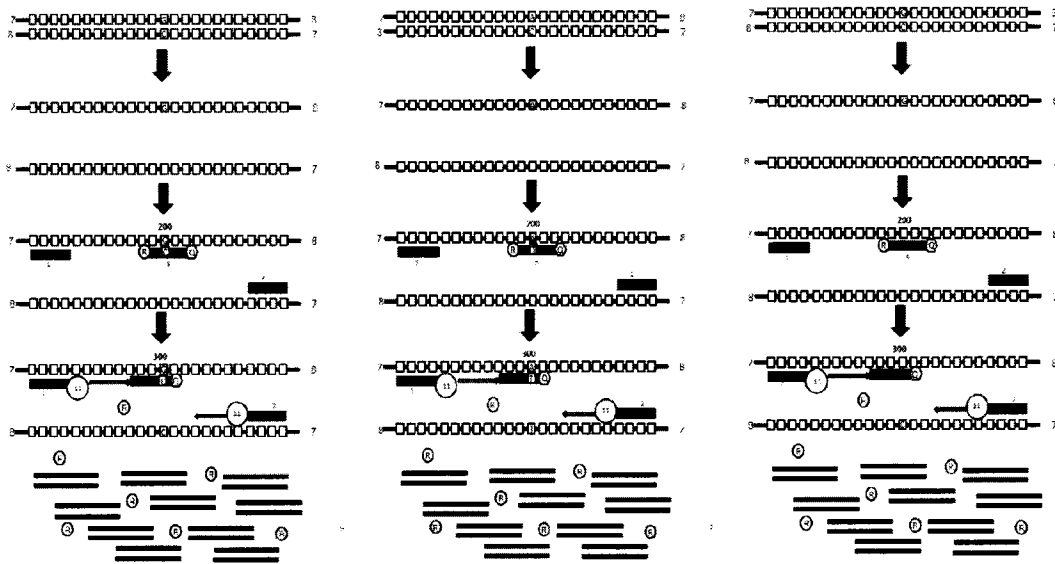


FIGURA 14

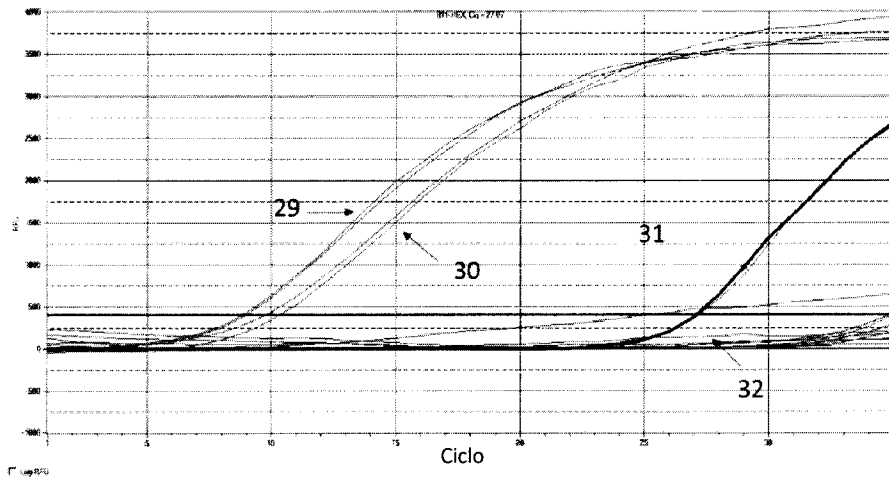


FIGURA 15

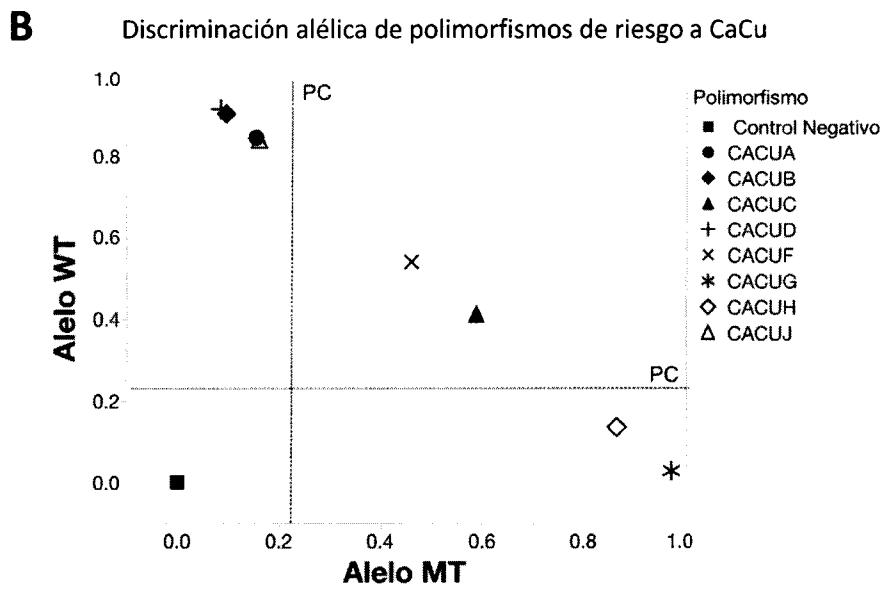
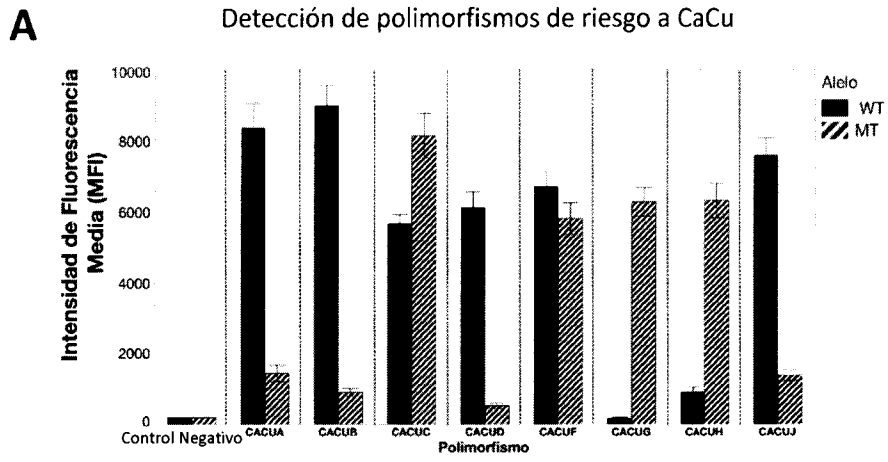
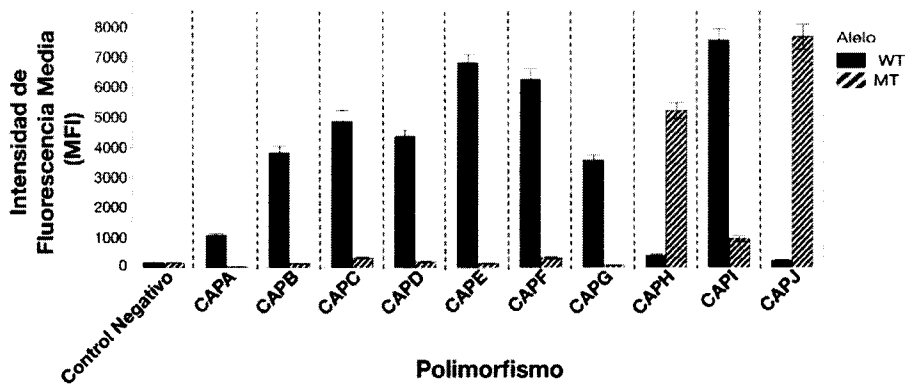


FIGURA 16 A-B

A

Detección de polimorfismos de riesgo a CaP



B

Discriminación alélica de polimorfismos de riesgo a CaP

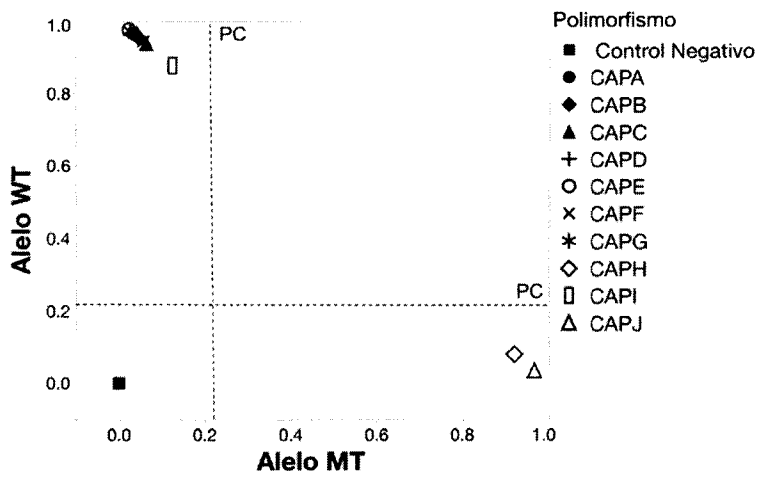
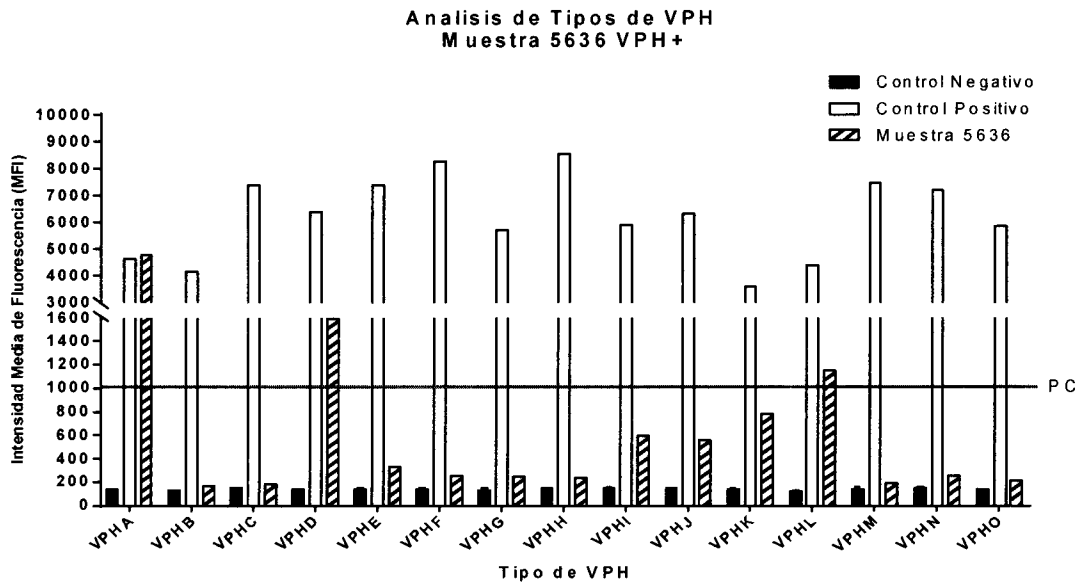


FIGURA 17 A-B

A



B

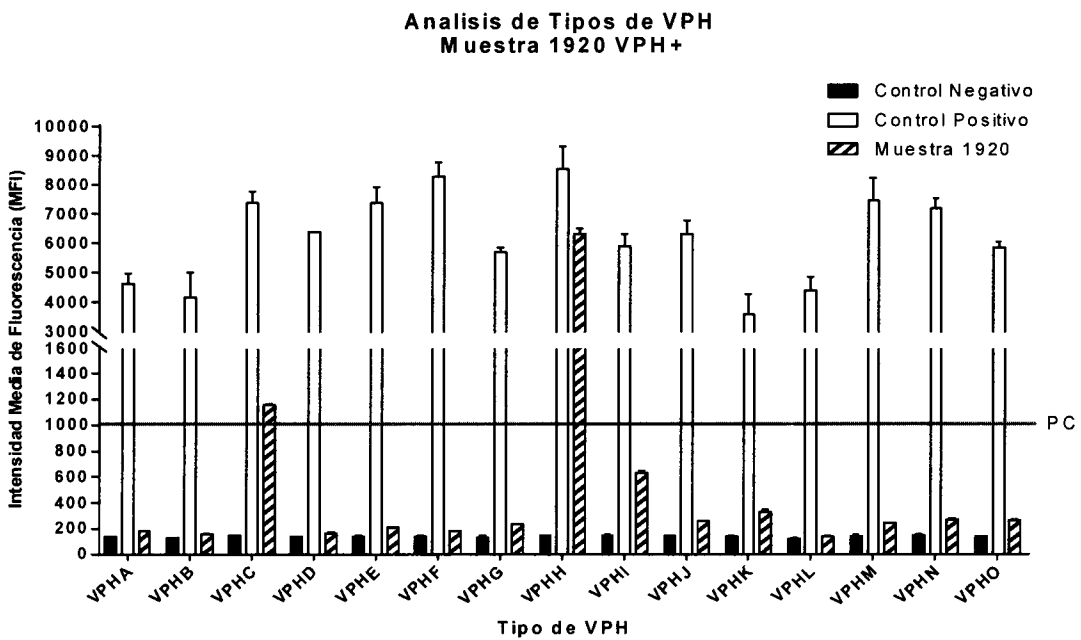
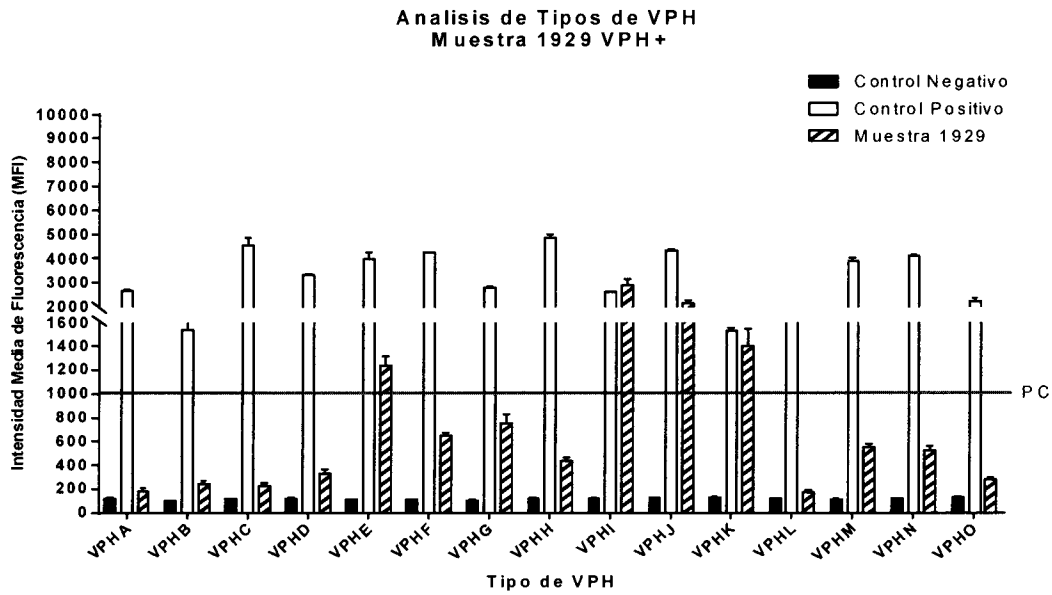


FIGURA 18A-N

C



D

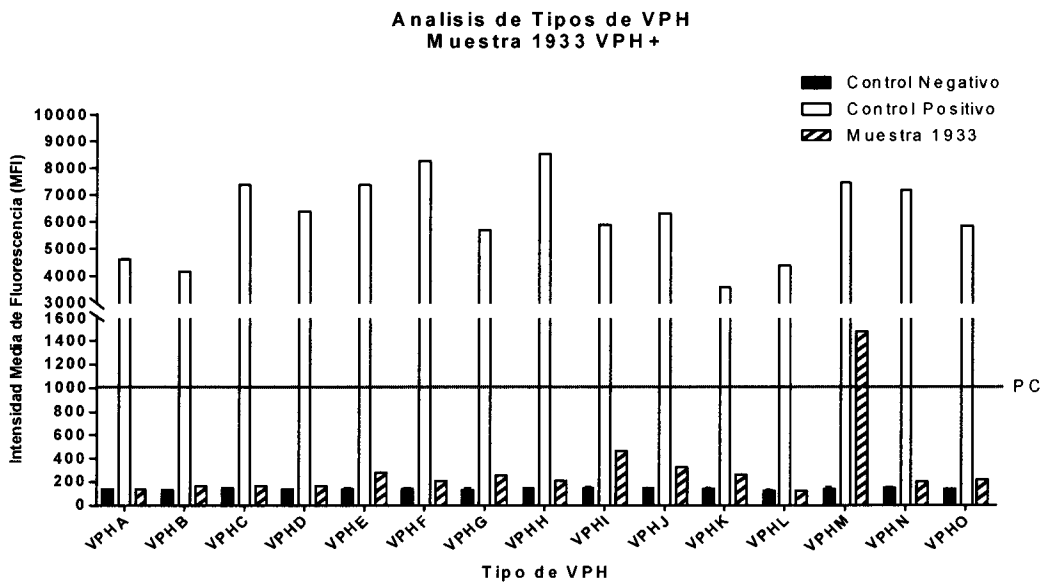
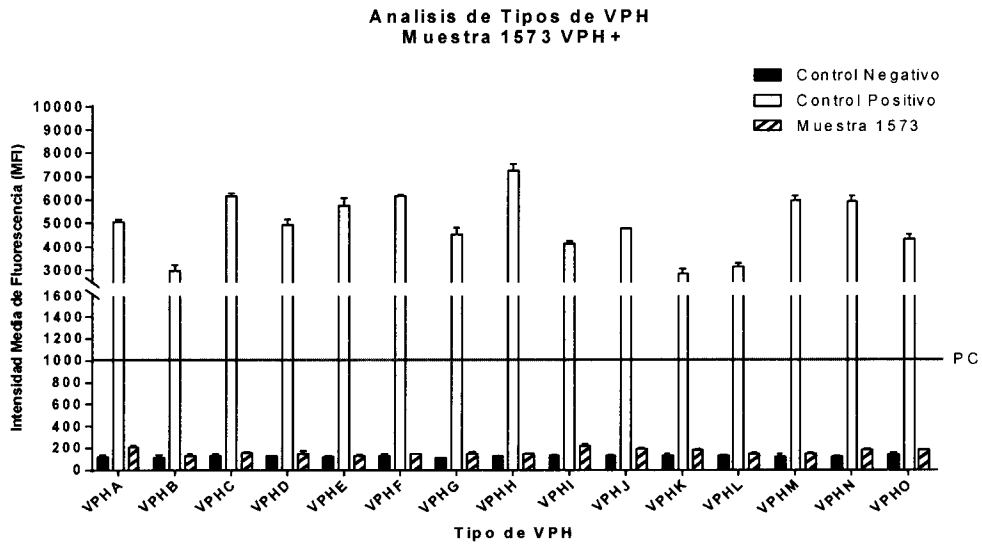


FIGURA 18A-N (Cont.)

E



F

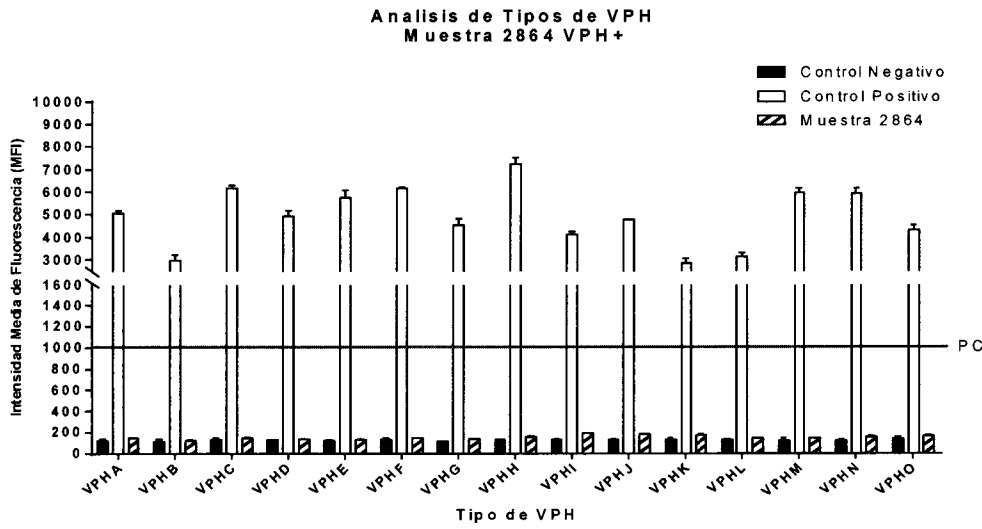
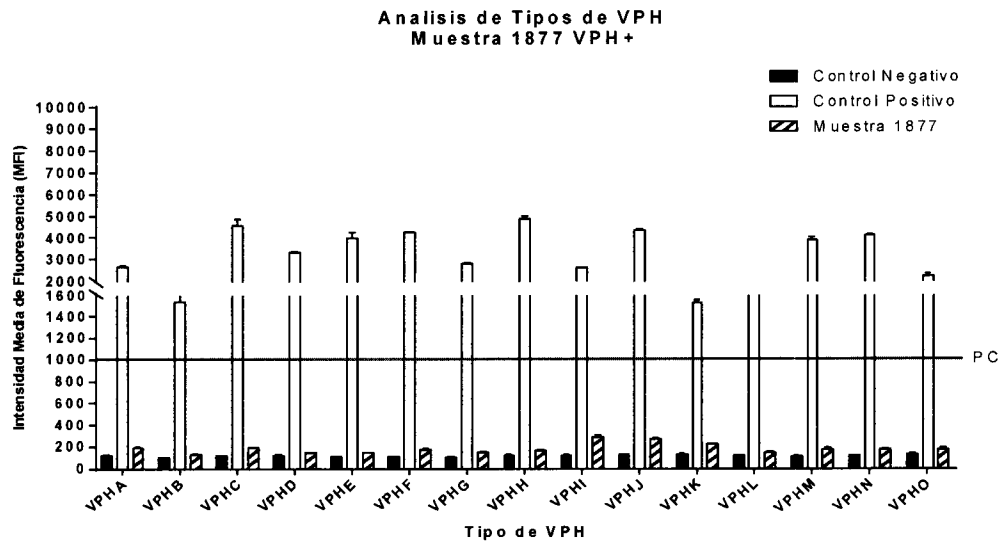


FIGURA 18A-N (Cont.)

G



H

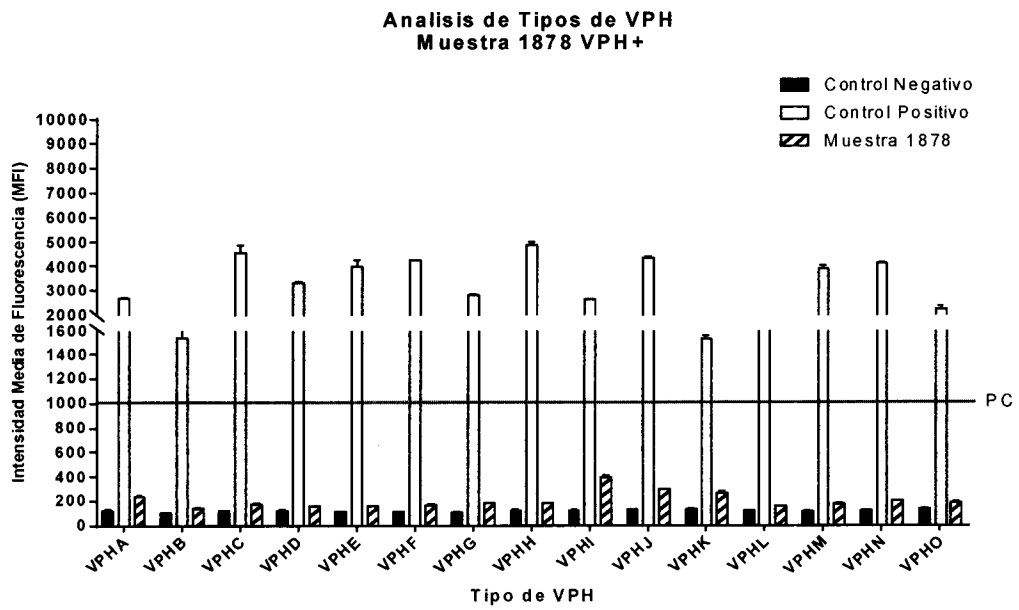
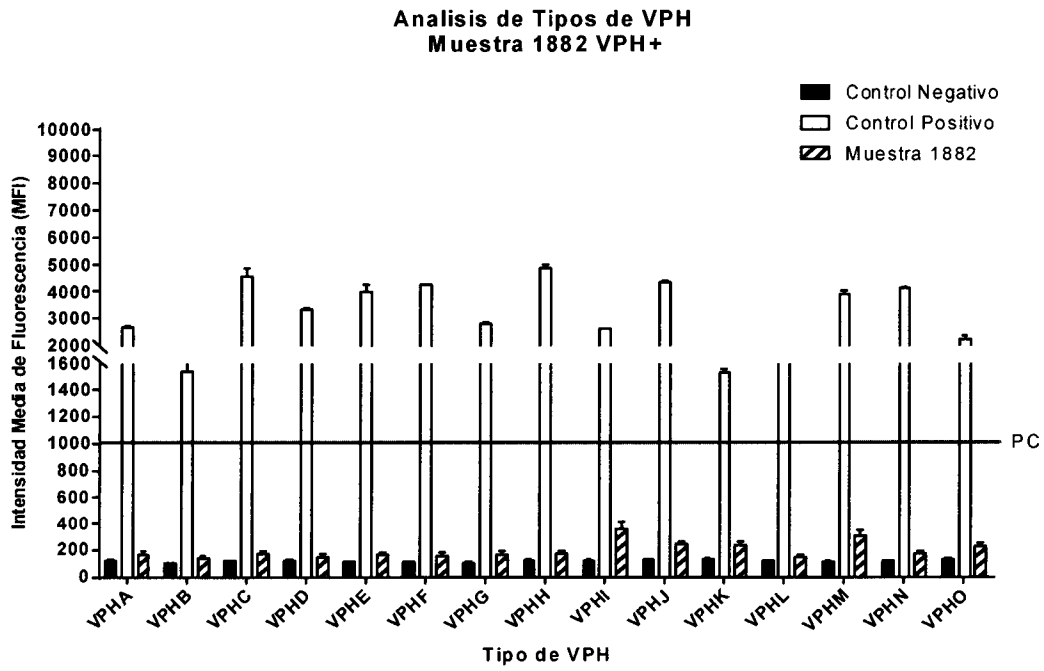


FIGURA 18A-N (Cont.)

I



J

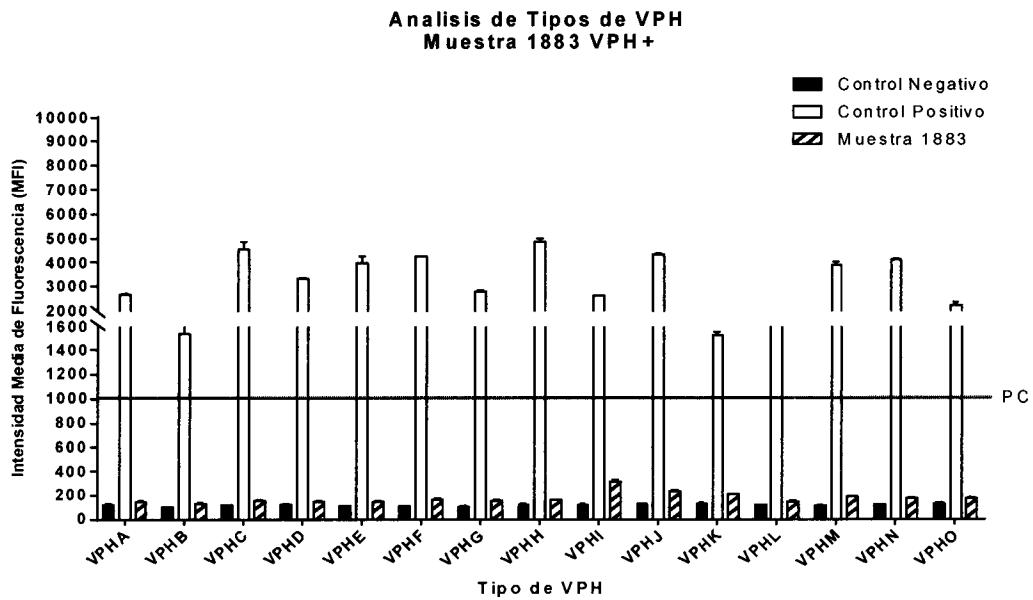
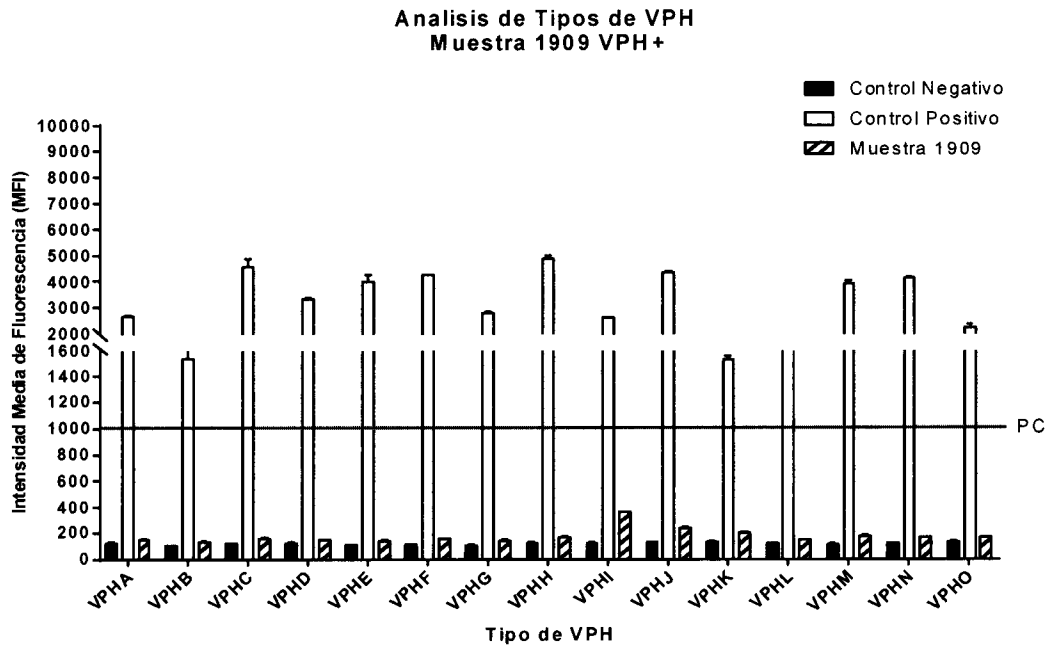


FIGURA 18A-N (Cont.)

K



L

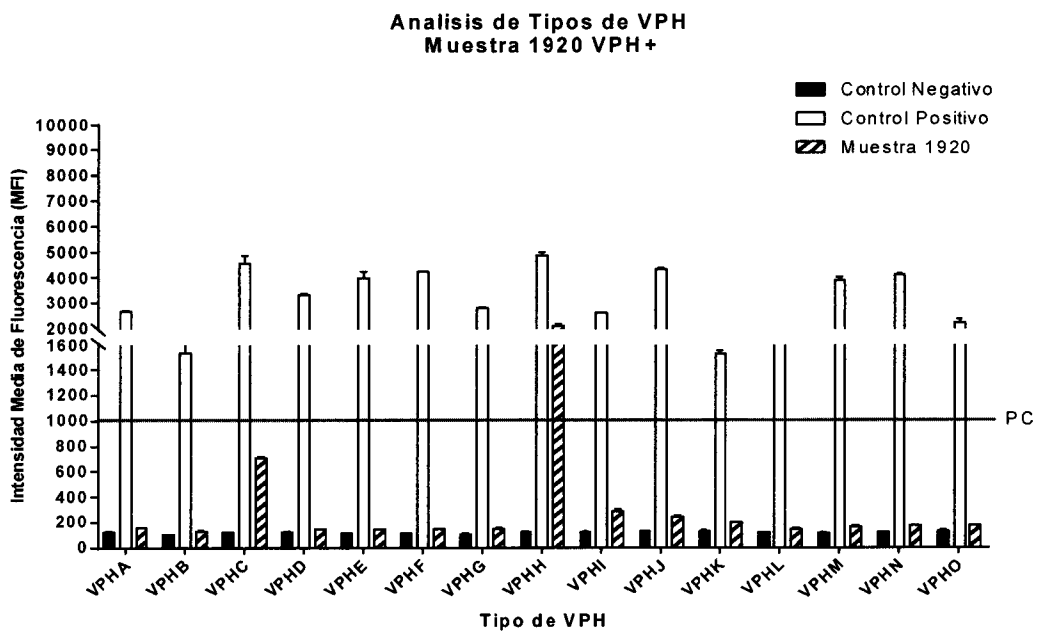
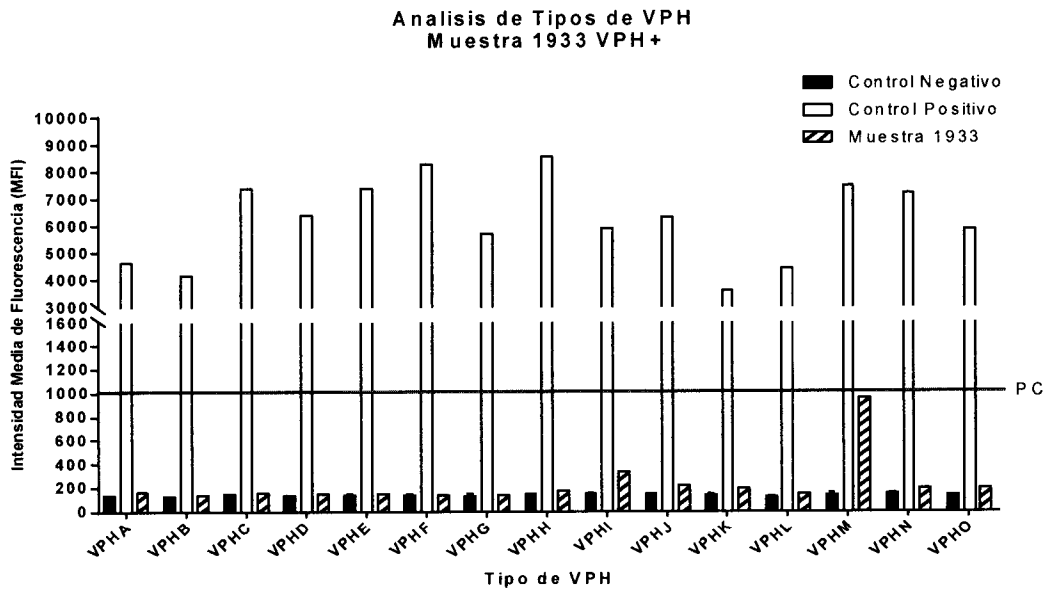


FIGURA 18A-N (Cont.)

M



N

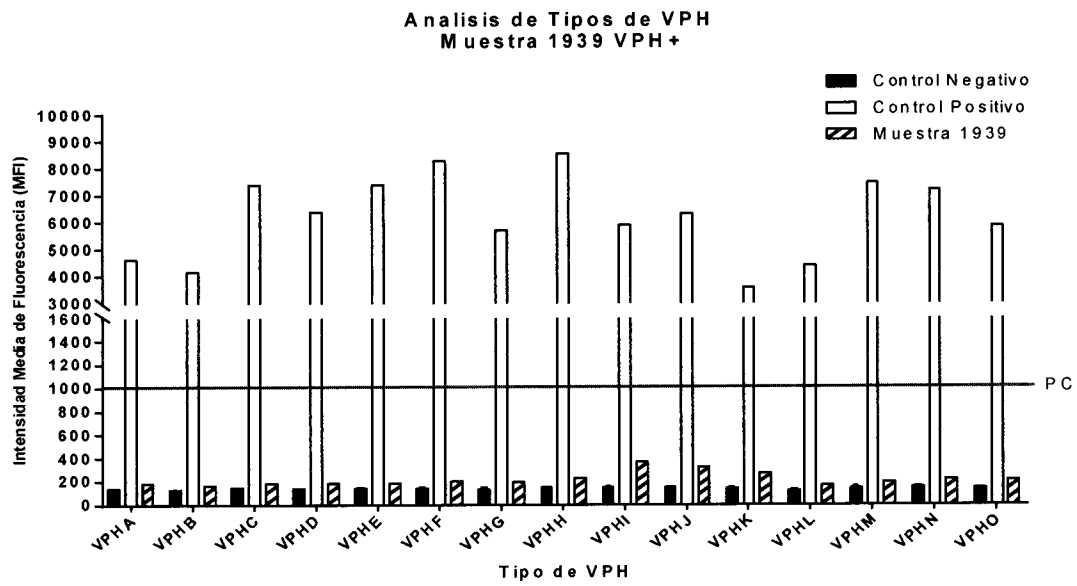


FIGURA 18A-N (Cont.)

FIGURA 19A

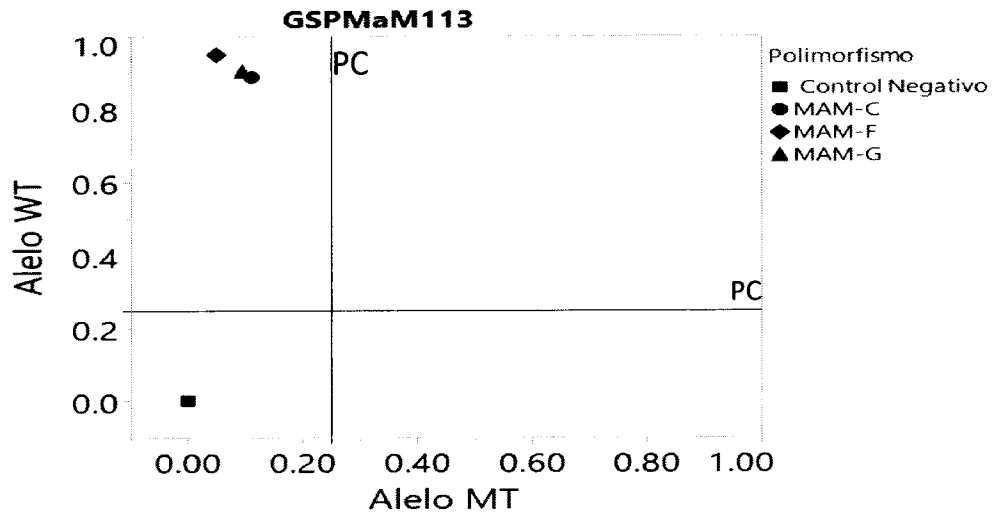


FIGURA 19B

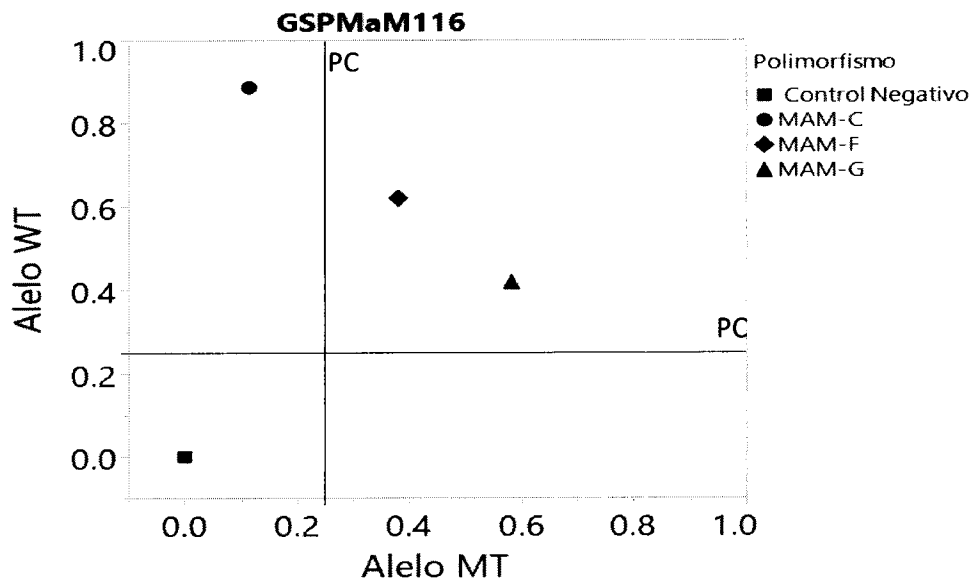


FIGURA 19C

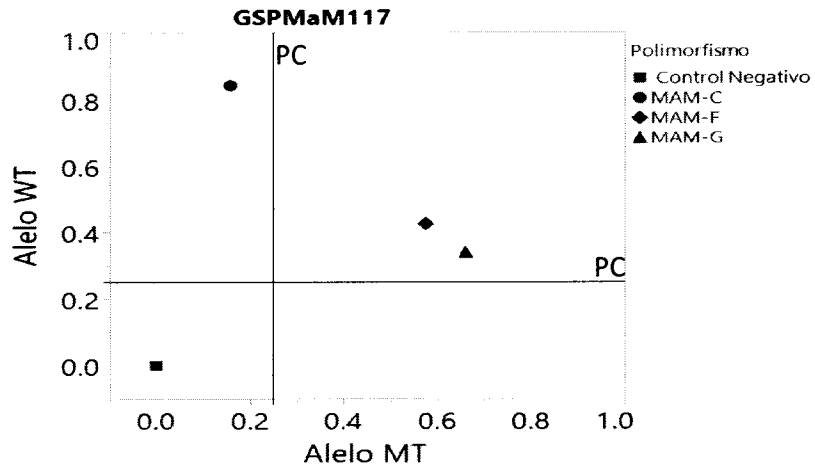


FIGURA 19D

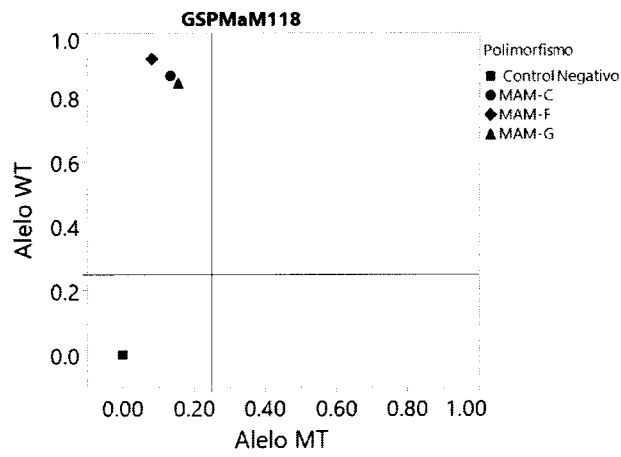


FIGURA 19E

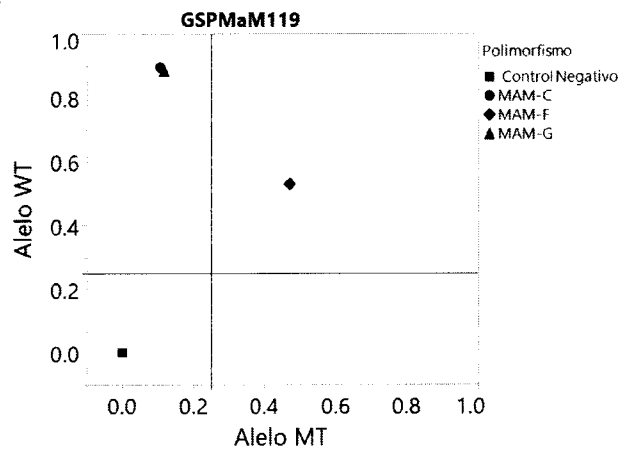


FIGURA 19F

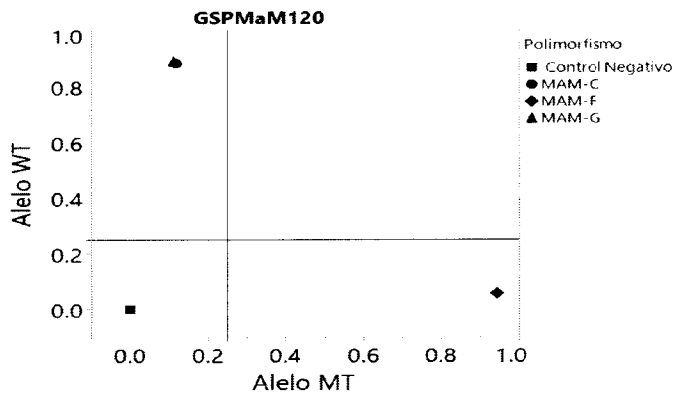


FIGURA 19G

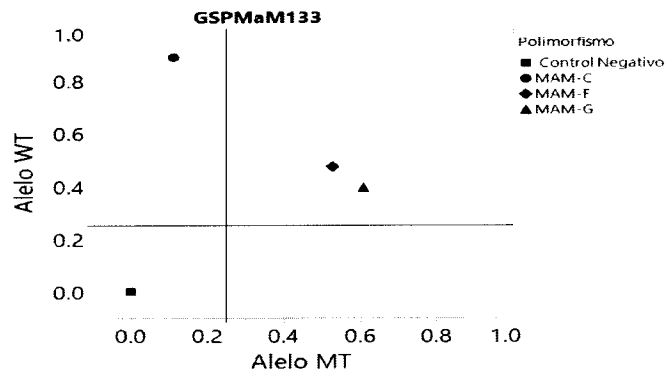


FIGURA 19H

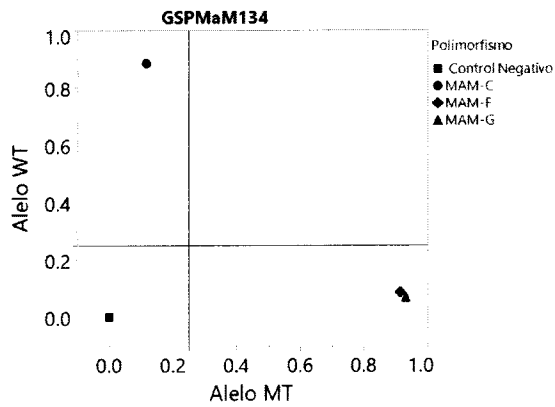


FIGURA 20A

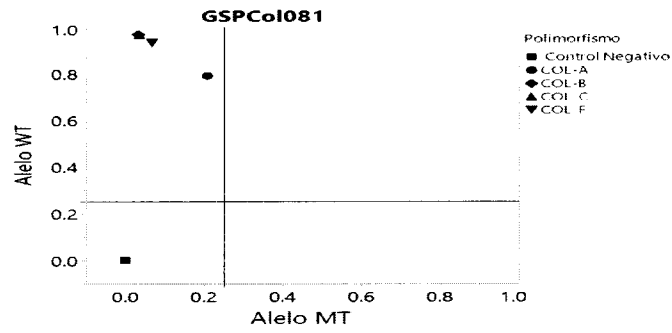


FIGURA 20B

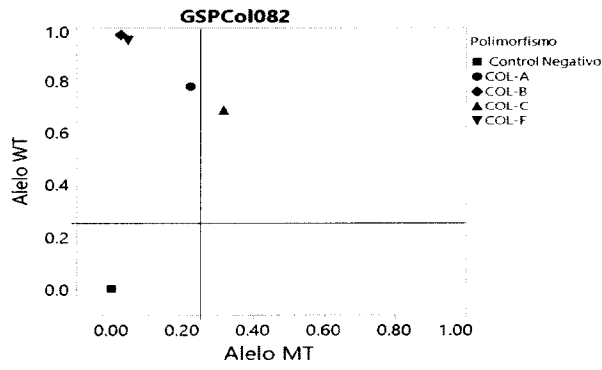


FIGURA 20C

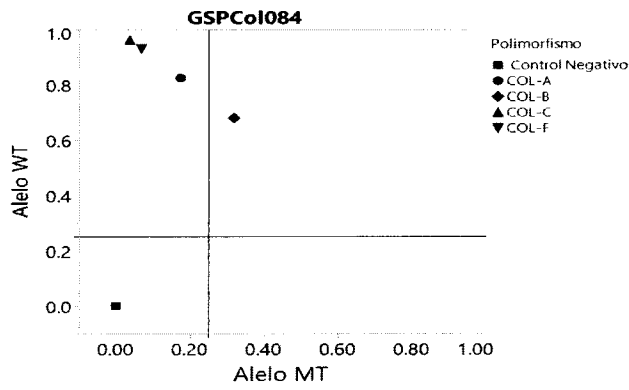


FIGURA 20D

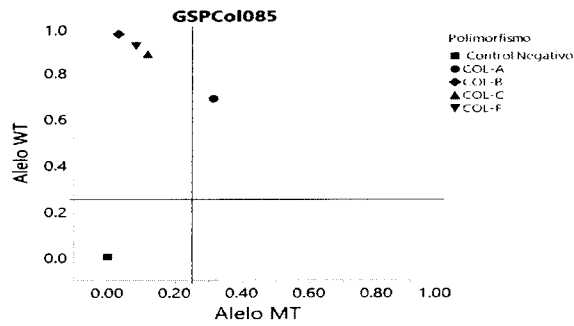


FIGURA 20E

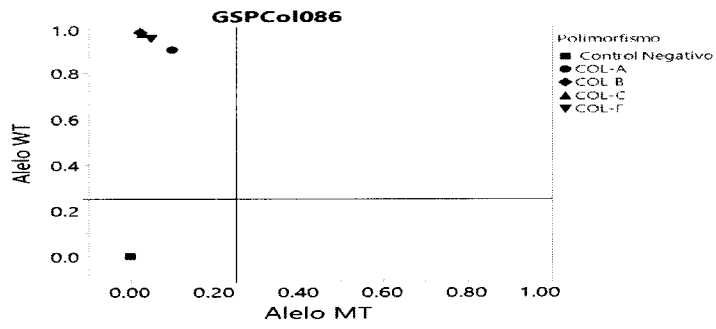


FIGURA 20F

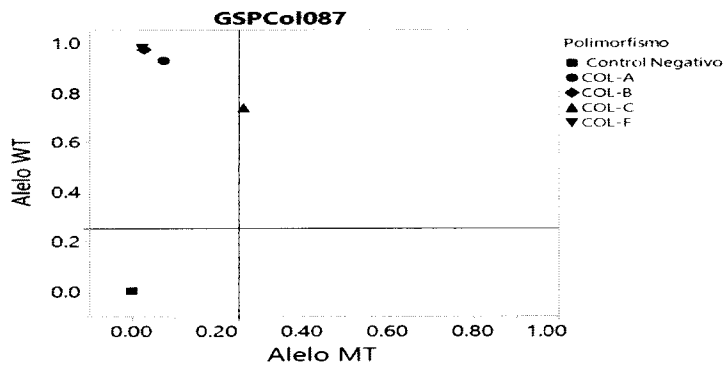


FIGURA 20G

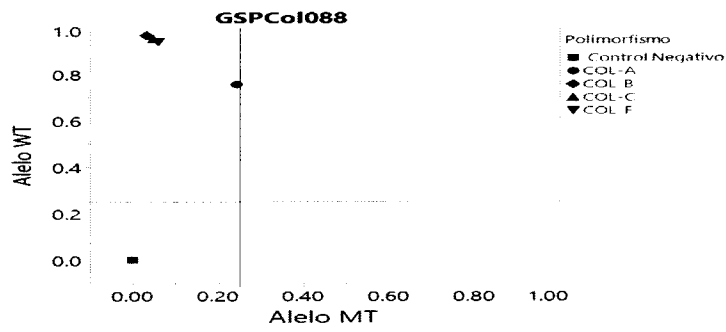


FIGURA 20H

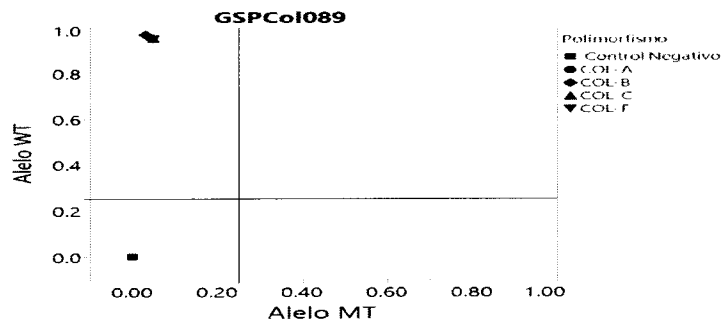


FIGURA 20I

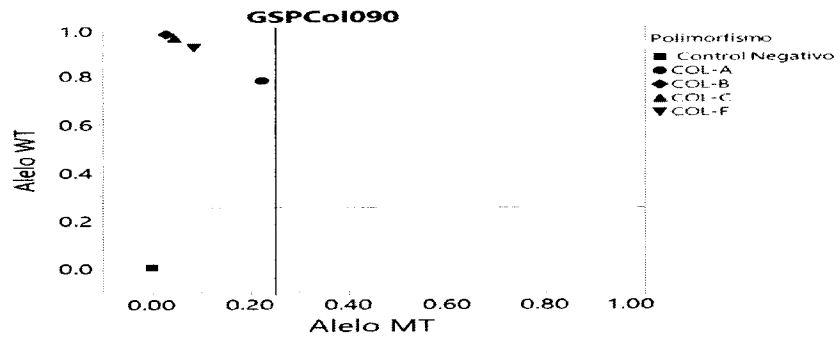


FIGURA 20J

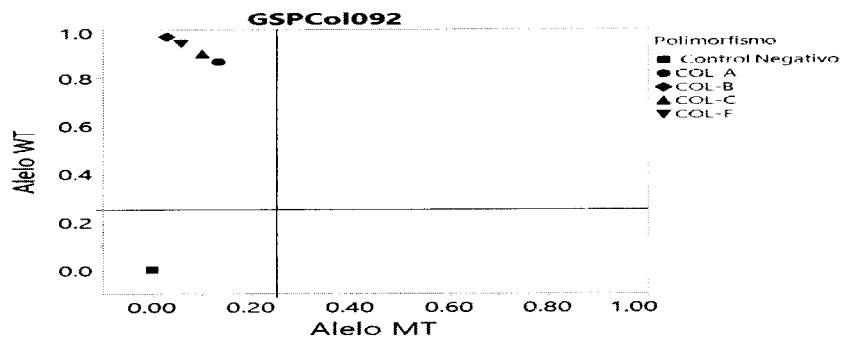


FIGURA 20K

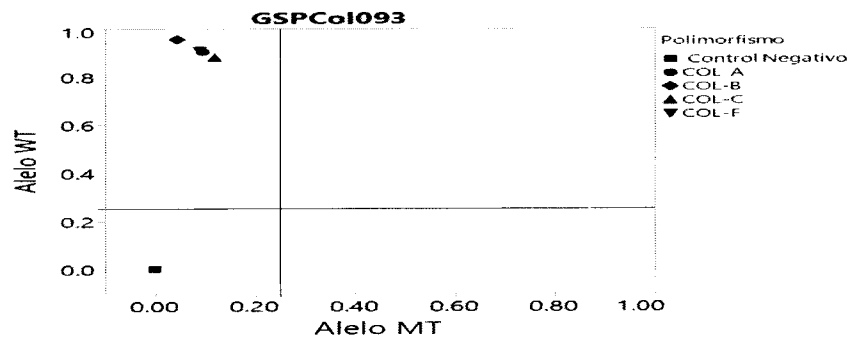


FIGURA 20L

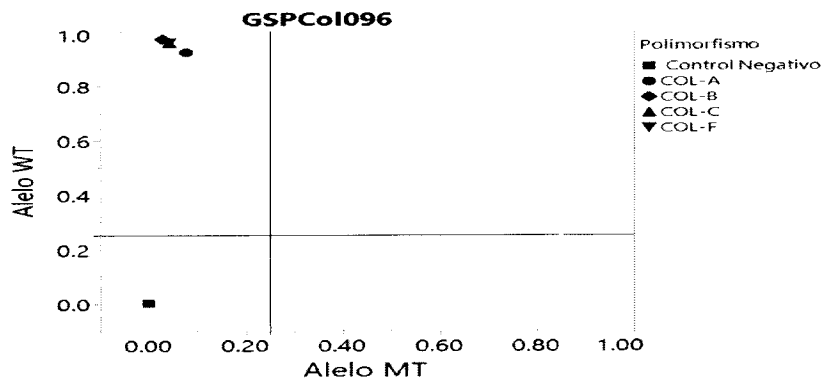


FIGURA 20M

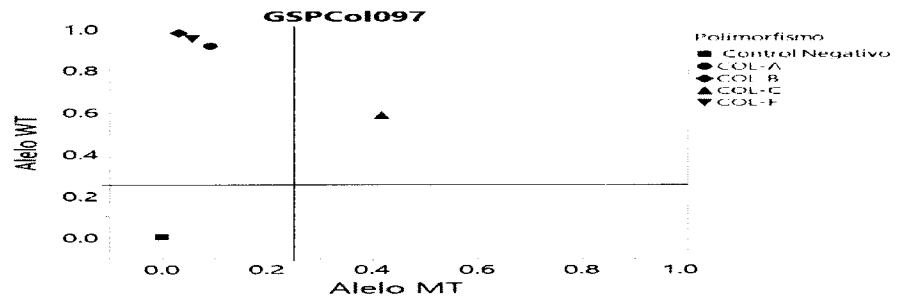


FIGURA 20N

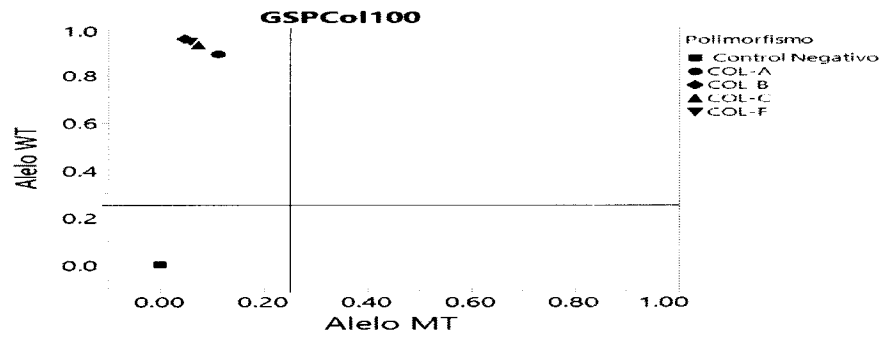


FIGURA 20O

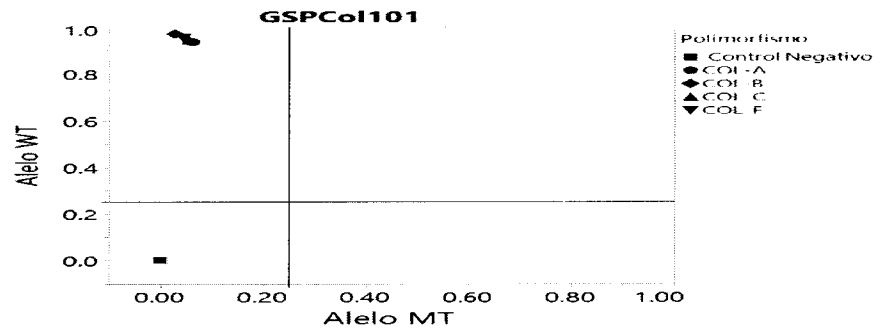


FIGURA 20P

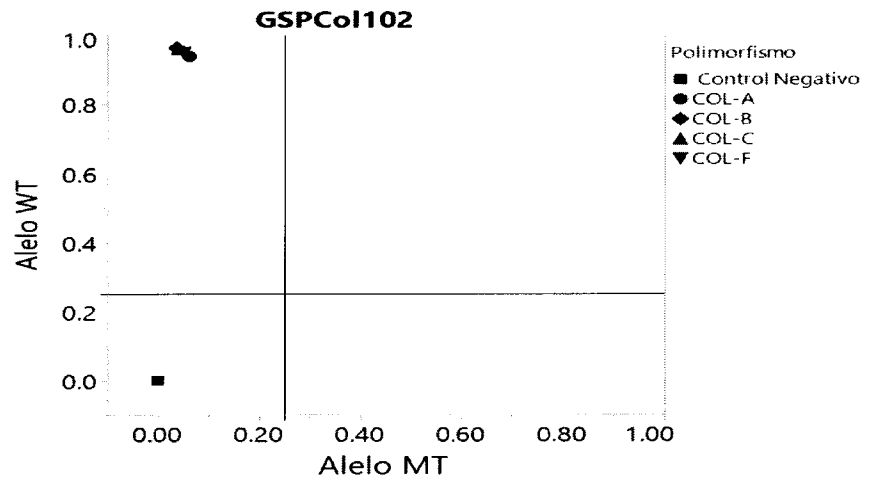


FIGURA 20Q

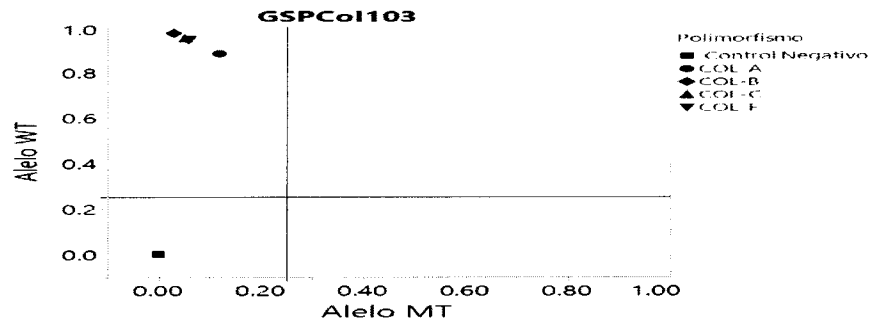


FIGURA 20R

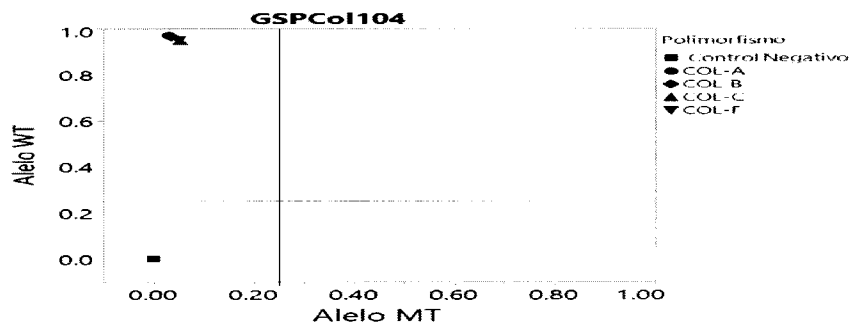


FIGURA 20S

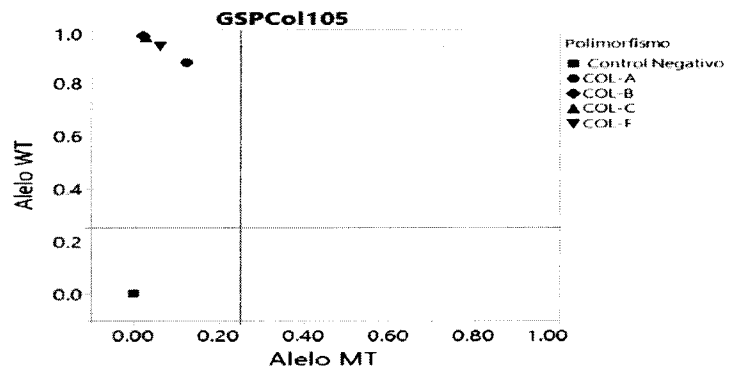


FIGURA 20T

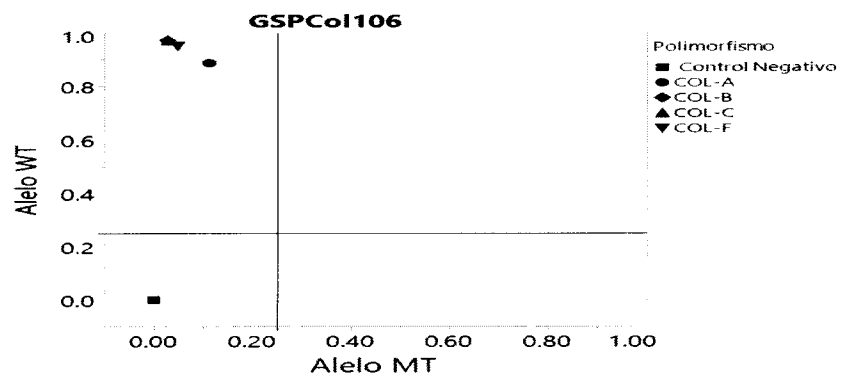


FIGURA 20U

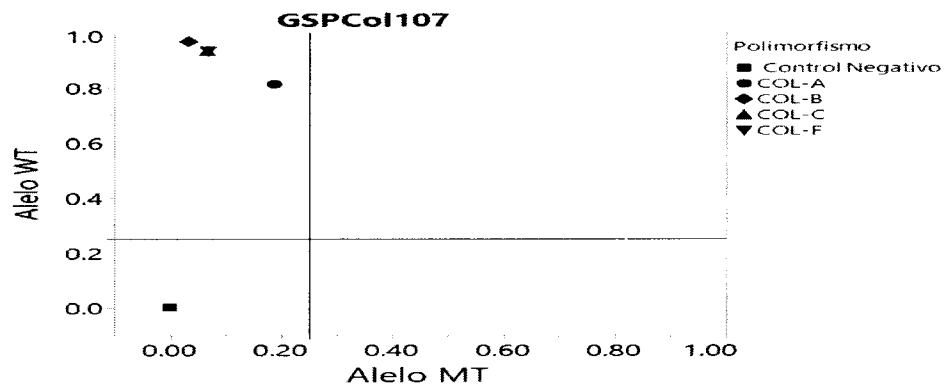
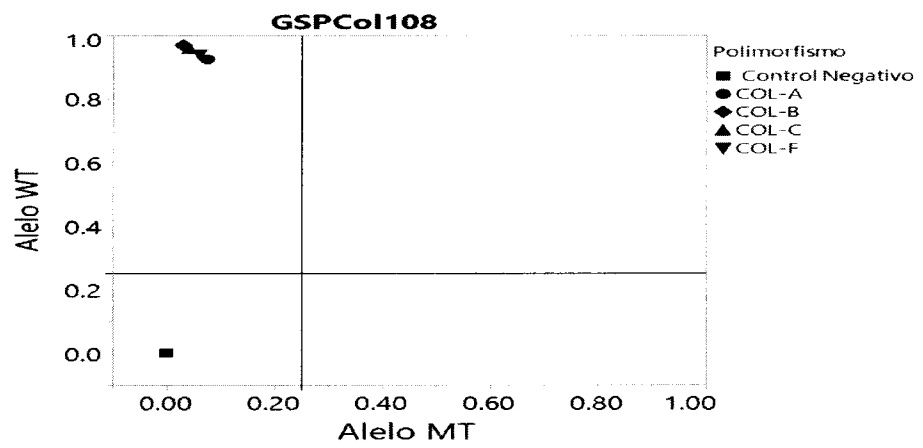
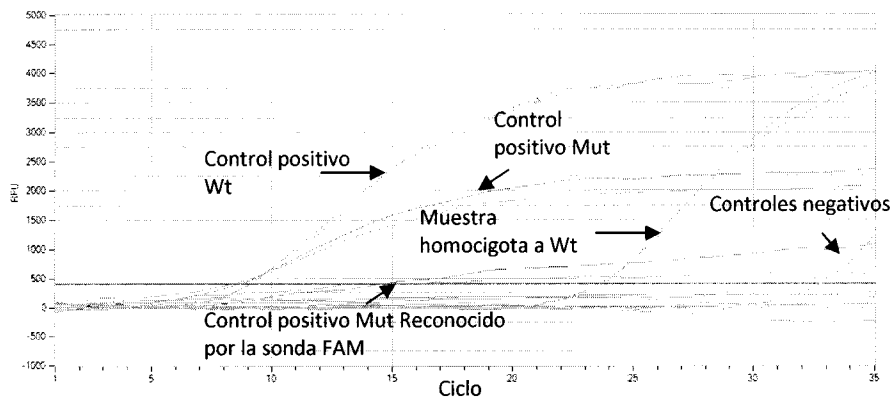


FIGURA 20V



A

MAMA SN



B

MAMB SNP

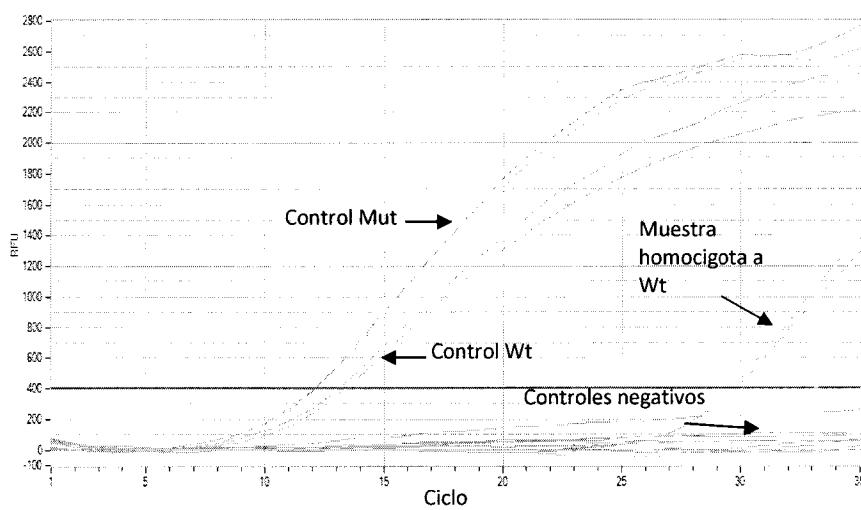
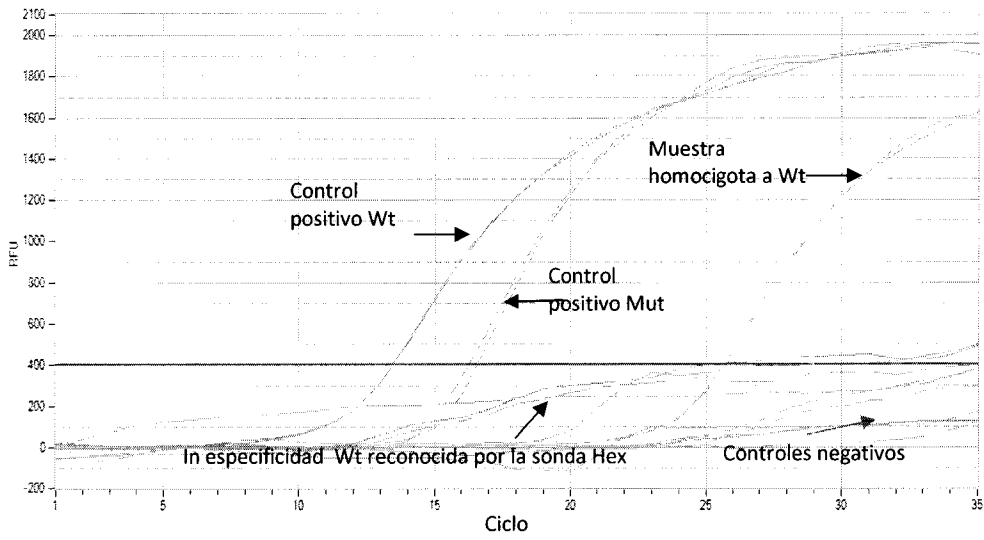


FIGURA 21A-FIGURA 21E

C

MAMC SNP



D

MAMD SNP

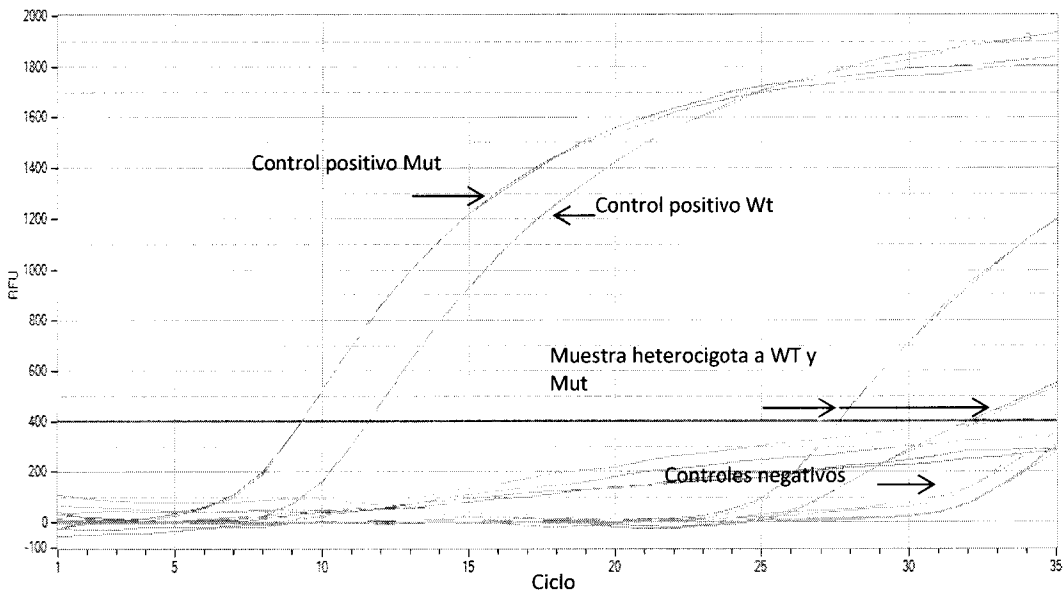


FIGURA 21A-FIGURA 21E (Cont.)

E

MAMD SNP

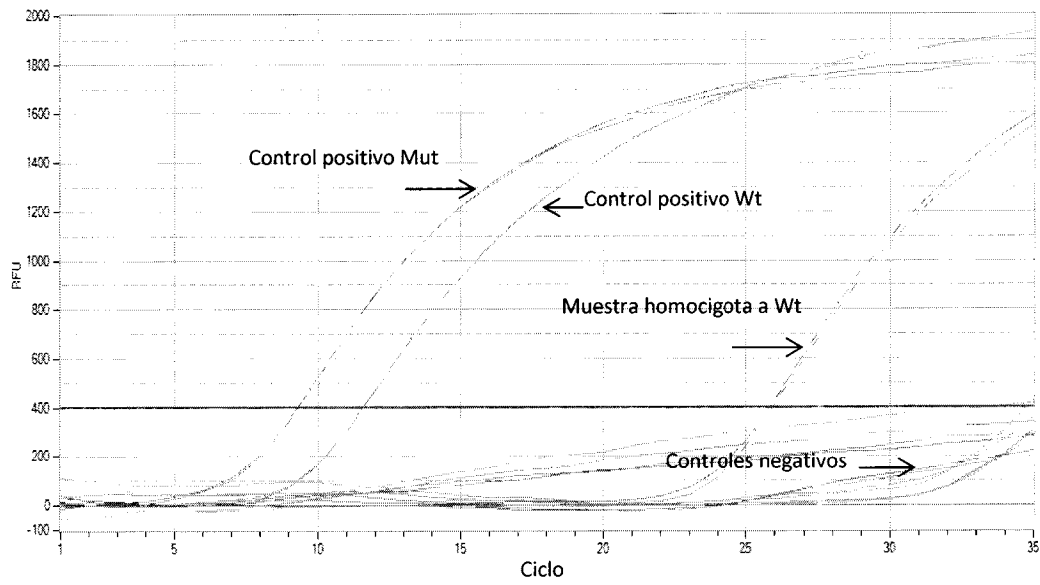


FIGURA 21A-FIGURA 21E (Cont.)