

19



OFICINA ESPAÑOLA DE
PATENTES Y MARCAS

ESPAÑA



11 Número de publicación: **2 984 254**

51 Int. Cl.:

C12Q 1/6886 (2008.01)

12

TRADUCCIÓN DE PATENTE EUROPEA

T3

86 Fecha de presentación y número de la solicitud internacional: **28.05.2020** **PCT/EP2020/064815**

87 Fecha y número de publicación internacional: **03.12.2020** **WO20239896**

96 Fecha de presentación y número de la solicitud europea: **28.05.2020** **E 20729993 (4)**

97 Fecha y número de publicación de la concesión europea: **17.04.2024** **EP 3963111**

54 Título: **Detección de cáncer colorrectal**

30 Prioridad:

31.05.2019 US 201916428865
31.12.2019 US 201962956059 P

45 Fecha de publicación y mención en BOPI de la
traducción de la patente:
29.10.2024

73 Titular/es:

UNIVERSAL DIAGNOSTICS, S.A. (100.0%)
Edificio Insur, Planta 3ª, Módulo 15 Avenida
Diego Martínez Barrio 10
41013 Sevilla, ES

72 Inventor/es:

BITENC, MARKO;
KRUUSMAA, KRISTI;
MARTINEZ-BAREA, JUAN;
HENSE, CHRISTIAN;
SOLA DE LOS SANTOS, POL;
CANAL NOGUER, POL;
CHERSICOLA, MARKO y
KNAP, PRIMOZ

74 Agente/Representante:

ARIZTI ACHA, Monica

Observaciones:

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

ES 2 984 254 T3

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

DESCRIPCIÓN

Detección de cáncer colorrectal

5 Antecedentes

El cribado de cáncer es un componente crítico de la prevención, diagnóstico y tratamiento del cáncer. El cáncer colorrectal (CRC) se ha identificado, según algunos informes, como el tercer tipo más común de cáncer y la segunda causa más frecuente de mortalidad por cáncer en el mundo. Según algunos informes, hay más de 1,8 millones de nuevos casos de cáncer colorrectal al año y aproximadamente 881.000 muertes por cáncer colorrectal, representando aproximadamente 1 de cada 10 muertes por cáncer. Se recomienda un cribado de cáncer colorrectal regular, en particular para individuos de más de 50 años de edad. Además, la incidencia de cáncer colorrectal en individuos de menos de 50 años de edad ha aumentado a lo largo del tiempo. Los datos estadísticos sugieren que las técnicas de cribado de cáncer colorrectal actuales son insuficientes.

Sumario

A pesar de mejoras a lo largo del tiempo, tan solo aproximadamente el 40-44% de los cánceres colorrectales se detectan actualmente mediante cribado en un estadio temprano localizado. Esto se debe, al menos en parte, a una sensibilidad y/o especificidad insuficientes de las técnicas de cribado actuales. Las técnicas actualmente recomendadas incluyen colonoscopia y/o pruebas de sangre en las heces para las personas de más de 50 años de edad.

Michail Galanopoulos *et al*: "Abnormal DNA methylation as a cell-free circulating DNA biomarker for colorectal cancer detection: A review of literature", Word Journal of Gastrointestinal Oncology, vol. 9, n.º 4, 1 de enero de 2017 (01/01/2017), página 142, XP055723984, ISSN:1984-5204, POI: 10.4251/wjgo.v9.i4.142, revisa la bibliografía científica referente a metilación de ADN anómala como biomarcador de ADN circulante libre de células para la detección de cáncer colorrectal y presenta varios marcadores (tabla 2), así como combinaciones de marcadores que van a someterse a prueba juntos, sin embargo no da a conocer el objeto tal como se abarca por la redacción de las reivindicaciones. La presente divulgación proporciona, tal como se abarca por la redacción de las reivindicaciones, métodos de cribado de cáncer colorrectal y composiciones relacionadas con los mismos. En diversas realizaciones, la presente divulgación proporciona, tal como se abarca por la redacción de las reivindicaciones, métodos de cribado de cáncer colorrectal que incluyen la determinación del estado de metilación (por ejemplo, el número, frecuencia o patrón de metilación) en uno o más sitios de metilación encontrados dentro de un locus de metilación, por ejemplo, una región diferencialmente metilada (DMR), de ácido desoxirribonucleico (ADN) de un sujeto humano, y composiciones relacionadas con los mismos. En diversas realizaciones, la presente divulgación proporciona, tal como se abarca por la redacción de las reivindicaciones, métodos de cribado de cáncer colorrectal que incluyen examinar el estado de metilación para cada uno de uno o más loci de metilación en ADNlc (ADN libre de células), por ejemplo, en ADNtc (ADN tumoral circulante). En diversas realizaciones, la presente divulgación proporciona, tal como se abarca por la redacción de las reivindicaciones, métodos de cribado de cáncer colorrectal que incluyen determinar un estado de metilación para cada uno de uno o más loci de metilación en ADNlc, por ejemplo, en ADNtc, usando reacción en cadena de la polimerasa cuantitativa (qPCR) (por ejemplo, reacción en cadena de la polimerasa cuantitativa con enzimas de restricción sensibles a la metilación, MSRE-qPCR). Diversas composiciones y métodos proporcionados en el presente documento, tal como se abarca por la redacción de las reivindicaciones, proporcionan sensibilidad y especificidad suficientes para la aplicación clínica en el cribado de cáncer colorrectal. Diversas composiciones y métodos proporcionados en el presente documento, tal como se abarca por la redacción de las reivindicaciones, son útiles en el cribado de cáncer colorrectal mediante análisis de una muestra de tejido accesible de un sujeto, por ejemplo, una muestra de tejido que es sangre o un componente sanguíneo (por ejemplo, ADNlc, por ejemplo, ADNtc), o heces.

En un aspecto, la invención se refiere, tal como se abarca por la redacción de las reivindicaciones, a un método de detección (por ejemplo, cribado) de cáncer colorrectal, comprendiendo el método: determinar un estado de metilación [por ejemplo, un número, frecuencia o patrón de metilación en uno o más sitios de metilación dentro de un locus de metilación] para cada uno de los siguientes, en ácido desoxirribonucleico (ADN) de un sujeto humano: (a) un locus de metilación [por ejemplo, una región diferencialmente metilada] dentro del gen ZNF132; (b) un primer locus de metilación dentro del gen ADAMTS2; y (c) un segundo locus de metilación dentro del gen ADAMTS2; y comparar los datos obtenidos con valores de referencia obtenidos a partir de individuos sanos, y diagnosticar cáncer colorrectal en el sujeto humano si se detecta una hipermetilación de los loci, en comparación con la muestra de referencia.

En determinadas realizaciones, el método comprende además determinar un estado de metilación para cada uno de los siguientes, en el ADN del sujeto humano: (d) un locus de metilación dentro del gen ZNF542; y (e) un locus de metilación dentro del gen LONRF2.

En determinadas realizaciones, el método comprende además determinar un estado de metilación para un locus de

metilación dentro del gen ZNF492 en el ADN del sujeto humano.

En determinadas realizaciones, el locus de metilación dentro del gen ZNF132 comprende ZNF132 '415 (SEQ ID NO: 40).

5 En determinadas realizaciones, el primer locus de metilación dentro del gen ADAMTS2 comprende ADAMTS2 '254 (SEQ ID NO: 21).

10 En determinadas realizaciones, el segundo locus de metilación dentro del gen ADAMTS2 comprende ADAMTS2 '284 (SEQ ID NO: 22).

En determinadas realizaciones, el locus de metilación dentro del gen ZNF542 comprende ZNF542 '502 (SEQ ID NO: 35).

15 En determinadas realizaciones, el locus de metilación dentro del gen LONRF2 comprende LONRF2 '281 (SEQ ID NO: 19).

En determinadas realizaciones, el locus de metilación dentro del gen ZNF492 comprende ZNF492 '069 (SEQ ID NO: 42).

20 En determinadas realizaciones, el ADN se aísla de sangre o plasma del sujeto humano.

En determinadas realizaciones, el ADN es ADN libre de células del sujeto humano.

25 En determinadas realizaciones, el estado de metilación se determina usando reacción en cadena de la polimerasa cuantitativa (qPCR) (por ejemplo, reacción en cadena de la polimerasa cuantitativa con enzimas de restricción sensibles a la metilación, MSRE-qPCR).

30 En otro aspecto, la invención se refiere a un kit tal como se abarca por la redacción de las reivindicaciones para su uso en la detección (por ejemplo, cribado) de cáncer colorrectal, el kit que comprende: (a) un par de cebadores de oligonucleótidos para la amplificación de un locus de metilación dentro del gen ZNF132; (b) un par de cebadores de oligonucleótidos para la amplificación de un primer locus de metilación dentro del gen ADAMTS2; y (c) un par de cebadores de oligonucleótidos para la amplificación de un segundo locus de metilación dentro del gen ADAMTS2 (por ejemplo, y, opcionalmente, el kit que comprende además al menos una enzima de restricción sensible a la metilación y/o un reactivo de bisulfito y una polimerasa).

40 En determinadas realizaciones, el kit comprende además: (d) un par de cebadores de oligonucleótidos para la amplificación de un locus de metilación dentro del gen ZNF542; y (e) un par de cebadores de oligonucleótidos para la amplificación de un locus de metilación dentro del gen LONRF2.

En determinadas realizaciones, el kit comprende además: (f) un par de cebadores de oligonucleótidos para la amplificación de un locus de metilación dentro del gen ZNF492.

45 En determinadas realizaciones, (a) es un par de cebadores de oligonucleótidos para la amplificación de ZNF132 '415 (par de cebadores SEQ ID NO: 91 y SEQ ID NO: 92).

En determinadas realizaciones, (b) es un par de cebadores de oligonucleótidos para la amplificación de ADAMTS2 '254 (par de cebadores SEQ ID NO: 53 y SEQ ID NO: 54).

50 En determinadas realizaciones, (c) es un par de cebadores de oligonucleótidos para la amplificación de ADAMTS2 '284 (par de cebadores SEQ ID NO: 55 y SEQ ID NO: 56).

En determinadas realizaciones, (d) es un par de cebadores de oligonucleótidos para la amplificación de ZNF542 '502 (par de cebadores SEQ ID NO: 81 y SEQ ID NO: 82).

55 En determinadas realizaciones, (e) es un par de cebadores de oligonucleótidos para la amplificación de LONRF2 '281 (par de cebadores SEQ ID NO: 49 y SEQ ID NO: 50).

60 En determinadas realizaciones, (f) es un par de cebadores de oligonucleótidos para la amplificación de ZNF492 '069 (par de cebadores SEQ ID NO: 95 y SEQ ID NO: 96).

Definiciones

Un o una: los artículos "un" y "una" se usan en el presente documento para referirse a uno o a más de uno (es decir,

a al menos uno) del objeto gramatical del artículo. A modo de ejemplo, “un elemento” se refiere a un elemento o más de un elemento.

Aproximadamente: el término “aproximadamente”, cuando se usa en el presente documento haciendo referencia a un valor, se refiere a un valor que es similar, en contexto, al valor al que se hace referencia. En general, los expertos en la técnica, familiarizados con el contexto, apreciarán el grado relevante de varianza abarcado por “aproximadamente” en ese contexto. Por ejemplo, en algunas realizaciones, por ejemplo, tal como se expone en el presente documento, el término “aproximadamente” puede abarcar un intervalo de valores que están dentro del 25%, 20%, 19%, 18%, 17%, 16%, 15%, 14%, 13%, 12%, 11%, 10%, 9%, 8%, 7%, 6%, 5%, 4%, 3%, 2%, 1%, o con una fracción de un porcentaje, con respecto al valor al que se hace referencia.

Administración: tal como se usa en el presente documento, el término “administración” se refiere normalmente a la administración de una composición a un sujeto o sistema, por ejemplo para lograr el suministro de un agente que es, está incluido en, o se suministra de otro modo por, la composición.

Agente: tal como se usa en el presente documento, el término “agente” se refiere a una entidad (por ejemplo, una molécula pequeña, péptido, polipéptido, ácido nucleico, lípido, polisacárido, complejo, combinación, mezcla, sistema o fenómeno tal como calor, corriente eléctrica, campo eléctrico, fuerza magnética, campo magnético, etc.).

Mejora: tal como se usa en el presente documento, el término “mejora” se refiere a la prevención, reducción, alivio o mejoría de un estado de un sujeto. La mejora incluye, pero no requiere, recuperación completa o prevención completa de una enfermedad, trastorno o estado.

Amplicón o molécula de amplicón: tal como se usa en el presente documento, el término “amplicón” o “molécula de amplicón” se refiere a una molécula de ácido nucleico generada mediante transcripción a partir de una molécula de ácido nucleico de molde, o una molécula de ácido nucleico que tiene una secuencia complementaria a la misma, o un ácido nucleico bicatenario que incluye cualquier molécula de ácido nucleico de este tipo. La transcripción puede iniciarse a partir de un cebador.

Amplificación: tal como se usa en el presente documento, el término “amplificación” se refiere al uso de una molécula de ácido nucleico de molde en combinación con diversos reactivos para generar moléculas de ácido nucleico adicionales a partir de la molécula de ácido nucleico de molde, moléculas de ácido nucleico adicionales que pueden ser idénticas o similares a (por ejemplo, idénticas en al menos el 70%, por ejemplo, idénticas en al menos el 75%, 80%, 85%, 90%, 91%, 92%, 93%, 94%, 95%, 96%, 97%, 98%, 99% o 100% a) un segmento de la molécula de ácido nucleico de molde y/o una secuencia complementaria a la misma.

Mezcla de reacción de amplificación: tal como se usa en el presente documento, los términos “mezcla de reacción de amplificación” o “reacción de amplificación” se refieren a una molécula de ácido nucleico de molde junto con reactivos suficientes para la amplificación de la molécula de ácido nucleico de molde.

Muestra biológica: tal como se usa en el presente documento, el término “muestra biológica” se refiere normalmente a una muestra obtenida o derivada a partir de una fuente biológica (por ejemplo, un tejido u organismo o cultivo celular) de interés, tal como se describe en el presente documento. En algunas realizaciones, por ejemplo, tal como se expone en el presente documento, una fuente biológica es o incluye un organismo, tal como un animal o ser humano. En algunas realizaciones, por ejemplo, tal como se expone en el presente documento, una muestra biológica es o incluye tejido o líquido biológico. En algunas realizaciones, por ejemplo, tal como se expone en el presente documento, una muestra biológica puede ser o incluir células, tejido o líquido corporal. En algunas realizaciones, por ejemplo, tal como se expone en el presente documento, una muestra biológica puede ser o incluir sangre, células sanguíneas, ADN libre de células, ácidos nucleicos flotantes libres, ascitis, muestras de biopsia, muestras quirúrgicas, líquidos corporales que contienen células, esputo, saliva, heces, orina, líquido cefalorraquídeo, líquido peritoneal, líquido pleural, linfa, líquido ginecológicos, secreciones, excreciones, frotis de piel, frotis vaginales, frotis orales, frotis nasales, enjuagues o lavados tales como lavados de conductos o lavados broncoalveolares, aspirados, raspados, médula ósea. En algunas realizaciones, por ejemplo, tal como se expone en el presente documento, una muestra biológica es o incluye células obtenidas de un único sujeto o de una pluralidad de sujetos. Una muestra puede ser una “muestra primaria” obtenida directamente de una fuente biológica, o puede ser una “muestra procesada”. Una muestra biológica también puede denominarse “muestra”.

Biomarcador: tal como se usa en el presente documento, el término “biomarcador”, compatible con su uso en la técnica, se refiere a una entidad cuya presencia, nivel o forma se correlaciona con un acontecimiento biológico o estado de interés particular, de modo que se considera que es un “marcador” de ese acontecimiento o estado. Los expertos en la técnica apreciarán, por ejemplo, en el contexto de un biomarcador de ADN, que un biomarcador puede ser o incluir un locus (tal como uno o más loci de metilación) y/o el estado de un locus (por ejemplo, el estado de uno o más loci de metilación). Por dar tan solo algunos ejemplos de biomarcadores, en algunas realizaciones, por ejemplo, tal como se expone en el presente documento, un biomarcador puede ser o incluir un marcador para una enfermedad, trastorno

o estado particular, o puede ser un marcador de la probabilidad cualitativa o cuantitativa de que pueda desarrollarse, producirse o volver a producirse una enfermedad, trastorno o estado particular, por ejemplo, en un sujeto. En algunas realizaciones, por ejemplo, tal como se expone en el presente documento, un biomarcador puede ser o incluir un marcador para un desenlace terapéutico particular, o probabilidad cualitativa o cuantitativa del mismo. Por tanto, en diversas realizaciones, por ejemplo, tal como se expone en el presente documento, un biomarcador puede ser predictivo, pronóstico y/o diagnóstico, del acontecimiento biológico relevante o estado de interés. Un biomarcador puede ser una entidad de cualquier clase química. Por ejemplo, en algunas realizaciones, por ejemplo, tal como se expone en el presente documento, un biomarcador puede ser o incluir un ácido nucleico, un polipéptido, un lípido, un hidrato de carbono, una molécula pequeña, un agente inorgánico (por ejemplo, un metal o ion) o una combinación de los mismos. En algunas realizaciones, por ejemplo, tal como se expone en el presente documento, un biomarcador es un marcador de superficie celular. En algunas realizaciones, por ejemplo, tal como se expone en el presente documento, un biomarcador es intracelular. En algunas realizaciones, por ejemplo, tal como se expone en el presente documento, un biomarcador se encuentra fuera de las células (por ejemplo, se secreta o se genera de otro modo o está presente fuera de las células, por ejemplo, en un líquido corporal tal como sangre, orina, lágrimas, saliva, líquido cefalorraquídeo y similares). En algunas realizaciones, por ejemplo, tal como se expone en el presente documento, un biomarcador es el estado de metilación de un locus de metilación. En algunos casos, por ejemplo, tal como se expone en el presente documento, un biomarcador puede denominarse "marcador".

Por dar tan solo un ejemplo de un biomarcador, en algunas realizaciones, por ejemplo, tal como se expone en el presente documento, el término se refiere a la expresión de un producto codificado por un gen, cuya expresión es característica de un tumor particular, subclase de tumor, estadio de tumor, etc. Alternativa o adicionalmente, en algunas realizaciones, por ejemplo, tal como se expone en el presente documento, la presencia o nivel de un marcador particular puede correlacionarse con la actividad (o nivel de actividad) de una ruta de señalización particular, por ejemplo, de una ruta de señalización cuya actividad es característica de una clase particular de tumores.

Los expertos en la técnica apreciarán que un biomarcador puede ser determinante de manera individual de un acontecimiento biológico o estado de interés particular, o puede representar o contribuir a una determinación de la probabilidad estadística de un acontecimiento biológico o estado de interés particular. Los expertos en la técnica apreciarán que los marcadores pueden diferir en cuanto a su especificidad y/o sensibilidad con respecto a un acontecimiento biológico o estado de interés particular.

Componente sanguíneo: tal como se usa en el presente documento, el término "componente sanguíneo" se refiere a cualquier componente de sangre completa, incluyendo glóbulos rojos, glóbulos blancos, plasma, plaquetas, células endoteliales, células mesoteliales, células epiteliales y ADN libre de células. Los componentes sanguíneos también incluyen los componentes de plasma, incluyendo proteínas, metabolitos, lípidos, ácidos nucleicos e hidratos de carbono, y cualquier otra célula que pueda estar presente en sangre, por ejemplo, debido a embarazo, trasplante de órganos, infección, lesión o enfermedad.

Cáncer: tal como se usa en el presente documento, los términos "cáncer", "tumor maligno", "neoplasia", "tumor" y "carcinoma" se usan de manera intercambiable para referirse a una enfermedad, trastorno o estado en el que las células muestran o mostraban un crecimiento relativamente anómalo, descontrolado y/o autónomo, de modo que presentan o presentaban una tasa de proliferación anómalamente elevada y/o fenotipo de crecimiento aberrante. En algunas realizaciones, por ejemplo, tal como se expone en el presente documento, un cáncer puede incluir uno o más tumores. En algunas realizaciones, por ejemplo, tal como se expone en el presente documento, un cáncer puede ser o incluir células que son precancerosas (por ejemplo, benignas), malignas, premetastásicas, metastásicas y/o no metastásicas. En algunas realizaciones, por ejemplo, tal como se expone en el presente documento, un cáncer puede ser o incluir un tumor sólido. En algunas realizaciones, por ejemplo, tal como se expone en el presente documento, un cáncer puede ser o incluir un tumor hematológico. En general, ejemplos de diferentes tipos de cánceres conocidos en la técnica incluyen, por ejemplo, cáncer colorrectal, cánceres hematopoyéticos incluyendo leucemias, linfomas (de Hodgkin y no Hodgkin), mielomas y trastornos mieloproliferativos; sarcomas, melanomas, adenomas, carcinomas de tejido sólido, carcinomas de células escamosas de la boca, garganta, laringe y pulmón, cáncer de hígado, cánceres genitourinarios tales como cáncer de próstata, de cuello uterino, de vejiga, uterino y endometrial y carcinomas de células renales, cáncer de hueso, cáncer pancreático, cáncer de piel, melanoma cutáneo o intraocular, cáncer del sistema endocrino, cáncer de la glándula tiroidea, cáncer de la glándula paratiroidea, cánceres de cabeza y cuello, cáncer de mama, cánceres gastrointestinales y cánceres del sistema nervioso, lesiones benignas tales como papilomas, y similares.

Agente quimioterápico: tal como se usa en el presente documento, el término "agente quimioterápico", de manera compatible con su uso en la técnica, se refiere a uno o más agentes que se sabe, o que tiene características que se sabe, que tratan o contribuyen al tratamiento de cáncer. En particular, los agentes quimioterápicos incluyen agentes proapoptóticos, citostáticos y/o citotóxicos. En algunas realizaciones, por ejemplo, tal como se expone en el presente documento, un agente quimioterápico puede ser o incluir agentes alquilantes, antraciclinas, alteradores del citoesqueleto (por ejemplo, restos de direccionamiento a microtúbulos tales como taxanos, maitansina y análogos de los mismos, ofj, epotilonas, inhibidores de histona desacetilasa HDAC), inhibidores de topoisomerasa (por ejemplo,

inhibidores de topoisomerasa I y/o topoisomerasa II), inhibidores de cinasa, análogos de nucleótidos o análogos de precursores de nucleótidos, antibióticos peptídicos, agentes basados en platino, retinoides, alcaloides de la vinca y/o análogos que comparten una actividad antiproliferativa relevante. En algunas realizaciones particulares, por ejemplo, tal como se expone en el presente documento, un agente quimioterápico puede ser o incluir de actinomicina, ácido todo-trans-retínico, una auristatina, azacitidina, azatioprina, bleomicina, bortezomib, carboplatino, capecitabina, cisplatino, clorambucilo, ciclofosfamida, curcumina, citarabina, daunorubicina, docetaxel, doxifluridina, doxorubicina, epirubicina, epotilona, etopósido, fluorouracilo, gemcitabina, hidroxiurea, idarubicina, imatinib, irinotecán, maitansina y/o análogos de la misma (por ejemplo, DM1), mecloretamina, mercaptopurina, metotrexato, mitoxantrona, un maitansinoide, oxaliplatino, paclitaxel, pemetrexed, tenipósido, tioguanina, topotecán, valrubicina, vinblastina, vincristina, vindesina, vinorelbina o una combinación de los mismos. En algunas realizaciones, por ejemplo, tal como se expone en el presente documento, un agente quimioterápico puede usarse en el contexto de un conjugado de anticuerpo-fármaco. En algunas realizaciones, por ejemplo, tal como se expone en el presente documento, un agente quimioterápico es uno encontrado en un conjugado de anticuerpo-fármaco seleccionado del grupo que consiste en: hLL1-doxorubicina, hRS7-SN-38, hMN-14-SN-38, hLL2-SN-38, hA20-SN-38, hPAM4-SN-38, hLL1-SN-38, hRS7-Pro-2-P-Dox, hMN-14-Pro-2-P-Dox, hLL2-Pro-2-P-Dox, hA20-Pro-2-P-Dox, hPAM4-Pro-2-P-Dox, hLL1-Pro-2-P-Dox, P4/D10-doxorubicina, gemtuzumab ozogamicina, brentuximab-vedotina, trastuzumab-emtansina, inotuzumab-ozogamicina, glembatumomab-vedotina, SAR3419, SAR566658, BIIB015, BT062, SGN-75, SGN-CD19A, AMG-172, AMG-595, BAY-94-9343, ASG-5ME, ASG-22ME, ASG-16M8F, MDX-1203, MLN-0264, anticuerpo anti-PSMAADC, RG-7450, RG-7458, RG-7593, RG-7596, RG-7598, RG-7599, RG-7600, RG-7636, ABT-414, IMGN-853, IMGN-529, vorsetuzumab-mafodotina y lorvotuzumab-mertansina. En algunas realizaciones, por ejemplo, tal como se expone en el presente documento, un agente quimioterápico puede ser o comprender ácido farnesil-tiosalicílico (FTS), 4-(4-cloro-2-metilfenoxi)-N-hidroxi-butanamida (CMH), estradiol (E2), tetrametoxiestilbeno (TMS), δ -tocatrienol, salinomycin o curcumina.

Terapia de combinación: tal como se usa en el presente documento, el término "terapia de combinación" se refiere a la administración a un sujeto de dos o más agentes o pautas de tal manera que los dos o más agentes o pautas juntos tratan una enfermedad, estado o trastorno del sujeto. En algunas realizaciones, por ejemplo, tal como se expone en el presente documento, los dos o más agentes terapéuticos o pautas pueden administrarse de manera simultánea, secuencial o en pautas posológicas solapantes. Los expertos en la técnica apreciarán que la terapia de combinación incluye, pero no requiere, que los dos agentes o pautas se administren juntos en una única composición, ni al mismo tiempo.

Comparable: tal como se usa en el presente documento, el término "comparable" se refiere a miembros dentro de conjuntos de dos o más condiciones, circunstancias, agentes, entidades, poblaciones, etc., que pueden no ser idénticos entre sí pero que son lo suficientemente similares como para permitir la comparación entre los mismos, de tal manera que un experto en la técnica apreciará que pueden extraerse de manera razonable conclusiones basándose en diferencias o similitudes observadas. En algunas realizaciones, por ejemplo, tal como se expone en el presente documento, conjuntos comparables de condiciones, circunstancias, agentes, entidades, poblaciones, etc., se caracterizan normalmente por una pluralidad de características sustancialmente idénticas y ninguna, una o una pluralidad de características diferentes. Los expertos habituales en la técnica entenderán, en el contexto, qué grado de identidad se requiere para hacer que miembros de un conjunto sean comparables. Por ejemplo, los expertos habituales en la técnica apreciarán que miembros de conjuntos de condiciones, circunstancias, agentes, entidades, poblaciones, etc., son comparables entre sí cuando están caracterizados por un número y tipo suficientes de características sustancialmente idénticas como para justificar una conclusión razonable de que diferencias observadas pueden atribuirse en su totalidad o en parte a características no idénticas de los mismos.

Resto detectable: el término "resto detectable" tal como se usa en el presente documento se refiere a cualquier elemento, molécula, grupo funcional, compuesto, fragmento u otro resto que puede detectarse. En algunas realizaciones, por ejemplo, tal como se expone en el presente documento, un resto detectable se proporciona o se usa solo. En algunas realizaciones, por ejemplo, tal como se expone en el presente documento, un resto detectable se proporciona y/o se usa en asociación con (por ejemplo, unido a) otro agente. Los ejemplos de restos detectables incluyen, pero no se limitan a, diversos ligandos, radionúclidos (por ejemplo, ^3H , ^{14}C , ^{18}F , ^{19}F , ^{32}P , ^{35}S , ^{135}I , ^{125}I , ^{123}I , ^{64}Cu , ^{187}Re , ^{111}In , ^{90}Y , $^{99\text{m}}\text{Tc}$, ^{177}Lu , ^{89}Zr , etc.), colorantes fluorescentes, agentes quimioluminiscentes, agentes bioluminiscentes, nanocristales de semiconductores fluorescentes inorgánicos que pueden resolverse espectralmente (es decir, puntos cuánticos), nanopartículas de metal, nanoagrupaciones, iones de metales paramagnéticos, enzimas, etiquetas colorimétricas, biotina, dioxigenina, haptenos y proteínas para los que están disponibles antisueros o anticuerpos monoclonales.

Diagnóstico: tal como se usa en el presente documento, el término "diagnóstico" se refiere a determinar si, y/o la probabilidad cualitativa o cuantitativa de que, un sujeto tenga o vaya a desarrollar una enfermedad, trastorno, afección o estado. Por ejemplo, en el diagnóstico del cáncer, el diagnóstico puede incluir una determinación referente al riesgo, tipo, estadio, tumor maligno u otra clasificación de un cáncer. En algunos casos, por ejemplo, tal como se expone en el presente documento, un diagnóstico puede ser o incluir una determinación referente al pronóstico y/o respuesta probable frente a uno o más agentes terapéuticos o pautas generales o particulares.

Información de diagnóstico: tal como se usa en el presente documento, el término “información de diagnóstico” se refiere a información útil para proporcionar un diagnóstico. La información de diagnóstico puede incluir, sin limitación, información de estado de biomarcador.

5 Diferencialmente metilado: tal como se usa en el presente documento, el término “diferencialmente metilado” describe un sitio de metilación para el que el estado de metilación difiere entre una primera condición y una segunda condición. Un sitio de metilación que está diferencialmente metilado puede decirse que es un sitio diferencialmente metilado. En algunos casos, por ejemplo, tal como se expone en el presente documento, una DMR se define mediante el amplicón producido mediante amplificación usando cebadores de oligonucleótidos, por ejemplo, un par de cebadores de oligonucleótidos seleccionados para la amplificación de la DMR o para la amplificación de una región de ADN de interés presente en el amplicón. En algunos casos, por ejemplo, tal como se expone en el presente documento, una DMR se define como una región de ADN amplificada mediante un par de cebadores de oligonucleótidos, incluyendo la región que tiene la secuencia de, o una secuencia complementaria a, los cebadores de oligonucleótidos. En algunos casos, por ejemplo, tal como se expone en el presente documento, una DMR se define como una región de ADN amplificada mediante un par de cebadores de oligonucleótidos, excluyendo la región que tiene la secuencia de, o una secuencia complementaria a, los cebadores de oligonucleótidos. Tal como se usa en el presente documento, una DMR específicamente proporcionada puede identificarse de manera inequívoca mediante el nombre de un gen asociado seguido por tres dígitos de una posición de inicio, de tal manera que, por ejemplo, una DMR que empieza en la posición 29921434 de ALK puede identificarse como ALK '434.

Región diferencialmente metilada: tal como se usa en el presente documento, el término “región diferencialmente metilada” (DMR) se refiere a una región de ADN que incluye uno o más sitios diferencialmente metilados. Una DMR que incluye un mayor número o frecuencia de sitios metilados en una condición de interés seleccionada, tal como un estado canceroso, puede denominarse DMR de hipermetilación. Una DMR que incluye un menor número o frecuencia de sitios metilados en una condición de interés seleccionada, tal como un estado canceroso, puede denominarse DMR de hipometilación. Una DMR que es un biomarcador de metilación para cáncer colorrectal puede denominarse DMR de cáncer colorrectal. En algunos casos, por ejemplo, tal como se expone en el presente documento, una DMR puede ser un único nucleótido, único nucleótido que es un sitio de metilación. En algunos casos, por ejemplo, tal como se expone en el presente documento, una DMR tiene una longitud de al menos 10, al menos 15, al menos 20, al menos 24, al menos 50 o al menos 75 pares de bases. En algunos casos, por ejemplo, tal como se expone en el presente documento, una DMR tiene una longitud de menos de 1000, menos de 750, menos de 500, menos de 350, menos de 300 o menos de 250 pares de bases (por ejemplo, en la que el estado de metilación se determina usando reacción en cadena de la polimerasa cuantitativa (qPCR), por ejemplo, reacción en cadena de la polimerasa cuantitativa con enzimas de restricción sensibles a la metilación (MSRE-qPCR)). En algunos casos, por ejemplo, tal como se expone en el presente documento, una DMR que es un biomarcador de metilación para detectar adenoma avanzado también puede ser útil en la identificación de cáncer colorrectal.

Región de ADN: tal como se usa en el presente documento, “región de ADN” se refiere a cualquier porción contigua de una molécula de ADN más grande. Los expertos en la técnica estarán familiarizados con técnicas para determinar si una primera región de ADN y una segunda región de ADN corresponde, basándose, por ejemplo, en la similitud de secuencia (por ejemplo, identidad u homología de secuencia) de la primera y segunda regiones de ADN y/o contexto (por ejemplo, la identidad u homología de secuencia de ácidos nucleicos en el sentido de 5' y/o en el sentido de 3' de la primera y segunda regiones de ADN).

Salvo según se especifique de otro modo en el presente documento, las secuencias encontradas en o relacionadas con seres humanos (por ejemplo, que se hibridan a ADN humano) se encuentran en, basándose en y/o se derivan de la secuencia de genoma humano representativa de ejemplo habitualmente denominada, y conocida por los expertos en la técnica como, conjunto de genoma de *Homo sapiens* (humano) GRCh38, hg38 y/o versión de consorcio de referencia del genoma humano 38. Los expertos en la técnica apreciarán además que las regiones de ADN de hg38 pueden denominarse mediante un sistema conocido que incluye la identificación de posiciones de nucleótido particulares o intervalos de las mismas según una numeración asignada.

Pauta posológica: tal como se usa en el presente documento, el término “pauta posológica” puede referirse a un conjunto de una o más dosis unitarias iguales o diferentes administradas a un sujeto, normalmente incluyendo una administración de una pluralidad de dosis unitarias cada una de las cuales está separada de la administración de las otras por un periodo de tiempo. En diversas realizaciones, por ejemplo, tal como se expone en el presente documento, una o más o la totalidad de las dosis unitarias de una pauta posológica pueden ser iguales o pueden variar (por ejemplo, aumentar a lo largo del tiempo, disminuir a lo largo del tiempo o ajustarse según el sujeto y/o la determinación de un profesional médico). En diversas realizaciones, por ejemplo, tal como se expone en el presente documento, uno o más o la totalidad de los periodos de tiempo entre cada dosis pueden ser iguales o pueden variar (por ejemplo, aumentar a lo largo del tiempo, disminuir a lo largo del tiempo o ajustarse según el sujeto y/o la determinación de un profesional médico). En algunas realizaciones, por ejemplo, tal como se expone en el presente documento, un agente terapéutico dado tiene una pauta posológica recomendada, que puede implicar una o más dosis. Normalmente, los expertos en la técnica conocen al menos una pauta posológica recomendada de un fármaco comercializado. En

algunas realizaciones, por ejemplo, tal como se expone en el presente documento, una pauta posológica está correlacionada con un desenlace deseado o beneficioso cuando se administra a lo largo de una población relevante (es decir, es una pauta posológica terapéutica).

- 5 En el sentido de 3': tal como se usa en el presente documento, el término "en el sentido de 3'" significa que una primera región de ADN está más cerca, con respecto a una segunda región de ADN, del extremo C-terminal de un ácido nucleico que incluye la primera región de ADN y la segunda región de ADN.

10 Gen: tal como se usa en el presente documento, el término "gen" se refiere a una única región de ADN, por ejemplo, en un cromosoma, que incluye una secuencia codificante que codifica para un producto (por ejemplo, un producto de ARN y/o un producto de polipéptido), junto con la totalidad, algunas o ninguna de las secuencias de ADN que contribuyen a la regulación de la expresión de la secuencia codificante. En algunas realizaciones, por ejemplo, tal como se expone en el presente documento, un gen incluye una o más secuencias no codificantes. En algunas realizaciones particulares, por ejemplo, tal como se expone en el presente documento, un gen incluye secuencias exónicas e intrónicas. En algunas realizaciones, por ejemplo, tal como se expone en el presente documento, un gen incluye uno o más elementos reguladores que, por ejemplo, pueden controlar o tener un impacto sobre uno o más aspectos de la expresión génica (por ejemplo, expresión específica de tipo de célula, expresión inducible, etc.). En algunas realizaciones, por ejemplo, tal como se expone en el presente documento, un gen incluye un promotor. En algunas realizaciones, por ejemplo, tal como se expone en el presente documento, un gen incluye uno o ambos de (i) nucleótidos de ADN que se extienden un número predeterminado de nucleótidos en el sentido de 5' de la secuencia codificante y (ii) nucleótidos de ADN que se extienden un número predeterminado de nucleótidos en el sentido de 3' de la secuencia codificante. En diversas realizaciones, por ejemplo, tal como se expone en el presente documento, el número predeterminado de nucleótidos puede ser de 500 pb, 1 kb, 2 kb, 3 kb, 4 kb, 5 kb, 10 kb, 20 kb, 30 kb, 40 kb, 50 kb, 75 kb o 100 kb.

25 Homología: tal como se usa en el presente documento, el término "homología" se refiere a la relación global entre moléculas poliméricas, por ejemplo, entre moléculas de ácido nucleico (por ejemplo, moléculas de ADN y/o moléculas de ARN) y/o entre moléculas de polipéptidos. Los expertos en la técnica apreciarán que la homología puede definirse, por ejemplo, mediante una identidad en porcentaje o mediante una homología en porcentaje (similitud de secuencia). En algunas realizaciones, por ejemplo, tal como se expone en el presente documento, se considera que moléculas poliméricas son "homólogas" entre sí si sus secuencias son idénticas en al menos el 25%, 30%, 35%, 40%, 45%, 50%, 55%, 60%, 65%, 70%, 75%, 80%, 85%, 90%, 95% o 99%. En algunas realizaciones, por ejemplo, tal como se expone en el presente documento, se considera que moléculas poliméricas son "homólogas" entre sí si sus secuencias son similares en al menos el 25%, 30%, 35%, 40%, 45%, 50%, 55%, 60%, 65%, 70%, 75%, 80%, 85%, 90%, 95% o 99%.

35 Hibridar: tal como se usa en el presente documento, "hibridar" se refiere a la asociación de un primer ácido nucleico con un segundo ácido nucleico para formar una estructura bicatenaria, asociación que se produce mediante emparejamiento complementario de nucleótidos. Los expertos en la técnica reconocerán que las secuencias complementarias, entre otras, pueden hibridarse. En diversas realizaciones, por ejemplo, tal como se expone en el presente documento, la hibridación puede producirse, por ejemplo, entre secuencias de nucleótidos que tienen una complementariedad de al menos el 70%, por ejemplo, una complementariedad de al menos el 75%, 80%, 85%, 90%, 91%, 92%, 93%, 94%, 95%, 96%, 97%, 98%, 99% o 100%. Los expertos en la técnica apreciarán además que si la hibridación de un primer ácido nucleico y un segundo ácido nucleico se produce o no se produce puede depender de diversas condiciones de reacción. En la técnica se conocen condiciones en las que puede producirse la hibridación.

45 Hipometilación: tal como se usa en el presente documento, el término "hipometilación" se refiere a el estado de un locus de metilación que tiene al menos un nucleótido metilado menos en un estado de interés en comparación con un estado de referencia (por ejemplo, al menos un nucleótido metilado menos en cáncer colorrectal que en control sano).

50 Hipermetilación: tal como se usa en el presente documento, el término "hipermetilación" se refiere a el estado de un locus de metilación que tiene al menos un nucleótido metilado más en un estado de interés en comparación con un estado de referencia (por ejemplo, al menos un nucleótido metilado más en cáncer colorrectal que en control sano).

55 Identidad, idéntico: tal como se usa en el presente documento, los términos "identidad" e "idéntico" se refieren a la relación global entre moléculas poliméricas, por ejemplo, entre moléculas de ácido nucleico (por ejemplo, moléculas de ADN y/o moléculas de ARN) y/o entre moléculas de polipéptidos. En la técnica se conocen métodos para el cálculo de una identidad en porcentaje tal como entre dos secuencias proporcionadas. El cálculo de la identidad en porcentaje de dos secuencias de ácido nucleico o polipéptido, por ejemplo, puede realizarse alineando las dos secuencias (o el complemento de una o ambas secuencias) con fines de comparación óptima (por ejemplo, pueden introducirse huecos en una o ambas de una primera y una segunda secuencias para alineación óptima y pueden ignorarse secuencias no idénticas con fines de comparación). Entonces se comparan los nucleótidos o aminoácidos en posiciones correspondientes. Cuando una posición en la primera secuencia está ocupada por el mismo residuo (por ejemplo, nucleótido o aminoácido) que la posición correspondiente en la segunda secuencia, entonces las moléculas son idénticas en esa posición. La identidad en porcentaje entre las dos secuencias es una función del número de

posiciones idénticas compartidas por las secuencias y, opcionalmente, teniendo en cuenta el número de huecos y la longitud de cada hueco, que puede ser necesario introducir para una alineación óptima de las dos secuencias. La comparación de secuencias y determinación de identidad en porcentaje entre dos secuencias puede lograrse usando un algoritmo informático, tal como BLAST (herramienta de búsqueda de alineación local básica).

“Mejorado”, “aumentado” o “reducido”: tal como se usa en el presente documento, estos términos, o términos comparativos gramaticalmente comparables, indican valores que son con respecto a una medida de referencia comparable. Por ejemplo, en algunas realizaciones, por ejemplo, tal como se expone en el presente documento, un valor evaluado alcanzado con un agente de interés puede estar “mejorado” con respecto al obtenido con un agente de referencia comparable o sin agente. Alternativa o adicionalmente, en algunas realizaciones, por ejemplo, tal como se expone en el presente documento, un valor evaluado en un sujeto o sistema de interés puede estar “mejorado” con respecto al obtenido en el mismo sujeto o sistema en condiciones diferentes o en un punto diferente en el tiempo (por ejemplo, antes o después de un acontecimiento tal como la administración de un agente de interés), o en un sujeto comparable diferente (por ejemplo, en un sujeto o sistema comparable que difiere del sujeto o sistema de interés en cuanto a la presencia de uno o más indicadores de una enfermedad, trastorno o estado de interés particular, o en cuanto a la exposición previa a una condición o agente, etc.). En algunas realizaciones, por ejemplo, tal como se expone en el presente documento, los términos comparativos se refieren a diferencias estadísticamente relevantes (por ejemplo, diferencias de una prevalencia y/o magnitud suficiente como para alcanzar relevancia estadística). Los expertos en la técnica conocerán, o podrán determinar fácilmente, en un contexto dado, un grado y/o prevalencia de diferencia que se requiere o es suficiente para alcanzar tal significación estadística.

Metilación: tal como se usa en el presente documento, el término “metilación” incluye metilación en cualquiera de (i) posición C5 de citosina; (ii) posición N4 de citosina; y (iii) posición N6 de adenina. La metilación también incluye (iv) otros tipos de metilación de nucleótido. Un nucleótido que está metilado puede denominarse “nucleótido metilado” o “base de nucleótido metilada”. En determinadas realizaciones, por ejemplo, tal como se expone en el presente documento, la metilación se refiere específicamente a metilación de residuos de citosina. En algunos casos, la metilación se refiere específicamente a metilación de residuos de citosina presentes en sitios de CpG.

Ensayo de metilación: tal como se usa en el presente documento, el término “ensayo de metilación” se refiere a cualquier técnica que puede usarse para determinar el estado de metilación de un locus de metilación.

Biomarcador de metilación: tal como se usa en el presente documento, el término “biomarcador de metilación” se refiere a un biomarcador que es o incluye al menos un locus de metilación y/o el estado de metilación de al menos un locus de metilación, por ejemplo, un locus hipermetilado. En particular, un biomarcador de metilación es un biomarcador caracterizado por un cambio entre un primer estado y un segundo estado (por ejemplo, entre un estado canceroso y un estado no canceroso) en el estado de metilación de uno o más loci de ácido nucleico.

Locus de metilación: tal como se usa en el presente documento, el término “locus de metilación” se refiere a una región de ADN que incluye al menos una región diferencialmente metilada. Un locus de metilación que incluye un mayor número o frecuencia de sitios metilados en una condición de interés seleccionada, tal como un estado canceroso, puede denominarse locus hipermetilado. Un locus de metilación que incluye un menor número o frecuencia de sitios metilados en una condición de interés seleccionada, tal como un estado canceroso, puede denominarse locus hipometilado. En algunos casos, por ejemplo, tal como se expone en el presente documento, un locus de metilación tiene una longitud de al menos 10, al menos 15, al menos 20, al menos 24, al menos 50 o al menos 75 pares de bases. En algunos casos, por ejemplo, tal como se expone en el presente documento, un locus de metilación tiene una longitud de menos de 1000, menos de 750, menos de 500, menos de 350, menos de 300 o menos de 250 pares de bases (por ejemplo, en la que el estado de metilación se determina usando reacción en cadena de la polimerasa cuantitativa (qPCR), por ejemplo, reacción en cadena de la polimerasa cuantitativa con enzimas de restricción sensibles a la metilación (MSRE-qPCR)).

Sitio de metilación: tal como se usa en el presente documento, un sitio de metilación se refiere a un nucleótido o posición de nucleótido que se metila en al menos una condición. En su estado metilado, un sitio de metilación puede denominarse sitio metilado.

Estado de metilación: tal como se usa en el presente documento, “estatus de metilación”, “metilación estado” o “perfil de metilación” se refieren al número, frecuencia o patrón de metilación en sitios de metilación dentro de un locus de metilación. Por consiguiente, un cambio en el estado de metilación entre un primer estado y un segundo estado puede ser o incluir un aumento del número, frecuencia o patrón de sitios metilados, o puede ser o incluir una disminución del número, frecuencia o patrón de sitios metilados. En diversos casos, un cambio en el estado de metilación es un cambio en el valor de metilación.

Valor de metilación: tal como se usa en el presente documento, el término “valor de metilación” se refiere a una representación numérica de un estado de metilación, por ejemplo, en forma de número que representa la frecuencia o razón de metilación de un locus de metilación. En algunos casos, por ejemplo, tal como se expone en el presente

documento, un valor de metilación puede generarse mediante un método que incluye cuantificar la cantidad de ácido nucleico intacto presente en una muestra tras la digestión de restricción de la muestra con una enzima de restricción dependiente de la metilación. En algunos casos, por ejemplo, tal como se expone en el presente documento, puede generarse un valor de metilación mediante un método que incluye comparar perfiles de amplificación tras una reacción con bisulfito de una muestra. En algunos casos, por ejemplo, tal como se expone en el presente documento, un valor de metilación puede generarse comparando secuencias de ácidos nucleicos tratados con bisulfito y no tratados. En algunos casos, por ejemplo, tal como se expone en el presente documento, un valor de metilación es, incluye o se basa en un resultado de PCR cuantitativa.

Ácido nucleico: tal como se usa en el presente documento, en su sentido más amplio, el término "ácido nucleico" se refiere a cualquier compuesto y/o sustancia que se incorpora o puede incorporarse en una cadena de oligonucleótido. En algunas realizaciones, por ejemplo, tal como se expone en el presente documento, un ácido nucleico es un compuesto y/o sustancia que se incorpora o puede incorporarse en una cadena de oligonucleótido mediante una unión fosfodiéster. Tal como quedará claro a partir del contexto, en algunas realizaciones, por ejemplo, tal como se expone en el presente documento, el término ácido nucleico se refiere a un residuo de ácido nucleico individual (por ejemplo, un nucleótido y/o nucleósido), y en algunas realizaciones, por ejemplo, tal como se expone en el presente documento se refiere a una cadena de polinucleótido que comprende una pluralidad de residuos de ácido nucleico individuales. Un ácido nucleico puede ser o incluir ADN, ARN o una combinación de los mismos. Un ácido nucleico puede incluir residuos de ácido nucleico naturales, análogos de ácido nucleico y/o residuos sintéticos. En algunas realizaciones, por ejemplo, tal como se expone en el presente documento, un ácido nucleico incluye nucleótidos naturales (por ejemplo, adenosina, timidina, guanosina, citidina, uridina, desoxiadenosina, desoxitimidina, desoxiguanosina y desoxicitidina). En algunas realizaciones, por ejemplo, tal como se expone en el presente documento, un ácido nucleico es o incluye uno o más análogos de nucleótido (por ejemplo, 2-aminoadenosina, 2-tiotimidina, inosina, pirrolo-pirimidina, 3-metil-adenosina, 5-metilcitidina, C-5-propinil-citidina, C-5-propinil-uridina, 2-aminoadenosina, C5-bromouridina, C5-fluorouridina, C5-yodouridina, C5-propinil-uridina, C5-propinil-citidina, C5-metilcitidina, 2-aminoadenosina, 7-desazaadenosina, 7-desazaguanosina, 8-oxoadenosina, 8-oxoguanosina, 0(6)-metilguanina, 2-tiocitidina, bases metiladas, bases intercaladas y combinaciones de los mismos).

En algunas realizaciones, por ejemplo, tal como se expone en el presente documento, un ácido nucleico tiene una secuencia de nucleótidos que codifica para un producto génico funcional tal como un ARN o proteína. En algunas realizaciones, por ejemplo, tal como se expone en el presente documento, un ácido nucleico incluye uno o más intrones. En algunas realizaciones, por ejemplo, tal como se expone en el presente documento, un ácido nucleico incluye uno o más genes. En algunas realizaciones, por ejemplo, tal como se expone en el presente documento, se preparan ácidos nucleicos mediante uno o más de aislamiento a partir de una fuente natural, síntesis enzimática mediante polimerización basándose en un molde complementario (*in vivo* o *in vitro*), reproducción en una célula o sistema recombinante y síntesis química.

En algunas realizaciones, por ejemplo, tal como se expone en el presente documento, un análogo de ácido nucleico difiere de un ácido nucleico en que no usa una estructura principal de fosfodiéster. Por ejemplo, en algunas realizaciones, por ejemplo, tal como se expone en el presente documento, un ácido nucleico puede incluir uno o más ácidos nucleicos peptídicos, que se conocen en la técnica y tienen enlaces peptídicos en lugar de enlaces de fosfodiéster en la estructura principal. Alternativa o adicionalmente, en algunas realizaciones, por ejemplo, tal como se expone en el presente documento, un ácido nucleico tiene una o más uniones de fosforotioato y/o 5'-N-fosforamidita en vez de enlaces de fosfodiéster. En algunas realizaciones, por ejemplo, tal como se expone en el presente documento, un ácido nucleico comprende uno o más azúcares modificados (por ejemplo, 2'-fluororribosa, ribosa, 2'-desoxirribosa, arabinosa y hexosa) en comparación con aquellos en ácidos nucleicos naturales.

En algunas realizaciones, por ejemplo, tal como se expone en el presente documento, un ácido nucleico es o incluye al menos 3, 4, 5, 6, 7, 8, 9, 10, 15, 20, 25, 30, 35, 40, 45, 50, 55, 60, 65, 70, 75, 80, 85, 90, 95, 100, 110, 120, 130, 140, 150, 160, 170, 180, 190, 200, 225, 250, 275, 300, 325, 350, 375, 400, 425, 450, 475, 500, 600, 700, 800, 900, 1000, 1500, 2000, 2500, 3000, 3500, 4000, 4500, 5000 o más residuos. En algunas realizaciones, por ejemplo, tal como se expone en el presente documento, un ácido nucleico es parcial o completamente monocatenario, o parcial o completamente bicatenario.

Ensayo de detección de ácido nucleico: tal como se usa en el presente documento, el término "ensayo de detección de ácido nucleico" se refiere a cualquier método de determinación de la composición de nucleótidos de un ácido nucleico de interés. Los ensayos de detección de ácido nucleico incluyen, pero no se limitan a, métodos de secuenciación de ADN, métodos basados en reacción en cadena de la polimerasa, métodos de hibridación de sonda, reacción en cadena de la ligasa, etc.

Nucleótido: tal como se usa en el presente documento, el término "nucleótido" se refiere a un componente estructural, o elemento estructural, de polinucleótidos, por ejemplo, de polímeros de ADN y/o ARN. Un nucleótido incluye una base (por ejemplo, adenina, timina, uracilo, guanina o citosina) y una molécula de azúcar y al menos un grupo fosfato. Tal como se usa en el presente documento, un nucleótido puede ser un nucleótido metilado o un nucleótido no metilado.

Los expertos en la técnica apreciarán que la terminología de ácido nucleico, tal como, por ejemplo, "locus" o "nucleótido", puede referirse a un locus o nucleótido de una única molécula de ácido nucleico y/o a la población acumulativa de loci o nucleótidos dentro de una pluralidad de ácidos nucleicos (por ejemplo, una pluralidad de ácidos nucleicos en una muestra y/o representativa de un sujeto) que son representativos del locus o nucleótido (por ejemplo, que tienen la misma secuencia de ácido nucleico y/o contexto de secuencia de ácido nucleico idéntico, o que tienen una secuencia de ácido nucleico y/o contexto de ácido nucleico sustancialmente idéntico).

Cebador de oligonucleótido: tal como se usa en el presente documento, el término cebador de oligonucleótido, o cebador, se refiere a una molécula de ácido nucleico usada, que puede usarse, o para su uso en, la generación de amplicones a partir de una molécula de ácido nucleico de molde. En condiciones que permiten la transcripción (por ejemplo, en presencia de nucleótidos y una ADN polimerasa, y a una temperatura y pH adecuados), un cebador de oligonucleótido puede proporcionar un punto de inicio de la transcripción a partir de un molde al que se hibrida el cebador de oligonucleótido. Normalmente, un cebador de oligonucleótido es un ácido nucleico monocatenario de entre 5 y 200 nucleótidos de longitud. Los expertos en la técnica apreciarán que la longitud de cebador óptima para generar amplicones a partir de una molécula de ácido nucleico de molde puede variar con las condiciones incluyendo parámetros de temperatura, composición de cebador y método de transcripción o amplificación. Un par de cebadores de oligonucleótidos, tal como se usa en el presente documento, se refiere a un conjunto de dos cebadores de oligonucleótidos que son respectivamente complementarios a una primera cadena y una segunda cadena de una molécula de ácido nucleico bicatenario de molde. El primer y segundo miembros de un par de cebadores de oligonucleótidos pueden denominarse cebador de oligonucleótido "directo" y cebador de oligonucleótido "inverso", respectivamente, con respecto a una cadena de ácido nucleico de molde, ya que el cebador de oligonucleótido directo puede hibridarse con una cadena de ácido nucleico complementaria a la cadena de ácido nucleico de molde, el cebador de oligonucleótido inverso puede hibridarse con la cadena de ácido nucleico de molde, y la posición del cebador de oligonucleótido directo con respecto a la cadena de ácido nucleico de molde está en 5' de la posición de la secuencia cebador de oligonucleótido inverso con respecto a la cadena de ácido nucleico de molde. Los expertos en la técnica entenderán que la identificación de un primer y segundo cebadores de oligonucleótidos como cebadores de oligonucleótidos directo e inverso, respectivamente, es arbitraria en la medida en que estos identificadores dependen de si se usa una cadena de ácido nucleico dada o su complemento como molécula de ácido nucleico de molde.

Solapamiento: el término "solapamiento" se usa en el presente documento haciendo referencia a dos regiones de ADN, cada una de las cuales contiene una secuencia secundaria que es sustancialmente idéntica a una secuencia secundaria de la misma longitud en la otra región (por ejemplo, las dos regiones de ADN tienen una secuencia secundaria común). "Sustancialmente idéntico" significa que las dos secuencias secundarias de igual longitud difieren en menos que un número dado de pares de bases. En algunos casos, por ejemplo, tal como se expone en el presente documento, cada secuencia secundaria tiene una longitud de al menos 20 pares de bases que difieren en menos de 4, 3, 2 o 1 pares de bases una de otra (por ejemplo, teniendo las dos secuencias secundarias al menos el 80%, al menos el 85%, al menos el 90%, al menos el 95% de similitud, al menos el 97% de similitud, al menos el 98% de similitud, al menos el 99% de similitud o al menos el 99,5% de similitud). En algunos casos, por ejemplo, tal como se expone en el presente documento, cada secuencia secundaria tiene una longitud de al menos 24 pares de bases que difieren en menos de 5, 4, 3, 2 o 1 pares de bases (por ejemplo, teniendo las dos secuencias secundarias al menos el 80%, al menos el 85%, al menos el 90%, al menos el 95% de similitud, al menos el 97% de similitud, al menos el 98% de similitud, al menos el 99% de similitud o al menos el 99,5% de similitud). En algunos casos, por ejemplo, tal como se expone en el presente documento, cada secuencia secundaria tiene una longitud de al menos 50 pares de bases que difieren en menos de 10, 9, 8, 7, 6, 5, 4, 3, 2 o 1 pares de bases (por ejemplo, teniendo las dos secuencias secundarias al menos el 80%, al menos el 85%, al menos el 90%, al menos el 95% de similitud, al menos el 97% de similitud, al menos el 98% de similitud, al menos el 99% de similitud o al menos el 99,5% de similitud). En algunos casos, por ejemplo, tal como se expone en el presente documento, cada secuencia secundaria tiene una longitud de al menos 100 pares de bases que difieren en menos de 20, 15, 10, 9, 8, 7, 6, 5, 4, 3, 2 o 1 pares de bases (por ejemplo, teniendo las dos secuencias secundarias al menos el 80%, al menos el 85%, al menos el 90%, al menos el 95% de similitud, al menos el 97% de similitud, al menos el 98% de similitud, al menos el 99% de similitud o al menos el 99,5% de similitud). En algunos casos, por ejemplo, tal como se expone en el presente documento, cada secuencia secundaria tiene una longitud de al menos 200 pares de bases que difieren en menos de 40, 30, 20, 15, 10, 9, 8, 7, 6, 5, 4, 3, 2 o 1 pares de bases (por ejemplo, teniendo las dos secuencias secundarias al menos el 80%, al menos el 85%, al menos el 90%, al menos el 95% de similitud, al menos el 97% de similitud, al menos el 98% de similitud, al menos el 99% de similitud o al menos el 99,5% de similitud). En algunos casos, por ejemplo, tal como se expone en el presente documento, cada secuencia secundaria tiene una longitud de al menos 250 pares de bases que difieren en menos de 50, 40, 30, 20, 15, 10, 9, 8, 7, 6, 5, 4, 3, 2 o 1 pares de bases (por ejemplo, teniendo las dos secuencias secundarias al menos el 80%, al menos el 85%, al menos el 90%, al menos el 95% de similitud, al menos el 97% de similitud, al menos el 98% de similitud, al menos el 99% de similitud o al menos el 99,5% de similitud). En algunos casos, por ejemplo, tal como se expone en el presente documento, cada secuencia secundaria tiene una longitud de al menos 300 pares de bases que difieren en menos de 60, 50, 40, 30, 20, 15, 10, 9, 8, 7, 6, 5, 4, 3, 2 o 1 pares de bases (por ejemplo, teniendo las dos secuencias secundarias al menos el 80%, al menos el 85%, al menos el 90%, al menos el 95% de similitud, al menos el 97% de similitud, al menos el 98% de similitud, al menos el 99% de similitud o al menos el 99,5% de similitud).

al menos el 99,5% de similitud). En algunos casos, por ejemplo, tal como se expone en el presente documento, cada secuencia secundaria tiene una longitud de al menos 500 pares de bases que difieren en menos de 100, 60, 50, 40, 30, 20, 15, 10, 9, 8, 7, 6, 5, 4, 3, 2 o 1 pares de bases (por ejemplo, teniendo las dos secuencias secundarias al menos el 80%, al menos el 85%, al menos el 90%, al menos el 95% de similitud, al menos el 97% de similitud, al menos el 98% de similitud, al menos el 99% de similitud o al menos el 99,5% de similitud). En algunos casos, por ejemplo, tal como se expone en el presente documento, cada secuencia secundaria tiene una longitud de al menos 1000 pares de bases que difieren en menos de 200, 100, 60, 50, 40, 30, 20, 15, 10, 9, 8, 7, 6, 5, 4, 3, 2 o 1 pares de bases (por ejemplo, teniendo las dos secuencias secundarias al menos el 80%, al menos el 85%, al menos el 90%, al menos el 95% de similitud, al menos el 97% de similitud, al menos el 98% de similitud, al menos el 99% de similitud o al menos el 99,5% de similitud). En algunos casos, por ejemplo, tal como se expone en el presente documento, la secuencia secundaria de una primera región de las dos regiones de ADN puede comprender la totalidad de la segunda región de las dos regiones de ADN (o viceversa) (por ejemplo, la secuencia secundaria común puede contener la totalidad de cualquiera o ambas regiones).

Composición farmacéutica: tal como se usa en el presente documento, el término "composición farmacéutica" se refiere a una composición en la que un agente activo se formula junto con uno o más portadores farmacéuticamente aceptables. En algunas realizaciones, por ejemplo, tal como se expone en el presente documento, el agente activo está presente en una cantidad de dosis unitaria apropiada para su administración a un sujeto, por ejemplo, en una pauta terapéutica que muestra una probabilidad estadísticamente significativa de lograr un efecto terapéutico predeterminado cuando se administra a una población relevante. En algunas realizaciones, por ejemplo, tal como se expone en el presente documento, una composición farmacéutica puede formularse para su administración en una forma particular (por ejemplo, en una forma sólida o una forma líquida) y/o puede estar específicamente adaptada, por ejemplo, para: administración oral (por ejemplo, como disolución oral (disoluciones o suspensiones acuosas o no acuosas), comprimido, cápsula, bolo, polvo, gránulo, pasta, etc., que puede formularse específicamente, por ejemplo, para absorción bucal, sublingual o sistémica); administración parenteral (por ejemplo, mediante inyección subcutánea, intramuscular, intravenosa o epidural como, por ejemplo, una disolución o suspensión estéril, o formulación de liberación sostenida, etc.); aplicación tópica (por ejemplo, como crema, pomada, parche o pulverización aplicada, por ejemplo, a la piel, pulmones o cavidad oral); administración intravaginal o intrarrectal (por ejemplo, como óvulo vaginal, supositorio, crema o espuma); administración ocular; administración nasal o pulmonar, etc.

Farmacéuticamente aceptable: tal como se usa en el presente documento, el término "farmacéuticamente aceptable", tal como se aplica a uno o más, o la totalidad, del/de los componente(s) para la formulación de una composición tal como se da a conocer en el presente documento, significa que cada componente debe ser compatible con los demás componentes de la composición y no ser perjudicial para el receptor de la misma.

Portador farmacéuticamente aceptable: tal como se usa en el presente documento, el término "portador farmacéuticamente aceptable" se refiere a un material, composición o vehículo farmacéuticamente aceptable, tal como una carga líquida o sólida, diluyente, excipiente o material que encapsula disolvente, que facilita la formulación y/o modifica la biodisponibilidad de un agente, por ejemplo, un agente farmacéutico. Algunos ejemplos de materiales que pueden servir como portadores farmacéuticamente aceptables incluyen: azúcares, tales como lactosa, glucosa y sacarosa; almidones, tales como almidón de maíz y almidón de patata; celulosa y sus derivados, tales como carboximetilcelulosa de sodio, etilcelulosa y acetato de celulosa; goma tragacanto en polvo; malta; gelatina; talco; excipientes, tales como manteca de cacao y ceras para supositorio; aceites, tales como aceite de cacahuete, aceite de semilla de algodón, aceite de cártamo, aceite de sésamo, aceite de oliva, aceite de maíz y aceite de semilla de soja; glicoles, tales como propilenglicol; polioles, tales como glicerina, sorbitol, manitol y polietilenglicol; ésteres, tales como oleato de etilo y laurato de etilo; agar; agentes tamponantes, tales como hidróxido de magnesio e hidróxido de aluminio; ácido algínico; agua libre de pirógenos; solución salina isotónica; disolución de Ringer; alcohol etílico; disoluciones de pH tamponado; poliésteres, policarbonatos y/o polianhídridos; y otras sustancias compatibles no tóxicas empleadas en formulaciones farmacéuticas.

Prevenir o prevención: los términos "prevenir" y "prevención", tal como se usan en el presente documento en relación con la aparición de una enfermedad, trastorno o estado, se refieren a reducir el riesgo de desarrollar la enfermedad, trastorno o estado; retrasar la aparición de la enfermedad, trastorno o estado; retrasar la aparición de una o más características o síntomas de la enfermedad, trastorno o estado; y/o reducir la frecuencia y/o intensidad de una o más características o síntomas de la enfermedad, trastorno o estado. La prevención puede referirse a la prevención en un sujeto particular o a un impacto estadístico en una población de sujetos. La prevención puede considerarse completa cuando se ha retrasado la aparición de una enfermedad, trastorno o estado durante un periodo de tiempo predefinido.

Sonda: tal como se usa en el presente documento, el término "sonda" se refiere a una molécula de ácido nucleico mono o bicatenario que puede hibridarse con una diana complementaria e incluye un resto detectable. En determinadas realizaciones, por ejemplo, tal como se expone en el presente documento, una sonda es un producto de digestión de restricción o es un ácido nucleico producido de manera sintética, por ejemplo, un ácido nucleico producido mediante recombinación o amplificación. En algunos casos, por ejemplo, tal como se expone en el presente documento, una sonda es una sonda de captura útil en la detección, identificación y/o aislamiento de una secuencia

diana, tal como una secuencia génica. En diversos casos, por ejemplo, tal como se expone en el presente documento, un resto detectable de sonda puede ser, por ejemplo, una enzima (por ejemplo, ELISA, así como ensayos histoquímicos basados en enzima), resto fluorescente, resto radiactivo o resto asociado con una señal de luminiscencia.

Pronóstico: tal como se usa en el presente documento, el término "pronóstico" se refiere a determinar la probabilidad cualitativa o cuantitativa de al menos un posible desenlace o acontecimiento futuro. Tal como se usa en el presente documento, un pronóstico puede ser una determinación del transcurso probable de una enfermedad, trastorno o estado tal como cáncer en un sujeto, una determinación referente a la esperanza de vida de un sujeto, o una determinación referente a la respuesta a la terapia, por ejemplo, a una terapia particular.

Información de pronóstico: tal como se usa en el presente documento, el término "información de pronóstico" se refiere a información útil para proporcionar un pronóstico. La información de pronóstico puede incluir, sin limitación, información de estado de biomarcador.

Promotor: tal como se usa en el presente documento, un "promotor" puede referirse a una región reguladora de ADN que se asocia directa o indirectamente (por ejemplo, a través de proteínas o sustancias unidas a promotor) con una ARN polimerasa y participa en el inicio de la transcripción de una secuencia codificante.

Referencia: tal como se usa en el presente documento, describe un patrón o control con respecto al cual se realiza una comparación. Por ejemplo, en algunas realizaciones, por ejemplo, tal como se expone en el presente documento, un agente, sujeto, animal, individuo, población, muestra, secuencia o valor de interés se compara con un agente, sujeto, animal, individuo, población, muestra, secuencia o valor de referencia o control. En algunas realizaciones, por ejemplo, tal como se expone en el presente documento, una referencia o característica de la misma se somete a prueba y/o se determina de manera sustancialmente simultánea con la prueba o determinación de la característica en una muestra de interés. En algunas realizaciones, por ejemplo, tal como se expone en el presente documento, una referencia es una referencia histórica, opcionalmente implementada en un medio tangible. Normalmente, tal como entenderán los expertos en la técnica, una referencia se determina o caracteriza en condiciones o circunstancias comparables a aquellas que están evaluándose, por ejemplo, con respecto a una muestra. Los expertos en la técnica apreciarán cuándo hay suficientes similitudes presentes como para justificar basarse en, y/o comparar con, una referencia o control posible particular.

Riesgo: tal como se usa en el presente documento con respecto a una enfermedad, trastorno o estado, el término "riesgo" se refiere a la probabilidad cualitativa o cuantitativa (ya se exprese como porcentaje o de otro modo) de que un individuo particular desarrolle la enfermedad, trastorno o estado. En algunas realizaciones, por ejemplo, tal como se expone en el presente documento, el riesgo se expresa como porcentaje. En algunas realizaciones, por ejemplo, tal como se expone en el presente documento, un riesgo es una probabilidad cualitativa o cuantitativa que es igual al o mayor del 0, 1, 2, 3, 4, 5, 6, 7, 8, 9, 10, 20, 30, 40, 50, 60, 70, 80, 90 o 100%. En algunas realizaciones, por ejemplo, tal como se expone en el presente documento, el riesgo se expresa como nivel de riesgo cualitativo o cuantitativo con respecto a un riesgo o nivel de referencia o el riesgo del mismo desenlace atribuido a una referencia. En algunas realizaciones, por ejemplo, tal como se expone en el presente documento, el riesgo relativo aumenta o disminuye en comparación con la muestra de referencia en un factor de 1,1, 1,2, 1,3, 1,4, 1,5, 1,6, 1,7, 1,8, 1,9, 2, 3, 4, 5, 6, 7, 8, 9, 10 o más.

Muestra: tal como se usa en el presente documento, el término "muestra" normalmente se refiere a una alícuota de material obtenida o derivada a partir de una fuente de interés. En algunas realizaciones, por ejemplo, tal como se expone en el presente documento, una fuente de interés es una fuente biológica o ambiental. En algunas realizaciones, por ejemplo, tal como se expone en el presente documento, una muestra es una "muestra primaria" obtenida directamente a partir de una fuente de interés. En algunas realizaciones, por ejemplo, tal como se expone en el presente documento, tal como quedará claro a partir del contexto, el término "muestra" se refiere a una preparación que se obtiene mediante procesamiento de una muestra primaria (por ejemplo, eliminando uno o más componentes de, y/o añadiendo uno o más agentes a, una muestra primaria). Una "muestra procesada" de este tipo puede incluir, por ejemplo células, ácidos nucleicos o proteínas extraídos de una muestra u obtenidos sometiendo una muestra primaria a técnicas tales como amplificación o transcripción inversa de ácidos nucleicos, aislamiento y/o purificación de determinados componentes, etc.

En algunos casos, por ejemplo, tal como se expone en el presente documento, una muestra procesada puede ser una muestra de ADN que se ha amplificado (por ejemplo, previamente amplificado). Por tanto, en diversos casos, por ejemplo, tal como se expone en el presente documento, una muestra identificada puede referirse a una forma primaria de la muestra o a una forma procesada de la muestra. En algunos casos, por ejemplo, tal como se expone en el presente documento, una muestra que es ADN digerido con enzima puede referirse a ADN digerido con enzima primario (el producto inmediato de digestión enzimática) o a una muestra adicionalmente procesada tal como ADN digerido con enzima que se ha sometido a una etapa de amplificación (por ejemplo, una etapa de amplificación intermedia, por ejemplo, amplificación previa) y/o a una etapa de filtrado, etapa de purificación o etapa que modifica

la muestra para facilitar una etapa adicional, por ejemplo, en un procedimiento de determinación del estado de metilación (por ejemplo, estado de metilación de una muestra de ADN primaria y/o de ADN tal como existe en su contexto de fuente original).

5 Cribado: tal como se usa en el presente documento, el término “cribado” se refiere a cualquier método, técnica, procedimiento o tarea destinado a generar información de diagnóstico y/o información de pronóstico. Por consiguiente, los expertos en la técnica apreciarán que el término cribado abarca un método, técnica, procedimiento o tarea que determina si individuo tiene, es probable que tenga o desarrolle, o corre el riesgo de tener o desarrollar una enfermedad, trastorno o estado, por ejemplo, cáncer colorrectal.

10 Especificidad: tal como se usa en el presente documento, la “especificidad” de un biomarcador se refiere al porcentaje de muestras que se caracterizan por la ausencia del acontecimiento o estado de interés para las que la medición del biomarcador indica con precisión la ausencia del acontecimiento o estado de interés (tasa de verdaderos negativos). En diversas realizaciones, por ejemplo, tal como se expone en el presente documento, la caracterización de las muestras negativas es independiente del biomarcador, y puede lograrse mediante cualquier medición relevante, por ejemplo, cualquier medición relevante conocida por los expertos en la técnica. Por tanto, la especificidad refleja la probabilidad de que el biomarcador detecte la ausencia del acontecimiento o estado de interés cuando se mide en una muestra no caracterizada por ese acontecimiento o estado de interés. En realizaciones particulares en las que el acontecimiento o estado de interés es cáncer colorrectal, por ejemplo, tal como se expone en el presente documento, la especificidad se refiere a la probabilidad de que un biomarcador detecte la ausencia de cáncer colorrectal en un sujeto que carece de cáncer colorrectal. La ausencia de cáncer colorrectal puede determinarse, por ejemplo, mediante histología.

25 Sensibilidad: tal como se usa en el presente documento, la “sensibilidad” de un biomarcador se refiere al porcentaje de muestras que se caracterizan por la presencia del acontecimiento o estado de interés para las que la medición del biomarcador indica con precisión la presencia del acontecimiento o estado de interés (tasa de verdaderos positivos). En diversas realizaciones, por ejemplo, tal como se expone en el presente documento, la caracterización de las muestras positivas es independiente del biomarcador, y puede lograrse mediante cualquier medición relevante, por ejemplo, cualquier medición relevante conocida por los expertos en la técnica. Por tanto, la sensibilidad refleja la probabilidad de que un biomarcador detecte la presencia del acontecimiento o estado de interés cuando se mide en una muestra caracterizada por la presencia de ese acontecimiento o estado de interés. En realizaciones particulares en las que el acontecimiento o estado de interés es cáncer colorrectal, por ejemplo, tal como se expone en el presente documento, la sensibilidad se refiere a la probabilidad de que un biomarcador detecte la presencia de cáncer colorrectal en un sujeto que tiene cáncer colorrectal. La presencia de cáncer colorrectal puede determinarse, por ejemplo, mediante histología.

40 Tumor sólido: tal como se usa en el presente documento, el término “tumor sólido” se refiere a una masa anómala de tejido que incluye células cancerosas. En diversas realizaciones, por ejemplo, tal como se expone en el presente documento, un tumor sólido es o incluye una masa anómala de tejido que no contiene quistes o zonas líquidas. En algunas realizaciones, por ejemplo, tal como se expone en el presente documento, un tumor sólido puede ser benigno; en algunas realizaciones, un tumor sólido puede ser maligno. Los ejemplos de tumores sólidos incluyen carcinomas, linfomas y sarcomas. En algunas realizaciones, por ejemplo, tal como se expone en el presente documento, los tumores sólidos pueden ser o incluir tumores suprarrenal, de conducto biliar, vejiga, hueso, cerebro, mama, cuello uterino, colon, endometrio, esófago, ojo, vesícula biliar, tracto gastrointestinal, riñón, laringe, hígado, pulmón, cavidad nasal, nasofaringe, cavidad oral, ovarios, pene, glándula pituitaria, próstata, retina, glándula salivar, piel, intestino delgado, estómago, testículos, tumor, tiroides, uterino, vaginal y/o de vulva.

50 Estadío de cáncer: tal como se usa en el presente documento, el término “estadío de cáncer” se refiere a una evaluación cualitativa o cuantitativa del nivel de avance de un cáncer. En algunas realizaciones, por ejemplo, tal como se expone en el presente documento, los criterios usados para determinar el estadío de un cáncer pueden incluir, pero no se limitan a, uno o más de dónde está localizado el cáncer en el cuerpo, tamaño de tumor, si el cáncer se ha diseminado a ganglios linfáticos, si el cáncer se ha diseminado a una o más partes diferentes del cuerpo, etc. En algunas realizaciones, por ejemplo, tal como se expone en el presente documento, el cáncer puede estadificarse usando el denominado sistema de TNM, según el cual T se refiere al tamaño y alcance del tumor principal, habitualmente denominado tumor primario; N se refiere al número de ganglios linfáticos cercanos que tienen cáncer; y M se refiere a si el cáncer se ha metastatizado. En algunas realizaciones, por ejemplo, tal como se expone en el presente documento, un cáncer puede denominarse de estadío 0 (hay células anómalas presentes pero no se han diseminado a tejido cercano, también denominado carcinoma *in situ*, o CIS; CIS no es cáncer, pero puede convertirse en cáncer), estadío I-III (hay cáncer presente; cuanto mayor es el número, mayor es el tumor y más se ha diseminado a tejidos cercanos), o estadío IV (el cáncer se ha diseminado a partes distantes del cuerpo). En algunas realizaciones, por ejemplo, tal como se expone en el presente documento, un cáncer puede asignarse a un estadío seleccionado del grupo que consiste en: *in situ* (hay células anómalas presentes pero no se han diseminado a tejido cercano); localizado (el cáncer está limitado al lugar en el que se inició, sin signos de haberse diseminado); regional (el cáncer se ha diseminado a ganglios linfáticos, tejidos u órganos cercanos); distante (el cáncer se ha diseminado a partes distantes

del cuerpo); y desconocido (no hay suficiente información para identificar el estadio de cáncer).

Propenso a: un individuo que es “propenso a” una enfermedad, trastorno o estado corre riesgo de desarrollar la enfermedad, trastorno o estado. En algunas realizaciones, por ejemplo, tal como se expone en el presente documento, un individuo que es propenso a una enfermedad, trastorno o estado no presenta ningún síntoma de la enfermedad, trastorno o estado. En algunas realizaciones, por ejemplo, tal como se expone en el presente documento, a un individuo que es propenso a una enfermedad, trastorno o estado no se le ha diagnosticado la enfermedad, trastorno y/o estado. En algunas realizaciones, por ejemplo, tal como se expone en el presente documento, un individuo que es propenso a una enfermedad, trastorno o estado es un individuo que se ha visto expuesto a condiciones asociadas con, o presenta un estado de biomarcador (por ejemplo, un estado de metilación) asociado con, el desarrollo de la enfermedad, trastorno o estado. En algunas realizaciones, por ejemplo, tal como se expone en el presente documento, un riesgo de desarrollar una enfermedad, trastorno y/o estado es un riesgo basado en población (por ejemplo, miembros de la familia de individuos que padecen la enfermedad, trastorno o estado).

Sujeto: tal como se usa en el presente documento, el término “sujeto” se refiere a un organismo, normalmente un mamífero (por ejemplo, un ser humano). En algunas realizaciones, por ejemplo, tal como se expone en el presente documento, un sujeto padece una enfermedad, trastorno o estado. En algunas realizaciones, por ejemplo, tal como se expone en el presente documento, un sujeto es propenso a una enfermedad, trastorno o estado. En algunas realizaciones, por ejemplo, tal como se expone en el presente documento, un sujeto presenta uno o más síntomas o características de una enfermedad, trastorno o estado. En algunas realizaciones, por ejemplo, tal como se expone en el presente documento, un sujeto no padece una enfermedad, trastorno o estado. En algunas realizaciones, por ejemplo, tal como se expone en el presente documento, un sujeto no presenta ningún síntoma o característica de una enfermedad, trastorno o estado. En algunas realizaciones, por ejemplo, tal como se expone en el presente documento, un sujeto es alguien con uno o más rasgos característicos de propensión a, o riesgo de, una enfermedad, trastorno o estado. En algunas realizaciones, por ejemplo, tal como se expone en el presente documento, un sujeto es un paciente. En algunas realizaciones, por ejemplo, tal como se expone en el presente documento, un sujeto es un individuo a quien se le ha realizado un diagnóstico y/o a quien se le ha administrado una terapia. En algunos casos, por ejemplo, tal como se expone en el presente documento un sujeto humano puede denominarse de manera intercambiable “individuo”.

Agente terapéutico: tal como se usa en el presente documento, el término “agente terapéutico” se refiere a cualquier agente que provoca un efecto farmacológico deseado cuando se administra a un sujeto. En algunas realizaciones, por ejemplo, tal como se expone en el presente documento, se considera que un agente es un agente terapéutico si demuestra un efecto estadísticamente significativo a lo largo de una población apropiada. En algunas realizaciones, por ejemplo, tal como se expone en el presente documento, la población apropiada puede ser una población de organismos modelo o una población humana. En algunas realizaciones, por ejemplo, tal como se expone en el presente documento, una población apropiada puede definirse mediante diversos criterios, tales como un determinado grupo de edad, sexo, contexto genético, estados clínicos preexistentes, etc. En algunas realizaciones, por ejemplo, tal como se expone en el presente documento, un agente terapéutico es una sustancia que puede usarse para el tratamiento de una enfermedad, trastorno o estado. En algunas realizaciones, por ejemplo, tal como se expone en el presente documento, un agente terapéutico es un agente que se ha aprobado o se requiere que se apruebe por una agencia gubernamental antes de poder comercializarse para su administración a seres humanos. En algunas realizaciones, por ejemplo, tal como se expone en el presente documento, un agente terapéutico es un agente para el que se requiere una receta médica para su administración a seres humanos.

Cantidad terapéuticamente eficaz: tal como se usa en el presente documento, el término “cantidad terapéuticamente eficaz” se refiere a una cantidad que produce un efecto deseado para el que se administra. En algunas realizaciones, por ejemplo, tal como se expone en el presente documento, el término se refiere a una cantidad que es suficiente, cuando se administra a una población que padece o es propensa a una enfermedad, trastorno o estado, según una pauta posológica terapéutica, para tratar la enfermedad, trastorno o estado. Los expertos habituales en la técnica apreciarán que el término cantidad terapéuticamente eficaz no requiere de hecho que se logre un tratamiento satisfactorio en un individuo particular. En vez de eso, una cantidad terapéuticamente eficaz puede ser una cantidad que proporciona una respuesta farmacológica deseada particular en un número significativo de sujetos cuando se administra a individuos que necesitan tal tratamiento. En algunas realizaciones, por ejemplo, tal como se expone en el presente documento, la referencia a una cantidad terapéuticamente eficaz puede ser una referencia a una cantidad tal como se mide en uno o más tejidos específicos (por ejemplo, un tejido afectado por la enfermedad, trastorno o estado) o líquidos (por ejemplo, sangre, saliva, suero, sudor, lágrimas, orina, etc.). Los expertos habituales en la técnica apreciarán que, en algunas realizaciones, una cantidad terapéuticamente eficaz de un agente particular puede formularse y/o administrarse en una única dosis. En algunas realizaciones, por ejemplo, tal como se expone en el presente documento, un agente terapéuticamente eficaz puede formularse y/o administrarse en una pluralidad de dosis, por ejemplo, como parte de una pauta posológica de múltiples dosis.

Tratamiento: tal como se usa en el presente documento, el término “tratamiento” (también “tratar” o “que trata”) se refiere a la administración de una terapia que, parcial o completamente, alivia, mejora, mitiga, inhibe, retrasa la

aparición de, reduce la intensidad de y/o reduce la incidencia de uno o más síntomas, características y/o causas de una enfermedad, trastorno o estado particular, o se administra con el fin de lograr cualquiera de tales resultados. En algunas realizaciones, por ejemplo, tal como se expone en el presente documento, tal tratamiento puede ser de un sujeto que no muestra ningún signo de la enfermedad, trastorno o estado relevante y/o de un sujeto que solo muestra signos iniciales de la enfermedad, trastorno o estado. Alternativa o adicionalmente, tal tratamiento puede ser de un sujeto que muestra uno o más signos establecidos de la enfermedad, trastorno y/o estado relevante. En algunas realizaciones, por ejemplo, tal como se expone en el presente documento, el tratamiento puede ser de un sujeto al que se le ha diagnosticado que padece la enfermedad, trastorno y/o estado relevante. En algunas realizaciones, por ejemplo, tal como se expone en el presente documento, el tratamiento puede ser de un sujeto que se sabe que tiene uno o más factores de propensión que están estadísticamente correlacionados con un riesgo aumentado de desarrollo de la enfermedad, trastorno o estado relevante. En diversos ejemplos, el tratamiento es de un cáncer.

En el sentido de 5': tal como se usa en el presente documento, el término "en el sentido de 5'" significa que una primera región de ADN está más cerca, con respecto a una segunda región de ADN, del extremo N-terminal de un ácido nucleico que incluye la primera región de ADN y la segunda región de ADN.

Dosis unitaria: tal como se usa en el presente documento, el término "dosis unitaria" se refiere a una cantidad administrada como una única dosis y/o en una unidad físicamente diferenciada de una composición farmacéutica. En muchas realizaciones, por ejemplo, tal como se expone en el presente documento, una dosis unitaria contiene una cantidad predeterminada de un agente activo. En algunas realizaciones, por ejemplo, tal como se expone en el presente documento, una dosis unitaria contiene una única dosis entera del agente. En algunas realizaciones, por ejemplo, tal como se expone en el presente documento, se administra más de una dosis unitaria para lograr una única dosis total. En algunas realizaciones, por ejemplo, tal como se expone en el presente documento, se requiere la administración de múltiples dosis unitarias, o se espera que se requiera, con el fin de lograr un efecto pretendido. Una dosis unitaria puede ser, por ejemplo, un volumen de líquido (por ejemplo, un portador aceptable) que contiene una cantidad predeterminada de uno o más restos terapéuticos, una cantidad predeterminada de uno o más restos terapéuticos en forma sólida, una formulación de liberación sostenida o dispositivo de administración de fármaco que contiene una cantidad predeterminada de uno o más restos terapéuticos, etc. Se apreciará que una dosis unitaria puede estar presente en una formulación que incluye cualquiera de una variedad de componentes además del/de los agente(s) terapéutico(s). Por ejemplo, pueden incluirse portadores aceptables (por ejemplo, portadores farmacéuticamente aceptables), diluyentes, estabilizantes, tampones, conservantes, etc. Los expertos en la técnica apreciarán que, en muchas realizaciones, por ejemplo, tal como se expone en el presente documento, una dosificación diaria apropiada total de un agente terapéutico particular puede comprender una porción, o una pluralidad, de dosis unitarias, y puede decidirse, por ejemplo, por un profesional médico dentro del alcance del criterio médico razonable. En algunas realizaciones, por ejemplo, tal como se expone en el presente documento, el nivel de dosis eficaz específico para cualquier sujeto u organismo particular puede depender de una variedad de factores incluyendo el trastorno que está tratándose y la intensidad del trastorno; actividad del compuesto activo específico empleado; composición específica empleada; edad, peso corporal, salud general, sexo y dieta del sujeto; tiempo de administración, y tasa de excreción del compuesto activo específico empleado; duración del tratamiento; fármacos y/o terapias adicionales usados en combinación o simultáneamente con compuesto(s) específico(s) empleado(s) y factores similares bien conocidos en las técnicas médicas.

No metilado: tal como se usa en el presente documento, los términos "no metilado" y "sin metilar" se usan de manera intercambiable y significan que una región de ADN identificada no incluye ningún nucleótidos metilado.

Variante: tal como se usa en el presente documento, el término "variante" se refiere a una entidad que muestra una identidad estructural significativa con una entidad de referencia pero difiere estructuralmente de la entidad de referencia en cuanto a la presencia, ausencia o nivel de uno o más restos químicos en comparación con la entidad de referencia. En algunas realizaciones, por ejemplo, tal como se expone en el presente documento, una variante también difiere funcionalmente de su entidad de referencia. En general, si una entidad particular se considera de manera apropiada que es una "variante" de una entidad de referencia se basa en su grado de identidad estructural con la entidad de referencia. Una variante puede ser una molécula comparable con, pero no idéntica a, una referencia. Por ejemplo, un ácido nucleico variante puede diferir de un ácido nucleico de referencia en una o más diferencias en la secuencia de nucleótidos. En algunas realizaciones, por ejemplo, tal como se expone en el presente documento, un ácido nucleico variante muestra una identidad de secuencia global con un ácido nucleico de referencia que es de al menos el 85%, 86%, 87%, 88%, 89%, 90%, 91%, 92%, 93%, 94%, 95%, 96%, 97% o 99%. En muchas realizaciones, por ejemplo, tal como se expone en el presente documento, se considera que un ácido nucleico de interés es una "variante" de un ácido nucleico de referencia si el ácido nucleico de interés tiene una secuencia que es idéntica a la de la referencia salvo por un pequeño número de alteraciones de secuencia en posiciones particulares. En algunas realizaciones, por ejemplo, tal como se expone en el presente documento, una variante tiene 10, 9, 8, 7, 6, 5, 4, 3, 2 o 1 residuos sustituidos en comparación con una referencia. En algunas realizaciones, por ejemplo, tal como se expone en el presente documento, una variante no tiene más de 5, 4, 3, 2 o 1 adiciones, sustituciones o delecciones de residuo en comparación con la referencia. En diversas realizaciones, por ejemplo, tal como se expone en el presente documento, el número de adiciones, sustituciones o delecciones es menor de aproximadamente 25, aproximadamente

20, aproximadamente 19, aproximadamente 18, aproximadamente 17, aproximadamente 16, aproximadamente 15, aproximadamente 14, aproximadamente 13, aproximadamente 10, aproximadamente 9, aproximadamente 8, aproximadamente 7, aproximadamente 6 y habitualmente hay menos de aproximadamente 5, aproximadamente 4, aproximadamente 3 o aproximadamente 2 residuos.

5

Breve descripción de los dibujos

Los objetivos, aspectos, características y ventajas anteriores y otros de la presente divulgación resultarán más evidentes y se entenderán mejor haciendo referencia a la siguiente descripción tomada junto con los dibujos adjuntos, en los que:

10

La figura 1 es un esquema que muestra un enfoque de MSRE-qPCR de ejemplo.

15

La figura 2 es una tabla que muestra características de un primer grupo de sujetos de 70 sujetos humanos. La figura 2 proporciona el porcentaje de mujeres, porcentaje de hombres, intervalo de edad e IMC de sujetos. La figura 2 distingue además los tipos de cáncer colorrectal identificado en el primer grupo de sujetos como localizado o avanzado basándose en evaluación histológica, y como proximal o distal basándose en evaluación por colonoscopia del colon.

20

La figura 3 es una tabla que muestra características de un segundo grupo de sujetos de 63 sujetos humanos. La figura 3 proporciona el porcentaje de mujeres, porcentaje de hombres, intervalo de edad e IMC de sujetos. La figura 3 distingue además los tipos de cáncer colorrectal identificado en el segundo grupo de sujetos como localizado o avanzado basándose en evaluación histológica, y como proximal o distal basándose en evaluación por colonoscopia del colon.

25

La figura 4 incluye paneles A y B. El panel A de la figura 4 es un gráfico que muestra el rendimiento de cribado de cáncer colorrectal usando un panel de prueba de concepto representativo de DMR en el segundo grupo de sujetos. Se muestra la curva ROC y el AUC para todos los sujetos del segundo grupo de sujetos. El panel B de la figura 4 es un diagrama que muestra valores de precisión, incluyendo, de izquierda a derecha, la sensibilidad global del cribado colorrectal para detectar cáncer colorrectal, sensibilidad de cribado colorrectal para detectar cáncer colorrectal localizado, sensibilidad de cribado colorrectal para detectar cáncer colorrectal avanzado, sensibilidad de cribado colorrectal para detectar cáncer colorrectal proximal, sensibilidad de cribado colorrectal para detectar cáncer colorrectal distal y especificidad de cribado colorrectal para sujetos de control (sujetos sanos y sujetos con adenoma no avanzado).

30

35

La figura 5 es un gráfico que representa valores de Ct a partir de MSRE-qPCR de ALK '434 para sujetos con cáncer colorrectal y sujetos de control (sujetos sanos y sujetos con adenoma no avanzado). Los datos representan el segundo grupo de sujetos (63 sujetos) usado para las pruebas. Con fines de presentación, los valores de Ct se restan de 45 (45-Ct). Los valores de 45 - Ct corresponden a un estado de metilación superior, demostrando hipermetilación en sujetos con cáncer colorrectal.

40

45

La figura 6 es un gráfico que representa valores de Ct a partir de MSRE-qPCR de FGF14 '577 DMR para sujetos con cáncer colorrectal y sujetos de control (sujetos sanos y sujetos con adenoma no avanzado). Los datos representan el segundo grupo de sujetos (63 sujetos) usado para las pruebas. Con fines de presentación, los valores de Ct se restan de 45 (45-Ct). Los valores de 45 - Ct corresponden a un estado de metilación superior, demostrando hipermetilación en sujetos con cáncer colorrectal.

50

La figura 7 es un gráfico que representa valores de Ct a partir de MSRE-qPCR de PDGFD '388 para sujetos con cáncer colorrectal y sujetos de control (sujetos sanos y sujetos con adenoma no avanzado). Los datos representan el segundo grupo de sujetos (63 sujetos) usado para las pruebas. Con fines de presentación, los valores de Ct se restan de 45 (45-Ct). Los valores de 45 - Ct corresponden a un estado de metilación superior, demostrando hipermetilación en sujetos con cáncer colorrectal.

55

La figura 8 es un gráfico que representa valores de Ct a partir de MSRE-qPCR de JAM2 '320 para sujetos con cáncer colorrectal y sujetos de control (sujetos sanos y sujetos con adenoma no avanzado). Los datos representan el segundo grupo de sujetos (63 sujetos) usado para las pruebas. Con fines de presentación, los valores de Ct se restan de 45 (45-Ct). Los valores de 45 - Ct corresponden a un estado de metilación superior, demostrando hipermetilación en sujetos con cáncer colorrectal.

60

La figura 9 es un gráfico que representa valores de Ct a partir de MSRE-qPCR de LONRF2 '281 para sujetos con cáncer colorrectal y sujetos de control (sujetos sanos y sujetos con adenoma no avanzado). Los datos representan el segundo grupo de sujetos (63 sujetos) usado para las pruebas. Con fines de presentación, los valores de Ct se restan de 45 (45-Ct). Los valores de 45 - Ct corresponden a un estado de metilación superior, demostrando hipermetilación en sujetos con cáncer colorrectal.

La figura 10 es una tabla que muestra características de un tercer grupo de sujetos de 82 sujetos humanos. La figura 10 proporciona el porcentaje de mujeres, porcentaje de hombres, intervalo de edad e IMC de sujetos diagnosticados mediante cribado usando 28 DMR de cáncer colorrectal de la presente divulgación. La figura 10 distingue además los tipos de cáncer colorrectal identificado en el tercer grupo de sujetos como localizado o avanzado basándose en evaluación histológica, y como proximal o distal basándose en evaluación por colonoscopia del colon.

La figura 11 es un gráfico que muestra el rendimiento de cribado de cáncer colorrectal usando un panel de 28 DMR en el tercer grupo de sujetos. Se muestra la curva ROC y el AUC para todos los sujetos del tercer grupo de sujetos. El análisis de curva ROC mostró que un panel de 28 DMR logró una sensibilidad de cáncer colorrectal general del 79%, con una sensibilidad del 75% para cáncer localizado (temprano) y una sensibilidad del 84% para cáncer avanzado, con una especificidad muy estable del 87% a un AUC del 82% (véase también la tabla 15).

La figura 12 es un gráfico que representa valores de Ct a partir de MSRE-qPCR de ZNF471 '527 para sujetos con cáncer colorrectal y sujetos de control (sujetos sanos y sujetos con adenoma no avanzado). Los datos representan el tercer grupo de sujetos (82 sujetos). Con fines de presentación, los valores de Ct se restan de 45 (45-Ct). Los valores de 45 - Ct corresponden a un estado de metilación superior, demostrando hipermetilación en sujetos con cáncer colorrectal.

La figura 13 es un gráfico que representa valores de Ct a partir de MSRE-qPCR de FGF14 '577 para sujetos con cáncer colorrectal y sujetos de control (sujetos sanos y sujetos con adenoma no avanzado). Los datos representan el tercer grupo de sujetos (82 sujetos). Con fines de presentación, los valores de Ct se restan de 45 (45-Ct). Los valores de 45 - Ct corresponden a un estado de metilación superior, demostrando hipermetilación en sujetos con cáncer colorrectal.

La figura 14 es un gráfico que representa valores de Ct a partir de MSRE-qPCR de PDGFD '388 para sujetos con cáncer colorrectal y sujetos de control (sujetos sanos y sujetos con adenoma no avanzado). Los datos representan el tercer grupo de sujetos (82 sujetos). Con fines de presentación, los valores de Ct se restan de 45 (45-Ct). Los valores de 45 - Ct corresponden a un estado de metilación superior, demostrando hipermetilación en sujetos con cáncer colorrectal.

La figura 15 es un gráfico que representa valores de Ct a partir de MSRE-qPCR de ADAMTS2 '254 para sujetos con cáncer colorrectal y sujetos de control (sujetos sanos y sujetos con adenoma no avanzado). Los datos representan el tercer grupo de sujetos (82 sujetos). Con fines de presentación, los valores de Ct se restan de 45 (45-Ct). Los valores de 45 - Ct corresponden a un estado de metilación superior, demostrando hipermetilación en sujetos con cáncer colorrectal.

La figura 16 es un gráfico que representa valores de Ct a partir de MSRE-qPCR de ZNF471 '558 (DMR que se denomina alternativamente en el presente documento ZNF471_2) para sujetos con cáncer colorrectal y sujetos de control (sujetos sanos y sujetos con adenoma no avanzado). Los datos representan el tercer grupo de sujetos (82 sujetos). Con fines de presentación, los valores de Ct se restan de 45 (45-Ct). Los valores de 45 - Ct corresponden a un estado de metilación superior, demostrando hipermetilación en sujetos con cáncer colorrectal.

La figura 17 es un gráfico que representa valores de Ct a partir de MSRE-qPCR de ST6GALNAC5 '456 para sujetos con cáncer colorrectal y sujetos de control (sujetos sanos y sujetos con adenoma no avanzado). Los datos representan el tercer grupo de sujetos (82 sujetos). Con fines de presentación, los valores de Ct se restan de 45 (45-Ct). Los valores de 45 - Ct corresponden a un estado de metilación superior, demostrando hipermetilación en sujetos con cáncer colorrectal.

La figura 18 es un gráfico que representa valores de Ct a partir de MSRE-qPCR de ZNF542 '525 para sujetos con cáncer colorrectal y sujetos de control (sujetos sanos y sujetos con adenoma no avanzado). Los datos representan el tercer grupo de sujetos (82 sujetos). Con fines de presentación, los valores de Ct se restan de 45 (45-Ct). Los valores de 45 - Ct corresponden a un estado de metilación superior, demostrando hipermetilación en sujetos con cáncer colorrectal.

La figura 19 es un gráfico que representa valores de Ct a partir de MSRE-qPCR de LONRF2 '281 para sujetos con cáncer colorrectal y sujetos de control (sujetos sanos y sujetos con adenoma no avanzado). Los datos representan el tercer grupo de sujetos (82 sujetos). Con fines de presentación, los valores de Ct se restan de 45 (45-Ct). Los valores de 45 - Ct corresponden a un estado de metilación superior, demostrando hipermetilación en sujetos con cáncer colorrectal.

La figura 20 es un esquema que muestra cambios de metilación de ejemplo en el estado de metilación entre células normales y cancerosas, e indica además cómo los cambios en el estado de metilación pueden tener un impacto sobre diferencias de expresión génica entre células normales y cancerosas.

La figura 21 es una tabla que muestra las características de un grupo de sujetos de 215 sujetos usado como conjunto de entrenamiento. La figura 21 proporciona el número de mujeres, número de hombres, intervalo de edad y estado de cáncer colorrectal de los sujetos. La figura 21 distingue además los tipos de cáncer colorrectal identificado en aquellos que tienen cáncer colorrectal en el grupo de sujetos como localizado o avanzado basándose en evaluación histológica, y como proximal o distal basándose en evaluación por colonoscopia del colon.

La figura 22 es una tabla que muestra las características de un cuarto grupo de sujetos de 774 sujetos usado como conjunto de validación. La figura 22 proporciona el número de mujeres, número de hombres, intervalo de edad y estado de cáncer de los sujetos. La figura 22 distingue además los tipos de cáncer identificado en aquellos que tienen cáncer en el grupo de sujetos como localizado o avanzado basándose en evaluación histológica.

La figura 23 es un gráfico que muestra el rendimiento de un panel de 3 marcadores para cribado de cáncer colorrectal usando DMR de la tabla 18. Se muestra la curva ROC y las características de rendimiento para todos los sujetos del cuarto grupo de sujetos de validación.

La figura 24 es un gráfico que muestra el rendimiento de un panel de 5 marcadores para cribado de cáncer colorrectal usando DMR de la tabla 19. Se muestra la curva ROC y las características de rendimiento para todos los sujetos del cuarto grupo de sujetos de validación.

La figura 25 es un gráfico que muestra el rendimiento de un panel de 6 marcadores para cribado de cáncer colorrectal usando DMR de la tabla 20. Se muestra la curva ROC y las características de rendimiento para todos los sujetos del cuarto grupo de sujetos de validación.

La figura 26 es un gráfico que representa valores de Ct a partir de MSRE-qPCR de ZNF132 '415 para sujetos con cáncer colorrectal y sujetos de control (sujetos sanos, sujetos con adenoma no avanzado y sujetos con otros cánceres). Los datos representan el cuarto grupo de sujetos (774 sujetos). Con fines de presentación, los valores de Ct se restan de 45 (45-Ct). Los valores de 45 - Ct corresponden a un estado de metilación superior, demostrando hipermetilación en sujetos con cáncer colorrectal.

La figura 27 es un gráfico que representa valores de Ct a partir de MSRE-qPCR de ADAMTS2 '254 para sujetos con cáncer colorrectal y sujetos de control (sujetos sanos, sujetos con adenoma no avanzado y sujetos con otros cánceres). Los datos representan el cuarto grupo de sujetos (774 sujetos). Con fines de presentación, los valores de Ct se restan de 45 (45-Ct). Los valores de 45 - Ct corresponden a un estado de metilación superior, demostrando hipermetilación en sujetos con cáncer colorrectal.

La figura 28 es un gráfico que representa valores de Ct a partir de MSRE-qPCR de ADAMTS2 '284 para sujetos con cáncer colorrectal y sujetos de control (sujetos sanos, sujetos con adenoma no avanzado y sujetos con otros cánceres). Los datos representan el cuarto grupo de sujetos (774 sujetos). Con fines de presentación, los valores de Ct se restan de 45 (45-Ct). Los valores de 45 - Ct corresponden a un estado de metilación superior, demostrando hipermetilación en sujetos con cáncer colorrectal.

La figura 29 es un gráfico que representa valores de Ct a partir de MSRE-qPCR de ZNF542 '502 para sujetos con cáncer colorrectal y sujetos de control (sujetos sanos, sujetos con adenoma no avanzado y sujetos con otros cánceres). Los datos representan el cuarto grupo de sujetos (774 sujetos). Con fines de presentación, los valores de Ct se restan de 45 (45-Ct). Los valores de 45 - Ct corresponden a un estado de metilación superior, demostrando hipermetilación en sujetos con cáncer colorrectal.

La figura 30 es un gráfico que representa valores de Ct a partir de MSRE-qPCR de LONRF2 '281 para sujetos con cáncer colorrectal y sujetos de control (sujetos sanos, sujetos con adenoma no avanzado y sujetos con otros cánceres). Los datos representan el cuarto grupo de sujetos (774 sujetos). Con fines de presentación, los valores de Ct se restan de 45 (45-Ct). Los valores de 45 - Ct corresponden a un estado de metilación superior, demostrando hipermetilación en sujetos con cáncer colorrectal.

La figura 31 es un gráfico que representa valores de Ct a partir de MSRE-qPCR de ZNF492 '069 para sujetos con cáncer colorrectal y sujetos de control (sujetos sanos, sujetos con adenoma no avanzado y sujetos con otros cánceres). Los datos representan el cuarto grupo de sujetos (774 sujetos). Con fines de presentación, los valores de Ct se restan de 45 (45-Ct). Los valores de 45 - Ct corresponden a un estado de metilación superior, demostrando hipermetilación en sujetos con cáncer colorrectal.

Descripción detallada

Cribado de cáncer colorrectal

Existe una necesidad de métodos mejorados de detección (por ejemplo, cribado) de cáncer colorrectal, incluyendo

cribado para el diagnóstico de cáncer colorrectal en estadio temprano. A pesar de las recomendaciones de cribado de individuos, por ejemplo, de más de 50 años de edad, los programas de cribado de cáncer colorrectal con frecuencia son ineficaces o insatisfactorios. El cribado de cáncer colorrectal mejorado mejora el diagnóstico y reduce la mortalidad de cáncer colorrectal.

La metilación del ADN (por ejemplo, hipermetilación o hipometilación) puede activar o inactivar genes, incluyendo genes que tienen un impacto sobre el desarrollo de cáncer (véase, por ejemplo, la figura 20). Por tanto, por ejemplo, la hipermetilación puede inactivar uno o más genes que normalmente actúan para suprimir cáncer, provocando o contribuyendo al desarrollo de cáncer en una muestra o sujeto.

La presente divulgación incluye el descubrimiento de que la determinación del estado de metilación de uno o más loci de metilación proporcionados en el presente documento, y/o el estado de metilación de una o más DMR proporcionadas en el presente documento, y/o el estado de metilación de uno o más sitios de metilación proporcionados en el presente documento, proporciona cribado de cáncer colorrectal, por ejemplo, con un alto grado de sensibilidad y/o especificidad. La presente divulgación se refiere a composiciones y a métodos que incluyen o que se refieren a biomarcadores de metilación de cáncer colorrectal que, de manera individual o en diversos paneles que comprenden dos o más biomarcadores de metilación de cáncer colorrectal, proporcionan cribado de cáncer colorrectal, por ejemplo, con un alto grado de especificidad y/o sensibilidad.

Un biomarcador de metilación de cáncer colorrectal de la presente divulgación se selecciona de un locus de metilación que es o incluye ALK, LONRF2, ADAMTS2, FGF14, DMRT1, ST6GALNAC5, MCIDAS, PDGFD, GSG1L, ZNF492, ZNF568, ZNF542, ZNF471, ZNF132, JAM2 y CNRIP1 (véase, por ejemplo, la tabla 1). Una DMR de cáncer colorrectal se selecciona de ALK '434, CNRIP1 '232, CNRIP1 '272, LONRF2 '281, LONRF2 '387, ADAMTS2 '254, ADAMTS2 '284, ADAMTS2 '328, FGF14 '577, DMRT1 '934, ST6GALNAC5 '456, MCIDAS '855, MCIDAS '003, PDGFD '388, PDGFD '921, GSG1L '861, ZNF492 '499, ZNF492 '069, ZNF568 '252, ZNF568 '405, ZNF542 '525, ZNF542 '502, ZNF471 '527, ZNF471 '558, ZNF471 '662, ZNF132 '268, ZNF132 '415 y JAM2 '320 (véase, por ejemplo, la tabla 7).

Para evitar cualquier duda, cualquier biomarcador de metilación al que se hace referencia en el presente documento puede ser, o estar incluido, entre otros, en un biomarcador de metilación de cáncer colorrectal.

En algunas realizaciones, un biomarcador de metilación de cáncer colorrectal puede ser o incluir un único locus de metilación. En algunas realizaciones, un biomarcador de metilación de cáncer colorrectal puede ser o incluir dos o más loci de metilación. En algunas realizaciones, un biomarcador de metilación de cáncer colorrectal puede ser o incluir una única región diferencialmente metilada (DMR). En algunas realizaciones, un locus de metilación puede ser o incluir dos o más DMR. En algunas realizaciones, un biomarcador de metilación puede ser o incluir un único sitio de metilación. En otras realizaciones, un biomarcador de metilación puede ser o incluir dos o más sitios de metilación. En algunas realizaciones, un locus de metilación puede incluir dos o más DMR e incluir además regiones de ADN adyacentes a una o más de las DMR incluidas.

En algunos casos, un locus de metilación es o incluye un gen, tal como un gen proporcionado en la tabla 1. En algunos casos un locus de metilación es o incluye una porción de un gen, por ejemplo, una porción de un gen proporcionado en la tabla 1. En algunos casos, un locus de metilación incluye, pero no se limita a, límites de ácido nucleico identificados de un gen.

En algunos casos, un locus de metilación es o incluye una región codificante de un gen, tal como una región codificante de un gen proporcionado en la tabla 1. En algunos casos un locus de metilación es o incluye una porción de la región codificante de gen, por ejemplo, una porción de la región codificante un gen proporcionado en la tabla 1. En algunos casos, un locus de metilación incluye, pero no se limita a, límites de ácido nucleico identificados de una región codificante de gen.

En algunos casos, un locus de metilación es o incluye un promotor y/u otra región reguladora de un gen, tal como un promotor y/u otra región reguladora de un gen proporcionado en la tabla 1. En algunos casos un locus de metilación es o incluye una porción del promotor y/o región reguladora de gen, por ejemplo, una porción de promotor y/o región reguladora un gen proporcionado en la tabla 1. En algunos casos, un locus de metilación incluye, pero no se limita a, límites de ácido nucleico identificados de un promotor y/u otra región reguladora de gen. En algunas realizaciones un locus de metilación es o incluye un promotor de alta densidad de CpG o una porción del mismo.

En algunas realizaciones, un locus de metilación es o incluye una secuencia no codificante. En algunas realizaciones, un locus de metilación es o incluye uno o más exones y/o uno o más intrones. En algunas realizaciones, un locus de metilación incluye una región de ADN que se extiende un número predeterminado de nucleótidos en el sentido de 5' de una secuencia codificante, y/o una región de ADN que se extiende un número predeterminado de nucleótidos en el sentido de 3' de una secuencia codificante. En diversos casos, un número predeterminado de nucleótidos en el sentido de 5' y/o en el sentido de 3' puede ser o incluir, por ejemplo, 500 pb, 1 kb, 2 kb, 3 kb, 4 kb, 5 kb, 10 kb, 20 kb, 30 kb, 40 kb, 50 kb, 75 kb o 100 kb. Los expertos en la técnica apreciarán que los biomarcadores de metilación que

pueden tener un impacto sobre la expresión de una secuencia codificante pueden estar normalmente dentro de cualquiera de estas distancias de la secuencia codificante, en el sentido de 5' y/o en el sentido de 3'.

Los expertos en la técnica apreciarán que un locus de metilación identificado como biomarcador de metilación no se necesita someter a ensayo necesariamente en un único experimento, reacción o amplicón. Un único locus de metilación identificado como biomarcador de metilación de cáncer colorrectal puede someterse a ensayo, por ejemplo, en un método que incluye la amplificación independiente (o proporcionar cebadores de oligonucleótidos y condiciones suficientes para la amplificación) de una o más regiones de ADN distintas o solapantes dentro de un locus de metilación, por ejemplo, una o más DMR distintas o solapantes. Los expertos en la técnica apreciarán además que no se necesita analizar un locus de metilación identificado como biomarcador de metilación para determinar el estado de metilación de cada nucleótido, ni cada CpG, presente dentro del locus de metilación. En vez de eso, puede analizarse un locus de metilación que es un biomarcador de metilación, por ejemplo, mediante análisis de una única región de ADN dentro del locus de metilación, por ejemplo, mediante análisis de una única DMR dentro del locus de metilación.

Las DMR de la presente divulgación pueden ser un locus de metilación o incluir una porción de un locus de metilación. En algunos casos, una DMR es una región de ADN con un locus de metilación que tiene, por ejemplo, de 1 a 5.000 pb de longitud. En diversas realizaciones, una DMR es una región de ADN con un locus de metilación que tiene igual o menos de 5000 pb, 4.000 pb, 3.000 pb, 2.000 pb, 1.000 pb, 950 pb, 900 pb, 850 pb, 800 pb, 750 pb, 700 pb, 650 pb, 600 pb, 550 pb, 500 pb, 450 pb, 400 pb, 350 pb, 300 pb, 250 pb, 200 pb, 150 pb, 100 pb, 50 pb, 40 pb, 30 pb, 20 pb o 10 pb de longitud. En algunas realizaciones, una DMR tiene 1, 2, 3, 4, 5, 6, 7, 8 o 9 pb de longitud.

Los biomarcadores de metilación, incluyendo, sin limitación, loci de metilación y DMR a los que se hace referencia en el presente documento, pueden incluir al menos un sitio de metilación que es un biomarcador de metilación de cáncer colorrectal.

Por claridad, los expertos en la técnica apreciarán que el término biomarcador de metilación se usa de manera amplia, de tal manera que un locus de metilación puede ser un biomarcador de metilación que incluye una o más DMR, cada una de tales DMR también es en sí misma un biomarcador de metilación, y cada una de tales DMR puede incluir uno o más sitios de metilación, cada uno de tales sitios de metilación también es en sí mismo un biomarcador de metilación. Además, un biomarcador de metilación puede incluir dos o más loci de metilación. Por consiguiente, el estado como biomarcador de metilación no se basa en la contigüidad de ácidos nucleicos incluidos en un biomarcador, sino más bien en la existencia de un cambio en el estado de metilación para región/regiones de ADN incluida(s) entre un primer estado y un segundo estado, tal como entre cáncer colorrectal y controles.

Tal como se proporciona en el presente documento, un locus de metilación puede ser cualquiera de uno o más loci de metilación, cada uno de tales loci de metilación es, incluye o es una porción de un gen identificado en la tabla 1. En algunas realizaciones particulares, un biomarcador de metilación de cáncer colorrectal incluye un único locus de metilación que es, incluye o es una porción de un gen identificado en la tabla 1. Por ejemplo, en diversas realizaciones, tal como se describe en el presente documento, un biomarcador de metilación de cáncer colorrectal puede incluir un locus de metilación que es, incluye o es una porción de un gen seleccionado de ZNF132, ADAMTS2, ZNF542, LONRF2, ZNF492, FGF14, ST6GALNAC5, PDGFD, ZNF471, JAM2, GSG1L, DMRT1 y MCIDAS.

En algunas realizaciones particulares, un biomarcador de metilación de cáncer colorrectal incluye dos o más loci de metilación, cada uno de los cuales es, incluye o es una porción de un gen identificado en la tabla 1. En algunas realizaciones, un biomarcador de metilación de cáncer colorrectal incluye 2, 3, 4, 5, 6, 7, 8, 9, 10, 11, 12, 13, 14, 15 o 16 loci de metilación, cada uno de los cuales es, incluye o es una porción de un gen identificado en la tabla 1.

En algunas realizaciones particulares, un biomarcador de metilación de cáncer colorrectal incluye dos o más loci de metilación, cada uno de tales dos o más loci de metilación es, incluye o es una porción de un gen identificado en una cualquiera de las tablas 1 a 6. En algunas realizaciones particulares, un biomarcador de metilación de cáncer colorrectal incluye dos o más loci de metilación, cada uno de tales dos o más loci de metilación es, incluye o es una porción de un gen identificado en una cualquiera de las tablas 2 a 6. En algunas realizaciones particulares, un biomarcador de metilación de cáncer colorrectal incluye dos loci de metilación, cada uno de tales dos o más loci de metilación es, incluye o es una porción de un gen identificado en la tabla 1. En algunas realizaciones particulares, un biomarcador de metilación de cáncer colorrectal incluye tres loci de metilación, cada uno de tales tres loci de metilación es, incluye o es una porción de un gen identificado en la tabla 3. En algunas realizaciones particulares, un biomarcador de metilación de cáncer colorrectal incluye cuatro loci de metilación, cada uno de tales cuatro loci de metilación es, incluye o es una porción de un gen identificado en la tabla 4. En algunas realizaciones particulares, un biomarcador de metilación de cáncer colorrectal incluye seis loci de metilación, cada uno de tales seis loci de metilación es, incluye o es una porción de un gen identificado en la tabla 5. En algunas realizaciones particulares, un biomarcador de metilación de cáncer colorrectal incluye once loci de metilación, cada uno de tales once loci de metilación es, incluye o es una porción de un gen identificado en la tabla 6. En diversas realizaciones

particulares, un biomarcador de metilación de cáncer colorrectal o panel de biomarcadores de metilación de cáncer colorrectal incluye uno o más loci de metilación de la presente divulgación, pero no incluye un locus de metilación que es, incluye o es una porción de uno o más de FGF14, ZNF471, PDGFD y ALK.

5 Tabla 1. Loci de metilación identificados por nombre de gen

Gen	Región de ADN de ejemplo de conjunto de genoma de <i>Homo sapiens</i> (humano) GRCh38 (hg38)	SEQ ID NO
ZNF132	ZNF132 chr19, pb de 58439728 a 58440994	SEQ ID NO: 1
DMRT1	DMRT1 chr9, pb de 841340 a 968090	SEQ ID NO: 2
ALK	ALK chr2, pb de 29193215 a 29922286	SEQ ID NO: 3
JAM 2	JAM2 chr21, pb de 25637848 a 25714704	SEQ ID NO: 4
FGF14	FGF14 chr13, pb de 101919879 a 102403137	SEQ ID NO: 5
MCIDAS	MCIDAS chr5, pb de 55220951 a 55221051	SEQ ID NO: 6
ST6GALNAC5	ST6GALNAC5 chr1, pb de 76866255 a 77063388	SEQ ID NO: 7
LONRF2	LONRF2 chr2, pb de 100285667 a 100323015	SEQ ID NO: 8
PDGFD	PDGFD chr11, pb de 104163499 a 104164026	SEQ ID NO: 9
GSG1L	GSG1L chr16, pb de 27920615 a 28064275	SEQ ID NO: 10
ZNF492	ZNF492 chr19, pb de 22633051 a 22666433	SEQ ID NO: 11
ZNF568	ZNF568 chr19, pb de 36916312 a 36943940	SEQ ID NO: 12
ADAMTS2	ADAMTS2 chr5, pb de 179118114 a 179344392	SEQ ID NO: 13
ZNF542	ZNF542 chr19, pb de 56367838 a 56370986	SEQ ID NO: 14
ZNF471	ZNF471 chr19, pb de 56507245 a 56508589	SEQ ID NO: 15
CNRIP1	CNRIP1 chr2, pb de 68293114 a 68320928	SEQ ID NO: 16

Tabla 2. Combinación de 2 loci de metilación

ZNF471
FGF14

10

Tabla 3. Combinación de 3 loci de metilación

ZNF471
FGF14
PDGFD

Tabla 4. Combinación de 4 loci de metilación

15

ZNF471
FGF14
PDGFD
ADAMTS2

Tabla 5. Combinación de 6 loci de metilación

ZNF471
FGF14
PDGFD
ADAMTS2
ZNF492
ST6GALNAC5

20 Tabla 6. Combinación de 11 loci de metilación

ZNF471
FGF14
PDGFD
ADAMTS2
ZNF492
ST6GALNAC5
ZNF542
LONRF2

ZNF132
CNRIP1
ALK

Tal como se describe en el presente documento, un biomarcador de metilación de cáncer colorrectal puede ser cualquiera de una o más DMR, cada una de tales DMR está presente en un locus de metilación que es, incluye o es una porción de un gen identificado en la tabla 1. Un biomarcador de metilación de cáncer colorrectal es o incluye una única DMR que es, incluye la totalidad o una porción de, o está presente en un gen identificado en la tabla 1. Por ejemplo, un biomarcador de metilación de cáncer colorrectal puede incluir una única DMR que es, incluye la totalidad o una porción de, o está presente en un gen seleccionado de ALK, CNRIP1, LONRF2, ADAMTS2, FGF14, DMRT1, ST6GALNAC5, MCIDAS, PDGFD, GSG1L, ZNF492, ZNF568, ZNF542, ZNF471, ZNF132 y JAM2.

- 5 Un biomarcador de metilación de cáncer colorrectal incluye dos o más DMR, cada una de las cuales es, incluye la totalidad o una porción de, o está presente en un gen identificado en la tabla 1. En algunas realizaciones, un biomarcador de metilación de cáncer colorrectal incluye 2, 3, 4, 5, 6, 7, 8, 9, 10, 11, 12, 13, 14, 15 o 16 DMR, cada una de las cuales es, incluye la totalidad o una porción de, o está presente en un gen identificado en la tabla 1.
- 10 Un biomarcador de metilación de cáncer colorrectal incluye dos o más DMR, cada una de tales dos o más DMR es, incluye la totalidad o una porción de, o está presente en un gen identificado en una cualquiera de las tablas 1-6. Un biomarcador de metilación de cáncer colorrectal incluye dos DMR, dos DMR que incluyen DMR que son, incluyen la totalidad o una porción de, o están presentes en los genes identificados en la tabla 2. Un biomarcador de metilación de cáncer colorrectal incluye tres DMR, tres DMR que incluyen DMR que son, incluyen la totalidad o una porción de, o están presentes en los genes identificados en la tabla 3. Un biomarcador de metilación de cáncer colorrectal incluye cuatro DMR, cuatro DMR que incluyen DMR que son, incluyen la totalidad o una porción de, o están presentes en los genes identificados en la tabla 4. Un biomarcador de metilación de cáncer colorrectal incluye seis DMR, seis DMR que incluyen DMR que son, incluyen la totalidad o una porción de, o están presentes en los genes identificados en la tabla 5. Un biomarcador de metilación de cáncer colorrectal incluye once DMR, once DMR que incluyen DMR que son, incluyen la totalidad o una porción de, o están presentes en los genes identificados en la tabla 6. Un biomarcador de metilación de cáncer colorrectal o panel de biomarcadores de metilación de cáncer colorrectal incluye una o más DMR, pero la una o más DMR no incluyen una DMR que es, incluye la totalidad o una porción de, o está presente en uno o más de FGF14, ZNF471, PDGFD y ALK.
- 15 Tal como se describe en el presente documento, un biomarcador de metilación de cáncer colorrectal puede incluir cualquiera de una o más DMR, cada una de tales DMR es, incluye la totalidad de, o incluye una porción de una DMR identificada en la tabla 7, incluyendo, sin limitación, DMR específicamente tal como se identifica en la tabla 7. Un biomarcador de metilación de cáncer colorrectal es o incluye una única DMR que es, incluye la totalidad de, o incluye una porción de una DMR identificada en la tabla 7, incluyendo, sin limitación, una DMR específicamente tal como se identifica en la tabla 7, por ejemplo, una DMR de la tabla 7 seleccionada del grupo de DMR que incluyen, sin limitación, ALK '434, CNRIP1 '232, CNRIP1 '272, LONRF2 '281, LONRF2 '387, ADAMTS2 '254, ADAMTS2 '284, ADAMTS2 '328, FGF14 '577, DMRT1 '934, ST6GALNAC5 '456, MCIDAS '855, MCIDAS '003, PDGFD '388, PDGFD '921, GSG1L '861, ZNF492 '499, ZNF492 '069, ZNF568 '252, ZNF568 '405, ZNF542 '525, ZNF542 '502, ZNF471 '527, ZNF471 '558, ZNF471 '662, ZNF132 '268, ZNF132 '415 y JAM2 '320. Por ejemplo, un biomarcador de metilación de cáncer colorrectal puede incluir una única DMR que es, incluye la totalidad de, o incluye una porción de una DMR seleccionada de LONRF2 '281, LONRF2 '387, ADAMTS2 '254, ADAMTS2 '284, ADAMTS2 '328, FGF14 '577, ST6GALNAC5 '456, PDGFD '388, PDGFD '921, ZNF492 '499, ZNF492 '069, ZNF542 '525, ZNF542 '502, ZNF471 '527, ZNF471 '558 y ZNF471 '662.
- 20 Un biomarcador de metilación de cáncer colorrectal incluye dos o más DMR, cada una de tales DMR es, incluye la totalidad de, o incluye una porción de una DMR identificada en la tabla 7, incluyendo, sin limitación, DMR específicamente tal como se identifica en la tabla 7. Un biomarcador de metilación de cáncer colorrectal incluye 2, 3, 4, 5, 6, 7, 8, 9, 10, 11, 12, 13, 14, 15, 16, 17, 18, 19, 20, 21, 22, 23, 24, 25, 26, 27 o 28 DMR, cada una de tales DMR es, incluye la totalidad de, o incluye una porción de una DMR identificada en la tabla 7, incluyendo, sin limitación, DMR específicamente tal como se identifica en la tabla 7.
- 25 Un biomarcador de metilación de cáncer colorrectal incluye dos o más DMR, cada una de tales dos o más DMR es, incluye la totalidad de, o incluye una porción de una DMR identificada en una cualquiera de las tablas 7 a 12, incluyendo, sin limitación, DMR y combinaciones de las mismas específicamente tal como se identifica en las tablas 8 a 12. Un biomarcador de metilación de cáncer colorrectal incluye dos DMR, dos DMR que son las DMR identificadas en la tabla 8. En algunas realizaciones particulares, un biomarcador de metilación de cáncer colorrectal incluye tres DMR, tres DMR que son las DMR identificadas en la tabla 9. Un biomarcador de metilación de cáncer colorrectal incluye cinco DMR, cinco DMR que son las DMR identificadas en la tabla 10. Un biomarcador de metilación de cáncer colorrectal incluye ocho DMR, ocho DMR que son las DMR identificadas en la tabla 11. Un biomarcador de metilación de cáncer colorrectal incluye quince DMR, quince DMR que son las DMR identificadas en la tabla 12. Un biomarcador de metilación de cáncer colorrectal o panel de biomarcadores de metilación de cáncer colorrectal incluye una o más

DMR de la tabla 7, pero la una o más DMR no incluyen una o más, o la totalidad, de las DMR de FGF14, ZNF471, PDGFD y ALK, por ejemplo, no incluyen una o más, o la totalidad, de las DMR de FGF14, ZNF471, PDGFD y ALK tal como se proporciona en la tabla 7.

5 Tabla 7. DMR de cáncer colorrectal

nombre de gen	chr	sitio de inicio	sitio de terminación	anchura	SEQ ID NO	Nombre de referencia de loci
ALK	2	29921434	29921541	108	SEQ ID NO: 17	ALK '434
CNRIP1	2	68319232	68319342	111	SEQ ID NO: 18	CNRIP1 '232
LONRF2	2	100321281	100321395	115	SEQ ID NO: 19	LONRF2 '281
LONRF2	2	100322387	100322463	77	SEQ ID NO: 20	LONRF2 '387
ADAMTS2	5	179344254	179344348	95	SEQ ID NO: 21	ADAMTS2 '254
ADAMTS2	5	179344284	179344383	100	SEQ ID NO: 22	ADAMTS2 '284
FGF14	13	102394577	102394651	75	SEQ ID NO: 23	FGF14 '577
DMRT1	9	841934	842046	113	SEQ ID NO: 24	DMRT1 '934
ST6GALNAC5	1	76868456	76868525	70	SEQ ID NO: 25	ST6GALNAC5 '456
MCIDAS	5	55220855	55220971	117	SEQ ID NO: 26	MCIDAS '855
MCIDAS	5	55221003	55221122	120	SEQ ID NO: 27	MCIDAS '003
PDGFD	11	104163388	104163503	116	SEQ ID NO: 28	PDGFD '388
PDGFD	11	104163921	104164058	138	SEQ ID NO: 29	PDGFD '921
GSG1L	16	28063861	28063964	104	SEQ ID NO: 30	GSG1L '861
ZNF492	19	22634499	22634596	98	SEQ ID NO: 31	ZNF492 '499
ZNF568	19	36916252	36916371	120	SEQ ID NO: 32	ZNF568 '252
ZNF568	19	36916405	36916476	72	SEQ ID NO: 33	ZNF568 '405
ZNF542	19	56368525	56368610	86	SEQ ID NO: 34	ZNF542 '525
ZNF542	19	56368502	56368591	90	SEQ ID NO: 35	ZNF542 '502
ZNF471	19	56507527	56507675	149	SEQ ID NO: 36	ZNF471 '527
ZNF471	19	56507558	56507675	118	SEQ ID NO: 37	ZNF471 '558
ZNF471	19	56507662	56507750	89	SEQ ID NO: 38	ZNF471 '662
ZNF132	19	58440268	58440435	168	SEQ ID NO: 39	ZNF132 '268
ZNF132	19	58440415	58440523	109	SEQ ID NO: 40	ZNF132 '415
JAM2	21	25640320	25640399	80	SEQ ID NO: 41	JAM2 '320
ZNF492	19	22634069	22634174	106	SEQ ID NO: 42	ZNF492 '069
CNRIP1	2	68319272	68319342	71	SEQ ID NO: 43	CNRIP1 '272
ADAMTS2	5	179344328	179344412	85	SEQ ID NO: 44	ADAMTS2 '328

Tabla 8. Combinación de 2 DMR

nombre de gen	chr	sitio de inicio	sitio de terminación
ZNF471	19	56507558	56507675
FGF14	13	102394577	102394651

10

Tabla 9. Combinación de 3 DMR

nombre de gen	chr	sitio de inicio	sitio de terminación
ZNF471	19	56507558	56507675
FGF14	13	102394577	102394651
PDGFD	11	104163388	104163503

Tabla 10. Combinación de 5 DMR

15

nombre de gen	chr	sitio de inicio	sitio de terminación
ZNF471	19	56507558	56507675
FG F14	13	102394577	102394651
PDGFD	11	104163388	104163503
ZNF471	19	56507527	56507675
ADAMTS2	5	179344284	179344383

Tabla 11. Combinación de 8 DMR

nombre de gen	chr	sitio de inicio	sitio de terminación
---------------	-----	-----------------	----------------------

ZNF471	19	56507558	56507675
FGF14	13	102394577	102394651
PDGFD	11	104163388	104163503
ZNF471	19	56507527	56507675
ADAMTS2	5	179344284	179344383
ADAMTS2	5	179344254	179344348
ZNF492	19	22634069	22634174
ST6GALNAC5	1	76868456	76868525

Tabla 12. Combinación de 15 DMR

nombre de gen	chr	sitio de inicio	sitio de terminación
ZNF471	19	56507558	56507675
FGF14	13	102394577	102394651
PDGFD	11	104163388	104163503
ZNF471	19	56507527	56507675
ADAMTS2	5	179344284	179344383
ADAMTS2	5	179344254	179344348
ZNF492	19	22634069	22634174
ST6GALNAC5	1	76868456	76868525
7NF542	19	56368502	56368591
LONRF2	2	100321281	100321395
ZNF132	19	58440415	58440523
PDGFD	11	104163921	104164058
ZNF132	19	58440268	58440435
CNRIP1	2	68319272	68319342
ALK	2	29921434	29921541

- 5 En diversas realizaciones, un biomarcador de metilación puede ser o incluir uno o más nucleótidos individuales (por ejemplo, un único residuo de citosina individual en el contexto de CpG) o una pluralidad de residuos de citosina individuales (por ejemplo, de una pluralidad de CpG) presentes dentro de uno o más loci de metilación (por ejemplo, una o más DMR) proporcionados en el presente documento. Por tanto, en determinadas realizaciones un biomarcador de metilación es o incluye estado de metilación de una pluralidad de individual sitios de metilación.
- 10 En diversas realizaciones, un biomarcador de metilación es, incluye, o está caracterizado por un cambio en el estado de metilación que es un cambio en la metilación de uno o más sitios de metilación dentro de uno o más loci de metilación (por ejemplo, una o más DMR). En diversas realizaciones, un biomarcador de metilación es o incluye un cambio en estado de metilación que es un cambio en el número de sitios metilados dentro de uno o más loci de metilación (por ejemplo, una o más DMR). En diversas realizaciones, un biomarcador de metilación es o incluye un cambio en estado de metilación que es un cambio en la frecuencia de sitios de metilación dentro de uno o más loci de metilación (por ejemplo, una o más DMR). En diversas realizaciones, un biomarcador de metilación es o incluye un cambio en estado de metilación que es un cambio en el patrón de sitios de metilación dentro de uno o más loci de metilación (por ejemplo, una o más DMR).
- 15 En diversas realizaciones, el estado de metilación de uno o más loci de metilación (por ejemplo, una o más DMR) se expresa como una fracción o porcentaje del uno o más loci de metilación (por ejemplo, la una o más DMR) presentes en una muestra que están metilados, por ejemplo, como fracción del número de cadenas de ADN individuales de ADN en una muestra que están metiladas en uno o más loci de metilación particulares (por ejemplo, una o más DMR particulares). Los expertos en la técnica apreciarán que, en algunos casos, la fracción o porcentaje de metilación puede calcularse a partir de la razón de DMR metiladas con respecto a DMR no metiladas para una o más DMR analizadas, por ejemplo, dentro de una muestra.
- 20 En diversas realizaciones, se compara el estado de metilación de uno o más loci de metilación (por ejemplo, una o más DMR) con un valor de estado de metilación de referencia y/o con un estado de metilación del uno o más loci de metilación (por ejemplo, una o más DMR) en una muestra de referencia. En algunos casos, una referencia es una muestra no simultánea de la misma fuente, por ejemplo, una muestra anterior de la misma fuente, por ejemplo, del mismo sujeto. En algunos casos, una referencia para el estado de metilación de uno o más loci de metilación (por ejemplo, una o más DMR) es el estado de metilación del uno o más loci de metilación (por ejemplo, una o más DMR) en una muestra (por ejemplo, una muestra de un sujeto), o una pluralidad de muestras, que se sabe que representan un estado particular (por ejemplo, un estado canceroso o un estado no canceroso). Por tanto, una referencia puede ser o incluir uno o más umbrales predeterminados, umbrales que pueden ser cuantitativos (por ejemplo, un valor de metilación) o cualitativos. En algunos casos, una referencia para el estado de metilación de una DMR es el estado de metilación de un nucleótido o una pluralidad de nucleótidos (por ejemplo, una pluralidad de oligonucleótidos contiguos)
- 30
- 35

presentes en la misma muestra que no incluye nucleótidos de la DMR. Los expertos en la técnica apreciarán que una media de referencia se produce normalmente mediante medición usando una metodología idéntica, similar o comparable a aquella mediante la cual se realizó la medición no de referencia.

- 5 Sin desear limitarse a ninguna teoría científica particular, la figura 20 proporciona un esquema de un mecanismo posible mediante el cual la hipermetilación o hipometilación de una secuencia reguladora de gen puede tener un impacto sobre la expresión. Tal como se muestra en la figura 20, la hipometilación puede dar como resultado una expresión aumentada y/o la hipermetilación puede dar como resultado una supresión de la expresión. En diversos casos, una metilación aumentada de regiones reguladoras de la expresión, tales como regiones de promotor y
- 10 regiones de potenciador, en comparación con una referencia, puede reducir o silenciar la expresión de un gen operativamente unido, por ejemplo, de un gen operativamente unido que normalmente actúa para suprimir cáncer. En diversas realizaciones, una metilación reducida de regiones reguladoras de la expresión, tales como regiones de promotor y regiones de potenciador, en comparación con una referencia, puede aumentar la expresión de un gen operativamente unido, por ejemplo, de un gen operativamente unido que tiene una actividad que contribuye a la oncogénesis. Sin desear limitarse a ninguna teoría científica particular, la metilación de ADN puede proporcionar un
- 15 indicador química y biológicamente más estable del estado canceroso que la expresión de ARN o la expresión de proteína en sí misma.

- 20 Normalmente se considera que la metilación es altamente específica de tejido, proporcionando una dimensión de información no necesariamente presente en el análisis de secuencia de ADN.

Acontecimientos de metilación que contribuyen sustancialmente a la oncogénesis pueden producirse, por ejemplo, en regiones de ADN reguladoras de la expresión (por ejemplo, en una región de promotor, región de potenciador, sitio de unión a factor de transcripción, sitio de unión a CTCF, isla de CpG u otra secuencia) operativamente unidas con genes

25 asociados con cáncer tales como genes que normalmente actúan para suprimir cáncer. Por consiguiente, la inactivación de genes que normalmente actúan para suprimir cáncer da como resultado, o contribuye a, la oncogénesis. Además, normalmente se encuentra hipermetilación en islas de CpG.

30 Cánceres

Los métodos y las composiciones de la presente divulgación son útiles para el cribado de cáncer, particularmente cáncer colorrectal. Los cánceres colorrectales incluyen, sin limitación, cáncer de colon, cáncer rectal y combinaciones de los mismos. Los cánceres colorrectales incluyen cánceres colorrectales metastásicos y cánceres colorrectales no metastásicos. Los cánceres colorrectales incluyen cáncer localizado en la parte proximal del cáncer de colon y cáncer

35 localizado en la parte distal del colon.

Los cánceres colorrectales incluyen cánceres colorrectales en cualquiera de los diversos estadios posibles conocidos en la técnica, incluyendo, por ejemplo, cánceres colorrectales en estadio I, estadio II, estadio III y estadio IV (por ejemplo, estadios 0, I, IIA, IIB, IIC, IIIA, IIIB, IIIC, IVA, IVB y IVC). Los cánceres colorrectales incluyen todos los estadios

40 del sistema de estadificación de tumor/ganglio/metástasis (TNM). Con respecto a cáncer colorrectal, T puede referirse a si el tumor ha crecido en la pared del colon o el recto, y, si es así, en cuántas capas; N puede referirse a si el tumor se ha diseminado a ganglios linfáticos, y, si es así, cuántos ganglios linfáticos y dónde están localizados; y M puede referirse a si el cáncer se ha diseminado a otras partes del cuerpo, y, si es así, qué partes y en qué medida. En la técnica se conocen estadios particulares de T, N y M. Los estadios de T pueden incluir TX, T0, Tis, T1, T2, T3, T4a y T4b; los estadios de N pueden incluir NX, N0, N1a, N1b, N1c, N2a y N2b; los estadios de M pueden incluir M0, M1a y M1b. Además, los grados de cáncer colorrectal pueden incluir GX, G1, G2, G3 y G4. Diversos medios de estadificación de cáncer, y cáncer colorrectal en particular, se conocen bien en la técnica resumida, por ejemplo, en la web en cancer.net/cancer-types/colorectal-cancer/stages.

45

50 En algunos casos, la presente divulgación incluye cribado de cáncer colorrectal en estadio temprano. Los cánceres colorrectales en estadio temprano pueden incluir, por ejemplo, cánceres colorrectales localizados dentro de un sujeto, por ejemplo, ya que aún no se han diseminado a ganglios linfáticos del sujeto, por ejemplo, ganglios linfáticos cerca del cáncer (estadio N0), y no se han diseminado a sitios distantes (estadio M0). Los cánceres en estadio temprano incluyen cánceres colorrectales correspondientes, por ejemplo, a los estadios 0 a II C.

55

Por tanto, los cánceres colorrectales de la presente divulgación incluyen, entre otros, cáncer colorrectal premaligno y cáncer colorrectal maligno. Los métodos y las composiciones de la presente divulgación son útiles para cribado de cáncer colorrectal en todas sus formas y estadios.

60 Sujetos y muestras

Una muestra analizada usando métodos y composiciones proporcionados en el presente documento puede ser cualquier muestra biológica y/o cualquier muestra que incluye ácido nucleico. En diversas realizaciones particulares, una muestra analizada usando métodos y composiciones proporcionados en el presente documento puede ser una

muestra de un mamífero. En diversas realizaciones particulares, una muestra analizada usando métodos y composiciones proporcionados en el presente documento puede ser una muestra de un sujeto humano. En diversas realizaciones particulares, una muestra analizada usando métodos y composiciones proporcionados en el presente documento puede ser una muestra de un ratón, rata, cerdo, caballo, pollo o vaca.

En diversos casos, un sujeto humano es un sujeto diagnosticado o que busca diagnóstico como que tiene, diagnosticado o que busca diagnóstico como que corre el riesgo de tener, y/o diagnosticado o que busca diagnóstico como que corre riesgo inmediato de tener, un cáncer tal como a cáncer colorrectal. En diversos casos, un sujeto humano es un sujeto identificado como un sujeto que necesita cribado de cáncer colorrectal. En algunos casos, un sujeto humano es un sujeto identificado como que necesita cribado de cáncer colorrectal por un profesional médico. En diversos casos, un sujeto humano se identifica como que necesita cribado de cáncer colorrectal debido a la edad, por ejemplo, debido a una edad igual o superior a 50 años de edad, por ejemplo, una edad igual o superior a 50, 55, 60, 65, 70, 75, 80, 85 o 90 años de edad. En diversos casos, un sujeto humano es un sujeto al que no se le ha diagnosticado que tiene, corre el riesgo de tener, corre riesgo inmediato de tener, ni se le ha diagnosticado que tiene y/o busca diagnóstico por un cáncer tal como a cáncer colorrectal, o cualquier combinación de los mismos.

Una muestra de un sujeto, por ejemplo, un ser humano u otro sujeto mamífero, puede ser una muestra, por ejemplo, de sangre, componente sanguíneo, ADNlc, ADNtc, heces o tejido colorrectal. En algunas realizaciones particulares, una muestra es una excreción o líquido corporal de un sujeto (por ejemplo, heces, sangre, linfa u orina de un sujeto) o una muestra de tejido de cáncer colorrectal. Una muestra de un sujeto puede ser una muestra celular o de tejido, por ejemplo, una muestra celular o de tejido que es de un cáncer o incluye células cancerosas, por ejemplo, de un tumor o de un tejido metastásico. En diversas realizaciones, una muestra de un sujeto, por ejemplo, un ser humano u otro sujeto mamífero, puede obtenerse mediante biopsia (por ejemplo, aspiración de aguja fina o biopsia de tejido) o cirugía.

En diversas realizaciones particulares, una muestra es una muestra de ADN libre de células (ADNlc). El ADNlc se encuentra normalmente en líquidos corporales humanos (por ejemplo, plasma, suero u orina) en fragmentos bicatenarios cortos. La concentración de ADNlc es normalmente baja, pero puede aumentar significativamente en condiciones particulares, incluyendo, sin limitación, embarazo, trastorno autoinmunitario, infarto de miocardio y cáncer. El ADN tumoral circulante (ADNtc) es el componente de ADN circulante derivado específicamente de células cancerosas. El ADNtc puede estar presente en líquidos corporales humanos unidos a leucocitos y eritrocitos o no unidos a leucocitos y eritrocitos. Diversas pruebas para la detección de ADNlc derivado de tumor se basan en la detección de modificaciones genéticas o epigenéticas que son características de cáncer (por ejemplo, de un cáncer relevante). Las modificaciones genéticas o epigenéticas características de cáncer pueden incluir, sin limitación, mutaciones oncogénicas o asociadas con cáncer en genes supresores de tumor, oncogenes activados, hipermetilación y/o trastornos cromosómicos. La detección de modificaciones genéticas o epigenéticas características de cáncer puede confirmar que el ADNlc detectado es ADNtc.

El ADNlc y el ADNtc proporcionan una métrica en tiempo real o casi en tiempo real del estado de metilación de un tejido de origen. El ADNlc y el ADNtc demuestran una semivida en sangre de aproximadamente 2 horas, de tal manera que una muestra tomada en un tiempo dado proporciona una reflexión relativamente oportuna del estado de un tejido de origen. En la técnica se conocen diversos métodos de aislamiento de ácidos nucleicos a partir de una muestra (por ejemplo, de aislamiento de ADNlc a partir de sangre o plasma). Pueden aislarse ácidos nucleicos, por ejemplo, sin limitación, mediante técnicas de purificación de ADN convencionales, mediante captura de gen directa (por ejemplo, mediante aclaramiento de una muestra para eliminar agentes de inhibición de ensayo y capturar un ácido nucleico objetivo, si está presente, a partir de la muestra aclarada con un agente de captura para producir un complejo de captura, y aislar el complejo de captura para recuperar el ácido nucleico objetivo).

Métodos de medición del estado de metilación

El estado de metilación puede medirse mediante una variedad de métodos conocidos en la técnica y/o mediante métodos proporcionados en el presente documento. Los expertos en la técnica apreciarán que un método para medir el estado de metilación puede aplicarse generalmente a muestras de cualquier fuente y de cualquier clase, y conocerá además etapas de procesamiento disponibles para modificar una muestra para dar una forma adecuada para la medición mediante una metodología dada. Los métodos de medición del estado de metilación incluyen, sin limitación, métodos que incluyen reacción en cadena de la polimerasa específica del estado de metilación (PCR), métodos que incluyen secuenciación de ácido nucleico, métodos que incluyen espectrometría de masas, métodos que incluyen nucleasas específicas de la metilación, métodos que incluyen separación basada en masa, métodos que incluyen captura específica de diana y métodos que incluyen cebadores de oligonucleótidos específicos de la metilación. Determinados ensayos particulares para la metilación usan un reactivo de bisulfito (por ejemplo, iones de hidrogenosulfito). Los reactivos de bisulfito pueden incluir, entre otros, bisulfito, disulfito, hidrogenosulfito o combinaciones de los mismos, reactivos que pueden ser útiles para distinguir ácidos nucleicos metilados y no metilados. El bisulfito interacciona de manera diferente con citosina y 5-metilcitosina. En métodos basados en bisulfito típicos, el contacto de ADN con bisulfito desamina la citosina no metilada para dar uracilo, mientras que la citosina

metilada no se ve afectada; se retienen de manera selectiva las citosinas metiladas, pero no las citosinas no metiladas. Por tanto, en una muestra procesada con bisulfito, los residuos de uracilo ocupan el lugar de, y por tanto proporcionan una señal de identificación para, residuos de citosina no metilados, mientras que los residuos de citosina restantes (metilados) proporcionan por tanto una señal de identificación para residuos de citosina metilados. Las muestras procesadas con bisulfito pueden analizarse, por ejemplo, mediante PCR. Pueden usarse diversos procedimientos de ensayo de metilación junto con el tratamiento con bisulfito para determinar el estado de metilación de una secuencia diana tal como una DMR. Tales ensayos pueden incluir, entre otros, qPCR con enzimas de restricción específicas de la metilación, secuenciación de ácido nucleico tratado con bisulfito, PCR (por ejemplo, con amplificación específica de secuencia), PCR con enriquecimiento de alelos minoritarios asistido por nucleasas específicas de la metilación, y fusión de alta resolución sensible a la metilación. En algunas realizaciones, se amplifican DMR a partir de una muestra de ADN tratada con bisulfito y se prepara una biblioteca de secuenciación de ADN para la secuenciación según, por ejemplo, un protocolo de Illumina o protocolo de Nextera XT de bases transpuestas. En determinadas realizaciones, se usan técnicas de secuenciación de alto rendimiento y/o de nueva generación para lograr una resolución a nivel de pares de bases de la secuencia de ADN, permitiendo el análisis del estado de metilación.

En diversas realizaciones, el estado de metilación se detecta mediante un método que incluye amplificación por PCR con cebadores de oligonucleótidos específicos de la metilación (métodos de MSP), por ejemplo, tal como se aplica a una muestra tratada con bisulfito (véase, por ejemplo, Herman 1992 Proc. Natl. Acad. Sci. USA 93: 9821-9826). El uso de cebadores de oligonucleótidos específicos del estado de metilación para la amplificación de ADN tratado con bisulfito permite la diferenciación entre ácidos nucleicos metilados y no metilados. Los pares de cebadores de oligonucleótidos para su uso en métodos de MSP incluyen al menos un cebador de oligonucleótido que puede hibridarse con la secuencia que incluye un sitio de metilación, por ejemplo, una CpG. Un cebador de oligonucleótido que incluye un residuo de T en una posición complementaria a un residuo de citosina se hibridará selectivamente con moldes en los que la citosina no estaba metilada antes del tratamiento con bisulfito, mientras que un cebador de oligonucleótido que incluye un residuo de G en una posición complementaria a un residuo de citosina se hibridará selectivamente con moldes en los que la citosina era citosina metilada antes del tratamiento con bisulfito. Pueden obtenerse resultados de MSP con o sin secuenciación de amplicones, por ejemplo, usando electroforesis en gel. MSP (PCR específica de la metilación) permite una detección altamente sensible (nivel de detección del 0,1% de los alelos, con especificidad completa) de metilación de ADN específica de locus, usando amplificación por PCR de ADN convertido con bisulfito.

Otro método que puede usarse para determinar el estado de metilación después del tratamiento con bisulfito de una muestra es PCR de fusión de alta resolución sensible a la metilación (MS-HRM) (véase, por ejemplo, Hussmann 2018 Methods Mol Biol. 1708:551-571). MS-HRM es un método basado en PCR, en tubo, para detectar niveles de metilación en loci de interés específicos basándose en fusión de hibridación. El tratamiento con bisulfito del ADN antes de realizar MS-HRM garantiza una composición de bases diferente entre ADN metilado y no metilado, que se usa para separar los amplicones resultantes mediante fusión de alta resolución. Un diseño de cebador único facilita una alta sensibilidad de los ensayos permitiendo la detección de hasta el 0,1-1% de alelos metilados en un contexto no metilado. Los cebadores de oligonucleótidos para ensayos de MS-HRM se diseñan para ser complementarios al alelo metilado, y una temperatura de hibridación específica permite que estos cebadores se hibriden tanto a los alelos metilados como a los no metilados aumentando de ese modo la sensibilidad de los ensayos.

Otro método que puede usarse para determinar el estado de metilación después del tratamiento con bisulfito de una muestra es PCR específica de la metilación de múltiplex cuantitativo (QM-MSP). QM-MSP usa cebadores específicos de la metilación para una cuantificación sensible de metilación de ADN (véase, por ejemplo, Fackler 2018 Methods Mol Biol. 1708:473-496). QM-MSP es un enfoque de PCR en dos etapas, en el que, en la primera etapa, un par de cebadores específicos de gen (directo e inverso) amplifican las copias metiladas y no metiladas del mismo gen simultáneamente y en múltiplex, en una reacción de PCR. Esta etapa de amplificación independiente de la metilación produce amplicones de hasta 10^9 copias por μ l después de 36 ciclos de PCR. En la segunda etapa, se cuantifican los amplicones de la primera reacción con una curva patrón usando PCR en tiempo real y dos fluoróforos independientes para detectar ADN metilado/no metilado de cada gen en el mismo pocillo (por ejemplo, 6FAM y VIC). Una copia metilada puede detectarse en 100.000 copias de gen de referencia.

Otro método que puede usarse para determinar el estado de metilación después del tratamiento con bisulfito de una muestra es enriquecimiento de alelos minoritarios asistido por nucleasas específicas de la metilación (MS-NaME) (véase, por ejemplo, Liu 2017 Nucleic Acids Res. 45(6):e39). Ms-NaME se basa en la hibridación selectiva de sondas con secuencias diana en presencia de ADN nucleasa específica para ADN bicatenario (bc) (DSN), de tal manera que la hibridación da como resultado regiones de ADN bicatenario que posteriormente se digieren mediante la DSN. Por tanto, las sondas de oligonucleótidos que seleccionan como diana secuencias no metiladas generan regiones bicatenarias locales dando como resultado la digestión de dianas no metiladas; las sondas de oligonucleótidos que pueden hibridarse con secuencias metiladas generan regiones bicatenarias locales que dan como resultado la digestión de dianas metiladas, dejando las dianas metiladas intactas. Además, las sondas de oligonucleótidos pueden dirigir la actividad de DSN a múltiples dianas en ADN tratado con bisulfito, de manera simultánea. La amplificación posterior puede enriquecer secuencias no digeridas. Ms-NaME puede usarse o bien de manera independiente o bien

en combinación con otras técnicas proporcionadas en el presente documento.

Otro método que puede usarse para determinar el estado de metilación después del tratamiento con bisulfito de una muestra es la extensión de cebador de nucleótido único sensible a la metilación (Ms-SNuPE™) (véase, por ejemplo, Gonzalgo 2007 Nat Protoc. 2(8):1931-6). En Ms-SNuPE, se realiza PCR específica de cadena para generar un molde de ADN para el análisis cuantitativo de la metilación usando Ms-SNuPE. Después se realiza SNuPE con oligonucleótido(s) diseñado(s) para hibridarse inmediatamente en el sentido de 5' del/de los sitio(s) de CpG que está(n) interrogándose. Pueden someterse los productos de reacción a electroforesis en geles de poliacrilamida para la visualización y cuantificación mediante análisis de imágenes de fósforo. Los amplicones también pueden portar etiquetas directa o indirectamente detectables tales como una etiqueta fluorescente, radionúclido o un fragmento de molécula desprendible u otra entidad que tiene una masa que puede distinguirse mediante espectrometría de masas. La detección puede llevarse a cabo y/o visualizarse por medio, por ejemplo, de espectrometría de masas de desorción/ionización por láser asistida por matriz (MALDI) o usando espectrometría de masas por electropulverización (ESI).

Algunos métodos que pueden usarse para determinar el estado de metilación después del tratamiento con bisulfito de una muestra usan un primer cebador de oligonucleótido, un segundo cebador de oligonucleótido y una sonda de oligonucleótido en un método basado en amplificación. Por ejemplo, los cebadores y la sonda de oligonucleótidos pueden usarse en un método de reacción en cadena de la polimerasa (PCR) en tiempo real o PCR digital en gotitas (ddPCR). En diversos casos, el primer cebador de oligonucleótido, el segundo cebador de oligonucleótido y/o la sonda de oligonucleótido se hibridan selectivamente con ADN metilado y/o ADN no metilado, de tal manera que la señal de amplificación o sonda indican el estado de metilación de una muestra.

Otros métodos basados en bisulfito para detectar el estado de metilación (por ejemplo, la presencia de nivel de 5-metilcitosina) se dan a conocer, por ejemplo, en Frommer (1992 Proc Natl Acad Sci USA. 1; 89(5):1827-31).

Algunos métodos que pueden usarse para determinar el estado de metilación no incluyen el tratamiento con bisulfito de una muestra. Por ejemplo, pueden detectarse cambios en el estado de metilación mediante un procedimiento basado en PCR en el que se digiere ADN con una o más enzimas de restricción sensibles a la metilación (MSRE) antes de la amplificación por PCR (por ejemplo, mediante MSRE-qPCR). Normalmente, las MSRE tienen sitios de reconocimiento que incluyen al menos un motivo de CpG, de tal manera que se bloquea que la actividad de la MSRE escinda un posible sitio de reconocimiento si el sitio incluye 5-metilcitosina (véase, por ejemplo, Beikircher 2018 Methods Mol Biol. 1708:407-424). Por tanto, las MSRE digieren de manera selectiva ácidos nucleicos basándose en el estado de metilación del sitio de reconocimiento de la MSRE; pueden digerir ADN en sitios de reconocimiento de MSRE que no están metilados, pero no digerir ADN en sitios de reconocimiento de MSRE que están metilados. En determinadas realizaciones, puede digerirse una alícuota de muestra con MSRE, generando una muestra procesada en la que ADN no metilado se ha escindido mediante las MSRE, de tal manera que la proporción de ADN no escindido y/o amplificable con al menos un sitio metilado dentro de sitios de reconocimiento de MSRE (por ejemplo, al menos un sitio metilado dentro de cada sitio de reconocimiento de MSRE de la molécula de ADN) se aumenta con respecto a ADN no escindido y/o amplificable que no incluía al menos un sitio metilado dentro de sitios de reconocimiento de MSRE (por ejemplo, no incluía al menos un sitio metilado dentro de cada sitio de reconocimiento de MSRE de la molécula de ADN). Entonces, las secuencias no escindidas de una muestra digerida con enzimas de restricción pueden amplificarse previamente, por ejemplo, en PCR, y cuantificarse, por ejemplo, mediante qPCR, PCR en tiempo real o PCR digital. Los cebadores de oligonucleótidos para MSRE-qPCR amplifican regiones que incluyen uno o más sitios de escisión de MSRE, y/o una pluralidad de sitios de escisión de MSRE. Normalmente, es más probable que los amplicones que incluyen una pluralidad de sitios de escisión de MSRE proporcionen resultados robustos. El número de sitios de escisión dentro de un amplicón de DMR, y en algunos casos la robustez resultante de la determinación del estado de metilación para la DMR, puede aumentarse mediante diseño de DMR que incluyen una pluralidad de sitios de reconocimiento de MSRE (en contraposición a un único sitio de reconocimiento) en un amplicón de DMR. En diversos casos, puede aplicarse una pluralidad de MSRE a la misma muestra, incluyendo, por ejemplo, dos o más de Acil, Hin6I, HpyCH4IV y HpaII (por ejemplo, incluyendo Acil, Hin6I y HpyCH4IV). Una pluralidad de MSRE (por ejemplo, la combinación de Acil, Hin6I, HpyCH4IV y HpaII, o la combinación de Acil, Hin6I y HpyCH4IV) pueden proporcionar una frecuencia mejorada de sitios de reconocimiento de MSRE dentro de amplicones de DMR.

MSRE-qPCR también puede incluir una etapa de amplificación previa tras la digestión de la muestra mediante MSRE pero antes de la qPCR con el fin de mejorar la cantidad de muestra disponible, dada la baja prevalencia de ADNlc en sangre.

En determinadas realizaciones de MSRE-qPCR, la cantidad de ADN total se mide en una alícuota de muestra en forma nativa (por ejemplo, sin digerir) usando, por ejemplo, PCR en tiempo real o PCR digital.

Pueden usarse diversas tecnologías de amplificación solas o junto con otras técnicas descritas en el presente documento para la detección del estado de metilación. Los expertos en la técnica, habiendo revisado la presente memoria descriptiva, entenderán cómo combinar diversas tecnologías de amplificación conocidas en la técnica y/o

descritas en el presente documento junto con diversas otras tecnologías para la determinación del estado de metilación conocidas en la técnica y/o proporcionadas en el presente documento. Las tecnologías de amplificación incluyen, sin limitación, PCR, por ejemplo, PCR cuantitativa (qPCR), PCR en tiempo real y/o PCR digital. Los expertos en la técnica apreciarán que la amplificación por polimerasa puede multiplexar la amplificación de múltiples dianas en una única reacción. Los amplicones de PCR tienen normalmente de 100 a 2000 pares de bases de longitud. En diversos casos, una tecnología de amplificación es suficiente para determinar el estado de metilación. Los métodos basados en PCR digital (dPCR) implican dividir y distribuir una muestra a lo largo de pocillos de una placa con 96, 384 o más pocillos, o en gotitas de emulsión individuales (ddPCR) por ejemplo, usando un dispositivo de microfluidos, de tal manera que algunos pocillos incluyen una o más copias de molde y otros no incluyen ninguna copia de molde. Por tanto, el número promedio de moléculas de molde por pocillo es de menos de una antes de la amplificación. El número de pocillos en los que se produce amplificación de molde proporciona una medida de la concentración de molde. Si la muestra se ha puesto en contacto con MSRE, el número de pocillos en los que se produce la amplificación de molde proporciona una medida de la concentración de molde metilado.

En diversas realizaciones, puede usarse un ensayo de PCR en tiempo real basado en fluorescencia, tal como MethyLight™, para medir el estado de metilación (véase, por ejemplo, Campan 2018 Methods Mol Biol. 1708:497-513). MethyLight es un método de PCR en tiempo real, cuantitativo, basado en fluorescencia, para detectar de manera sensible y cuantificar la metilación de ADN de regiones candidatas del genoma. MethyLight es excepcionalmente adecuado para detectar regiones de ADN metiladas con baja frecuencia frente a un alto contexto de ADN no metilado, ya que combina el cebado específico de la metilación con análisis con sonda fluorescente específico de la metilación. Adicionalmente, MethyLight puede combinarse con PCR digital, para la detección altamente sensible de moléculas metiladas individuales, con el uso en la detección y cribado de enfermedades.

Los métodos basados en PCR en tiempo real para su uso en la determinación del estado de metilación normalmente incluyen una etapa de generar una curva patrón para ADN no metilado basándose en el análisis de patrones externos. Una curva patrón puede construirse a partir de al menos dos puntos y puede permitir la comparación de un valor de Ct en tiempo real para ADN digerido y/o un valor de Ct en tiempo real para ADN no digerido con patrones cuantitativos conocidos. En casos particulares, pueden determinarse valores de Ct de muestra para muestras o alícuotas de muestra digeridas con MSRE y/o no digeridas, y los equivalentes genómicos de ADN pueden calcularse a partir de la curva patrón. Los valores de Ct de ADN digerido con MSRE y no digerido pueden evaluarse para identificar amplicones digeridos (por ejemplo, digeridos de manera eficiente; por ejemplo, proporcionando un valor de Ct de 45). También pueden identificarse amplicones no amplificados en condiciones digeridas o no digeridas. Entonces pueden compararse directamente valores de Ct corregidos para amplicones de interés a lo largo de condiciones para establecer diferencias relativas en el estado de metilación entre condiciones. Alternativa o adicionalmente, puede usarse la diferencia delta entre los valores de Ct de ADN digerido y no digerido para establecer diferencias relativas en el estado de metilación entre condiciones.

Los métodos de medición del estado de metilación pueden incluir, sin limitación, secuenciación paralela masiva (por ejemplo, secuenciación de nueva generación) para determinar el estado de metilación, por ejemplo, secuenciación mediante síntesis, secuenciación en tiempo real (por ejemplo, de moléculas individuales), secuenciación en emulsión de perlas, secuenciación de nanoporos u otras técnicas de secuenciación conocidas en la técnica. En algunas realizaciones, un método de medición del estado de metilación puede incluir secuenciación de genoma completo, por ejemplo, con resolución de pares de bases.

En determinadas realizaciones particulares, puede usarse MSRE-qPCR, entre otras técnicas, para determinar el estado de metilación de un biomarcador de metilación de cáncer colorrectal que es o incluye un único locus de metilación. En determinadas realizaciones particulares, puede usarse MSRE-qPCR, entre otras técnicas, para determinar el estado de metilación de un biomarcador de metilación de cáncer colorrectal que es o incluye dos o más loci de metilación. En determinadas realizaciones particulares, puede usarse MSRE-qPCR, entre otras técnicas, para determinar el estado de metilación de un biomarcador de metilación de cáncer colorrectal que es o incluye una única región diferencialmente metilada (DMR). En determinadas realizaciones particulares, puede usarse MSRE-qPCR, entre otras técnicas, para determinar el estado de metilación de un biomarcador de metilación de cáncer colorrectal que es o incluye dos o más DMR. En determinadas realizaciones particulares, puede usarse MSRE-qPCR, entre otras técnicas, para determinar el estado de metilación de un biomarcador de metilación de cáncer colorrectal que es o incluye un único sitio de metilación. En determinadas realizaciones particulares, puede usarse MSRE-qPCR, entre otras técnicas, para determinar el estado de metilación de un biomarcador de metilación de cáncer colorrectal que es o incluye dos o más sitios de metilación. Un biomarcador de metilación de cáncer colorrectal puede ser cualquier biomarcador de metilación de cáncer colorrectal proporcionado en el presente documento. La presente divulgación incluye, entre otras cosas, pares de cebadores de oligonucleótidos para la amplificación de DMR, por ejemplo, para la amplificación de DMR identificadas en la tabla 7.

En determinadas realizaciones particulares, se deriva una muestra de ADNlc de plasma de sujeto y se pone en contacto con MSRE que son o incluyen una o más de Acil, Hin6I, HpyCH4IV y HpaII (por ejemplo, Acil, Hin6I y HpyCH4IV). La muestra digerida puede amplificarse previamente con pares de cebadores de oligonucleótidos de una

o más DMR, por ejemplo, con uno o más pares de cebadores de oligonucleótidos proporcionados en la tabla 13. El ADN digerido, por ejemplo, ADN digerido previamente amplificado, puede cuantificarse con qPCR con pares de cebadores de oligonucleótidos de una o más DMR, por ejemplo, con uno o más pares de cebadores de oligonucleótidos proporcionados en la tabla 13. Entonces pueden determinarse valores de ct de qPCR y usarse para determinar el estado de metilación de cada amplicón de DMR.

Los expertos en la técnica apreciarán que pueden usarse pares de cebadores de oligonucleótidos proporcionados en la tabla 13 según cualquier combinación de biomarcadores de metilación de cáncer colorrectal identificados en el presente documento. El experto en la técnica sabrá que los pares de cebadores de oligonucleótidos de la tabla 13 pueden incluirse de manera individual o no incluirse en un análisis dado con el fin de analizar una combinación deseada particular de DMR.

El experto en la técnica apreciará además que, aunque pueden usarse otros pares de cebadores de oligonucleótidos, la selección y el emparejamiento de cebadores de oligonucleótidos para producir amplicones de DMR útiles no es trivial y representa una contribución sustancial.

Los expertos en la técnica apreciarán además que en la técnica se conocen bien métodos, reactivos y protocolos para qPCR. A diferencia de PCR tradicional, la qPCR puede detectar la producción de amplicones a lo largo del tiempo en la amplificación (por ejemplo, al final de cada ciclo de amplificación), con frecuencia mediante el uso de un sistema de fluorescencia sensible a la amplificación, por ejemplo, en combinación con un termociclador con capacidad de detección de fluorescencia. Dos tipos habituales de notificadores fluorescentes usados en qPCR incluyen (i) colorantes de unión a ADN bicatenario que fluorescen de manera sustancialmente más brillante cuando están unidos que cuando no están unidos; y (ii) oligonucleótidos marcados (por ejemplo, cebadores de oligonucleótidos marcados o sondas de oligonucleótidos marcados).

Los expertos en la técnica apreciarán que, en realizaciones en las que se analiza una pluralidad de loci de metilación (por ejemplo, una pluralidad de DMR) para detectar el estado de metilación en un método de cribado de cáncer colorrectal proporcionado en el presente documento, el estado de metilación de cada locus de metilación puede medirse o representarse de cualquiera de una variedad de formas, y los estados de metilación de una pluralidad de loci de metilación (preferiblemente cada uno medido y/o representado de una manera igual, similar o comparable) pueden analizarse o representarse juntos o de manera acumulativa de cualquiera de una variedad de formas. En diversas realizaciones, el estado de metilación de cada locus de metilación puede medirse como un valor de ct. En diversas realizaciones, el estado de metilación de cada locus de metilación puede representarse como la diferencia en el valor de ct entre una muestra medida y una referencia. En diversas realizaciones, el estado de metilación de cada locus de metilación puede representarse como una comparación cualitativa con una referencia, por ejemplo, mediante identificación de cada locus de metilación como hipermetilado o no hipermetilado.

Cuando se analiza un único locus de metilación, la hipermetilación del único locus de metilación constituye un diagnóstico de que un sujeto padece o posiblemente padece cáncer colorrectal, mientras que la ausencia de hipermetilación del único locus de metilación constituye un diagnóstico de que es probable que el sujeto no padezca cáncer colorrectal.

Tal como se da a conocer en el presente documento, la hipermetilación de un único locus de metilación (por ejemplo, una única DMR) de una pluralidad de loci de metilación analizados constituye un diagnóstico de que un sujeto padece o posiblemente padece cáncer colorrectal, mientras que la ausencia de hipermetilación en cualquier locus de metilación de una pluralidad de loci de metilación analizados constituye un diagnóstico de que es probable que un sujeto no padezca cáncer colorrectal. La hipermetilación de un determinado porcentaje (por ejemplo, un porcentaje predeterminado) de loci de metilación (por ejemplo, al menos el 10% (por ejemplo, al menos el 10%, al menos el 20%, al menos el 30%, al menos el 40%, al menos el 50%, al menos el 60%, al menos el 70%, al menos el 80%, al menos el 90% o el 100%)) de una pluralidad de loci de metilación analizados constituye un diagnóstico de que un sujeto padece o posiblemente padece cáncer colorrectal, mientras que la ausencia de hipermetilación de un determinado porcentaje (por ejemplo, un porcentaje predeterminado) de loci de metilación (por ejemplo, al menos el 10% (por ejemplo, al menos el 10%, al menos el 20%, al menos el 30%, al menos el 40%, al menos el 50%, al menos el 60%, al menos el 70%, al menos el 80%, al menos el 90% o el 100%)) de una pluralidad de loci de metilación analizados constituye un diagnóstico de que no es probable que un sujeto padezca cáncer colorrectal. La hipermetilación de un determinado número (por ejemplo, un número predeterminado) de loci de metilación (por ejemplo, al menos 1, 2, 3, 4, 5, 6, 7, 8, 9, 10, 11, 12, 13, 14, 15, 16, 17, 18, 19, 20, 21, 22, 23, 24, 25, 26, 27 o 28 DMR) de una pluralidad de loci de metilación analizados (por ejemplo, 2, 3, 4, 5, 6, 7, 8, 9, 10, 11, 12, 13, 14, 15, 16, 17, 18, 19, 20, 21, 22, 23, 24, 25, 26, 27 o 28 DMR) constituye un diagnóstico de que un sujeto padece o posiblemente padece cáncer colorrectal, mientras que la ausencia de hipermetilación de un determinado número (por ejemplo, un número predeterminado) de loci de metilación (por ejemplo, al menos 1, 2, 3, 4, 5, 6, 7, 8, 9, 10, 11, 12, 13, 14, 15, 16, 17, 18, 19, 20, 21, 22, 23, 24, 25, 26, 27 o 28 DMR) de una pluralidad de loci de metilación analizados (por ejemplo, 2, 3, 4, 5, 6, 7, 8, 9, 10, 11, 12, 13, 14, 15, 16, 17, 18, 19, 20, 21, 22, 23, 24, 25, 26, 27 o 28 DMR) constituye un diagnóstico de que no es probable que un sujeto padezca cáncer colorrectal.

En algunas realizaciones, se mide el estado de metilación de una pluralidad de loci de metilación (por ejemplo, una pluralidad de DMR) de manera cualitativa o cuantitativa y se combina la medida para cada uno de la pluralidad de loci de metilación para proporcionar un diagnóstico. En algunas realizaciones, el estado de metilación medido de manera cualitativa o cuantitativa de cada uno de una pluralidad de loci de metilación se pondera de manera individual, y se combinan los valores ponderados para proporcionar un único valor que puede compararse con una referencia con el fin de proporcionar un diagnóstico. Por proporcionar tan solo un ejemplo de un enfoque de este tipo, puede usarse un algoritmo de máquina de vectores de soporte (SVM) para analizar los estados de metilación de una pluralidad de loci de metilación de la presente divulgación para producir un diagnóstico. Al menos un objetivo del algoritmo de máquina de vectores de soporte es identificar un hiperplano en un espacio en N dimensiones (N - el número de características) que clasifica de manera diferenciada los puntos de datos con el objetivo de encontrar un plano que tiene el máximo margen, es decir la máxima distancia entre puntos de datos de ambas clases. Tal como se comenta en los presentes ejemplos, se construye un modelo de SVM con valores de marcador (por ejemplo, valores de ct) derivados a partir de un conjunto de muestras de entrenamiento (por ejemplo, el primer grupo de sujetos y/o el segundo grupo de sujetos) que se transforman en valores de vectores de soporte basándose en los cuales se realiza una predicción. En la aplicación del modelo de SVM a nuevas muestras, se mapearán las muestras en el espacio vectorial del modelo y se clasificarán como que tienen una probabilidad de pertenecer a la primera condición o a la segunda condición, por ejemplo, basándose en la ubicación de cada nueva muestra con respecto al hueco entre las dos condiciones. Los expertos en la técnica apreciarán que, una vez que se han identificado composiciones y métodos relevantes, pueden usarse valores de vector junto con un algoritmo de SVM definido mediante la función de predicción () del paquete R (véase el protocolo seguro de transferencia de hipertexto ([HTTPS://cran.r-project.org/web/packages/e1071/index.html](https://cran.r-project.org/web/packages/e1071/index.html)) para generar fácilmente una predicción sobre una nueva muestra. Por consiguiente, al disponer composiciones y métodos para el diagnóstico de cáncer colorrectal dados a conocer en el presente documento (y solo entonces), la generación de un modelo predictivo usando información de entrada de algoritmo en combinación con la función de predicción () del paquete R (véase el protocolo seguro de transferencia de hipertexto ([HTTPS://cran.r-project.org/web/packages/e1071/index.html](https://cran.r-project.org/web/packages/e1071/index.html)) para proporcionar un diagnóstico de cáncer colorrectal será sencilla. A modo de ejemplo, en la tabla 17 se proporciona un ejemplo no limitativo de vectores de SVM para su uso en el diagnóstico de cáncer colorrectal mediante análisis del estado de metilación de una pluralidad de DMR proporcionadas en el presente documento. Los expertos en la técnica apreciarán que, al disponer de la presente divulgación, la generación de vectores de SVM puede lograrse según métodos proporcionados en el presente documento y conocidos de otro modo en la técnica.

Tabla 13. Pares de cebadores de oligonucleótidos de DMR de cáncer colorrectal, por ejemplo, para MSRE-qPCR

nombre de gen	Fp_Seq	Rp_Seq	SEQ ID de Fp	SEQ ID de Rp	Nombre de referencia de loci
ALK	CCTCCTCACCCATCATCAGC GCCC	GGTACCTCCCGCCGCTCT GTTC	45	46	ALK '434
CNRIP1	GCGTGCTGGGTTTAATCTTC ACCTCAA	ACGGCCCGGTCTTTTACAA GGTGG	47	48	CNRIP1 '232
LONRF2	AGGAAGCAAAGTGACCCCTA AGCCT	GGTCCGCCTCCCCTACACC T	49	50	LONRF2 '281
LONRF2	CTCTCAGTCCCGCCGGCTTA GGTA	GCAAGAGACGCGGACCTG GAGC	51	52	LONRF2 '387
ADAMTS2	CCACTGCGAAGGGAAGGGG CA	CCCTGTAAACGCCCTTCC CGGTT	53	54	ADAMTS2 '254
ADAMTS2	GCGACCCCAAGCCAGCC T	AACGGCTGGGGAGTGGCG GA	55	56	ADAMTS2 '284
FGF14	CAACGGAACTTCCCGCGCT AC	CTCGCCGGGGGCTTCGCTA C	57	58	FGF14 '577
DMRT1	CAAAGCGTCTGGGGCGCTA GT	ACTTCTTGCTCCCGGCACC CAGGTC	59	60	DMRT1 '934
ST6GALNA C5	CGCTCAGCCGCTCTCCTCTT CTCT	AGCGCTAAACACACTGCCA GACCA	61	62	ST6GALNA C5 '456
MCIDAS	GGGTTCGAGCGTGCAAAA GGTGA	GAACAGTTCAGTGCATCCC CGCCC	63	64	MCIDAS '855
MCIDAS	GCGCCCCACTTACATCCAGC ACC	ACGTGACATTGACCCAGAA ACAGGAGGA	65	66	MCIDAS '003
PDGFD	AACGTCTATCACCCAGGGAA AGCT	TCCCGGAGTTGGCGAAAGT TGCAA	67	68	PDGFD '388
PDGFD	GGTGCAATTTGGGATCAGCGA CTAGAGAC	GATTAGCACAGCGACCCGG GCCAG	69	70	PDGFD '921

GSG1L	CCGAAAGAAATCCGAGCCAG GGTGA	GGTTTTGTTGCCCCACGTC C	71	72	GSG1L '861
ZNF492	CGAGAGAGGGGAAGGGGCT GGTTG	CGAACTTGGGGCGCAGATT GTGG	73	74	ZNF492 '499
ZNF568	GCCCAAGCCTCACCTCACA CAG	CGAACCATCCCTCCGCGCC A	75	76	ZNF568 '252
ZNF568	GGTCGCCTTCACCCAGCATC TCAG	CAGCGTCACCTGCCGAAA CACC	77	78	ZNF568 '405
ZNF542	CCAGAGGCCAGGGATCCG TTCAG	ACGCGAGCATTCTTGTAAG GCACCC	79	80	ZNF542 '525
ZNF542	GGGAGGAGTGGGCGGCTGA ATGG	GCACCCGCCACCTCCAAAC TCAG	81	82	ZNF542 '502
ZNF471	CCCCACGCGTACTCACACCG AAG	GCGGGTAAGAGCAGGAGT GTG	83	84	ZNF471 '527
ZNF471	GTCGCGCGTTTCCCTCCAG	GCGGGTAAGAGCAGGAGT GTG	85	86	ZNF471 '558
ZNF471	CTGCTCTTACCCGCCGAAC CCTG	GAGGGACCTTAGAGCAGAG CGGGC	87	88	ZNF471 '662
ZNF132	CTACTGCTAGGTCGTTGCCA AGG	TGATTGGCCAGCGTCTTAC ACTCCG	89	90	ZNF132 '268
ZNF132	GTGTAAGACGCTGGCCAATC ACA	ACAACGCGGTCCCTTCAGA AGCAG	91	92	ZNF132 '415
JAM2	CCGCGTGGTCTGGGCTCTGT AG	GAATTCCTCCACCTCCGC CCCAC	93	94	JAM2 '320
ZNF492	CAACGTTAAAGGCAAACACC TTCTGC	GGCCGAATGAGGACAGAGT GACAG	95	96	ZNF492 '069
CNRIP1	GCCGGTGAGCAGCTTGATG GT	ACGGCCCGGTCTTTTACAA GG	97	98	CNRIP1 '272
ADAMTS2	CGGGAAGGGGCGTTAACAG GGC	TCTTGGCAGGCAAGGTCTC CGGAG	99	100	ADAMTS2 '328

Aplicaciones

Pueden usarse métodos y composiciones de la presente divulgación en cualquiera de una variedad de aplicaciones.

- 5 Por ejemplo, pueden usarse métodos y composiciones de la presente divulgación para cribar, o ayudar en el cribado de, cáncer colorrectal. En diversos casos, el cribado usando métodos y composiciones de la presente divulgación puede detectar cualquier estadio de cáncer colorrectal, incluyendo, sin limitación, cáncer colorrectal en estadio temprano. En algunas realizaciones, el cribado de cáncer colorrectal usando métodos y composiciones de la presente divulgación se aplica a individuos de 50 años de edad o mayores, por ejemplo, de 50, 55, 60, 65, 70, 75, 80, 85 o 90 años de edad o mayores. En algunas realizaciones, el cribado de cáncer colorrectal usando métodos y composiciones de la presente divulgación se aplica a individuos de 20 años de edad o mayores, por ejemplo, de 20, 25, 30, 35, 40, 45, 50, 55, 60, 65, 70, 75, 80, 85 o 90 años de edad o mayores. En algunas realizaciones, el cribado de cáncer colorrectal usando métodos y composiciones de la presente divulgación se aplica a individuos de 20 a 50 años de edad, por ejemplo, de 20 a 30 años de edad, de 20 a 40 años de edad, de 20 a 50 años de edad, de 30 a 40 años de edad, de 30 a 50 años de edad o de 40 a 50 años de edad. En diversas realizaciones, el cribado de cáncer colorrectal usando métodos y composiciones de la presente divulgación se aplica a individuos que experimentan dolor o molestia abdominal, por ejemplo, que experimentan dolor o molestia abdominal no diagnosticado o diagnosticado de manera incompleta. En diversas realizaciones, el cribado de cáncer colorrectal usando métodos y composiciones de la presente divulgación se aplica a individuos que no experimentan ningún síntoma que es probable que esté asociado con cáncer colorrectal. Por tanto, en determinadas realizaciones, el cribado de cáncer colorrectal usando métodos y composiciones de la presente divulgación es completa o parcialmente preventivo o profiláctico, al menos con respecto a estadios tempranos o no tempranos de cáncer colorrectal.

- 25 En diversas realizaciones, el cribado de cáncer colorrectal usando métodos y composiciones de la presente divulgación puede aplicarse a un sujeto humano asintomático. Tal como se usa en el presente documento, un sujeto puede denominarse "asintomático" si el sujeto no notifica y/o demuestra mediante indicios observables de manera no invasiva (por ejemplo, sin uno, varios o la totalidad de exploración basada en dispositivo, análisis de muestra de tejido, análisis de líquido corporal, cirugía o cribado de cáncer colorrectal), suficientes características de cáncer colorrectal como para respaldar una sospecha médicamente razonable de que es probable que el sujeto padezca cáncer colorrectal y/o cáncer. La detección de cáncer colorrectal en estadio temprano es particularmente probable en individuos asintomáticos sometidos a cribado según métodos y composiciones de la presente divulgación.

En diversas realizaciones, el cribado de cáncer colorrectal usando métodos y composiciones de la presente

- divulgación puede aplicarse a un sujeto humano sintomático. Tal como se usa en el presente documento, un sujeto puede denominarse "sintomático" si el sujeto notifica y/o demuestra mediante indicios observables de manera no invasiva (por ejemplo, sin uno, varios o la totalidad de exploración basada en dispositivo, análisis de muestra de tejido, análisis de líquido corporal, cirugía o cribado de cáncer colorrectal), suficientes características de cáncer colorrectal como para respaldar una sospecha médicamente razonable de que es probable que el sujeto padezca cáncer colorrectal y/o cáncer. Los síntomas de cáncer colorrectal pueden incluir, sin limitación, cambio en los hábitos intestinales (diarrea, estreñimiento o estrechamiento de las heces) que son persistentes (por ejemplo, duran más de 3 días), sentir la necesidad de defecar, sensación que no se alivia tras defecar, hemorragia rectal (por ejemplo, con sangre de color rojo claro), sangre en heces (que puede provocar que las heces aparezcan oscuras), calambres abdominales, dolor abdominal, debilidad, fatiga, pérdida de peso no intencionada, anemia y combinaciones de los mismos. Los expertos en la técnica apreciarán que síntomas individuales que por sí solos no indicarán o supondrán una sospecha de cáncer colorrectal pueden hacerlo cuando se presentan en combinación, por ejemplo, una combinación de calambres abdominales y sangre en heces, por proporcionar tan solo un ejemplo no limitativo.
- Los expertos en la técnica apreciarán que un cribado regular, preventivo y/o profiláctico para cáncer colorrectal mejora el diagnóstico de cáncer colorrectal, incluyendo y/o particularmente cáncer en estadio temprano. Tal como se indicó anteriormente, los cánceres en estado temprano incluyen, según al menos un sistema de estadificación de cáncer, los estadios 0 a II C de cáncer colorrectal. Por tanto, la presente divulgación proporciona, entre otras cosas, métodos y composiciones particularmente útiles para el diagnóstico y tratamiento de cáncer colorrectal en estadio temprano. De manera general, y particularmente en realizaciones en las que el cribado de cáncer colorrectal según la presente divulgación se lleva a cabo anualmente, y/o en las que un sujeto es asintomático en el momento del cribado, es especialmente probable que los métodos y las composiciones de la presente invención detecten cáncer colorrectal en estadio temprano.
- En diversas realizaciones, el cribado de cáncer colorrectal según la presente divulgación se realiza una vez para un sujeto dado o múltiples veces para un sujeto dado. En diversas realizaciones, el cribado de cáncer colorrectal según la presente divulgación se realiza de manera regular, por ejemplo, cada seis meses, anualmente, cada dos años, cada tres años, cada cuatro años, cada cinco años o cada diez años.
- En diversas realizaciones, el cribado de cáncer colorrectal usando métodos y composiciones dados a conocer en el presente documento proporcionará un diagnóstico de cáncer colorrectal. En otros casos, el cribado de cáncer colorrectal usando métodos y composiciones dados a conocer en el presente documento será indicativo de diagnóstico de cáncer colorrectal pero no definitivo de diagnóstico de cáncer colorrectal. En diversos casos en los que se usan métodos y composiciones de la presente divulgación para cribado de cáncer colorrectal, el cribado usando métodos y composiciones de la presente divulgación puede ir seguido por un ensayo de confirmación de diagnóstico adicional, ensayo adicional que puede confirmar, respaldar, minar o rechazar un diagnóstico resultante del cribado anterior, por ejemplo, cribado según la presente divulgación. Tal como se usa en el presente documento, un ensayo de confirmación de diagnóstico puede ser un ensayo de cáncer colorrectal que proporciona un diagnóstico reconocido como definitivo por profesionales médicos, por ejemplo, un diagnóstico basado en colonoscopia o un ensayo de cáncer colorrectal que aumenta o reduce sustancialmente la probabilidad de que un diagnóstico anterior fuera correcto, por ejemplo, un diagnóstico resultante del cribado según la presente divulgación. Los ensayos de confirmación de diagnóstico pueden incluir tecnologías de cribado existentes, que generalmente necesitan mejora con respecto a uno o más de sensibilidad, especificidad y no invasividad, particularmente en la detección de cánceres colorrectales en estadio temprano.
- En algunos casos, un ensayo de confirmación de diagnóstico es una prueba que es o incluye una inspección visual o estructural de tejidos de sujeto, por ejemplo, mediante colonoscopia. En algunas realizaciones, la colonoscopia incluye o va seguida por análisis histológico. Los ensayos visuales y/o estructurales para detectar cáncer colorrectal pueden incluir inspección de la estructura del colon y/o recto para detectar cualquier tejido y/o estructura anómalo. La inspección visual y/o estructural puede llevarse a cabo, por ejemplo, mediante uso de un colonoscopio a través del recto o mediante exploración de TC. En algunos casos, un ensayo de confirmación de diagnóstico es una colonoscopia, por ejemplo, que incluye o va seguida por análisis histológico. Según algunos informes, la colonoscopia es actualmente el ensayo de confirmación de diagnóstico predominante y/o en el que más se confía. Otro ensayo de confirmación de diagnóstico visual y/o estructural basándose en tomografía computerizada (CT) es colonografía por TC, algunas veces denominado colonoscopia virtual. Una exploración de TC usa numerosas imágenes de radiografía del colon y/o recto para producir representaciones dimensionales del colon. Aunque es útil como ensayo de confirmación de diagnóstico, algunos informes sugieren que la colonografía por TC no es suficiente como sustituto de la colonoscopia, al menos en parte porque un profesional médico no ha accedido físicamente al colon del sujeto para obtener tejido para análisis histológico.
- Otro ensayo de confirmación de diagnóstico puede ser una sigmoidoscopia. En la sigmoidoscopia, se usa un sigmoidoscopio a través del recto para obtener imágenes de porciones del colon y/o recto. Según algunos informes, la sigmoidoscopia no se usa ampliamente.

En algunos casos, un ensayo de confirmación de diagnóstico es un ensayo basado en heces. Normalmente, se recomienda que los ensayos basados en heces, cuando se usan en lugar de inspección visual o estructural, se usen a una frecuencia mayor de lo que se requeriría si se usa inspección visual o estructural. En algunos casos, un ensayo de confirmación de diagnóstico es una prueba de sangre oculta en heces basado en guayacol o una prueba inmuoquímica fecal (gFOBT/FIT) (véase, por ejemplo, Navarro 2017 World J Gastroenterol. 23(20):3632-3642). Algunas veces se usan FOBT y FIT para el diagnóstico de cáncer colorrectal (véase, por ejemplo, Nakamura 2010 J Diabetes Investig. 19 de octubre; 1(5):208-11). FIT se basa en la detección de sangre oculta en heces, cuya presencia es con frecuencia indicativa de cáncer colorrectal pero con frecuencia no está en un volumen suficiente como para permitir la identificación a simple vista. Por ejemplo, en una FIT típica, la prueba usa reactivo específico de hemoglobina para someter a prueba para detectar sangre oculta en una muestra de heces. En diversos casos, los kits de FIT son adecuados para su uso por individuos en su propio domicilio. Cuando se usa en ausencia de otros ensayos de confirmación de diagnóstico, puede recomendarse FIT para su uso de manera anual. Generalmente no se confía en FIT para proporcionar información de diagnóstico suficiente para un diagnóstico concluyente de cáncer colorrectal.

Los ensayos de confirmación de diagnóstico también incluyen gFOBT, que está diseñado para detectar sangre oculta en heces mediante reacción química. Como FIT, cuando se usa en ausencia de otros ensayos de confirmación de diagnóstico, puede recomendarse gFOBT para su uso de manera anual. Generalmente no se confía en gFOBT para proporcionar información de diagnóstico suficiente para un diagnóstico concluyente de cáncer colorrectal. Los ensayos de confirmación de diagnóstico también pueden incluir prueba de ADN en heces. Las pruebas de ADN en heces para detectar cáncer colorrectal pueden diseñarse para identificar secuencias de ADN características de cáncer en muestras de heces. Cuando se usan en ausencia de otros ensayos de confirmación de diagnóstico, pueden recomendarse pruebas de ADN en heces para su uso cada tres años. Generalmente no se confía en las pruebas de ADN en heces para proporcionar información de diagnóstico suficiente para un diagnóstico concluyente de cáncer colorrectal.

Una tecnología de cribado particular es una prueba de cribado basada en heces (Cologuard® (Exact Sciences Corporation, Madison, WI, Estados Unidos), que combina un ensayo de FIT con análisis de ADN para detectar modificaciones anómalas, tales como mutación y metilación. La prueba Cologuard® demuestra una sensibilidad mejorada en comparación con el ensayo de FIT por sí solo, pero puede ser clínicamente impracticable o ineficaz debido a bajas tasas de cumplimiento, bajas tasas de cumplimiento que se deben, al menos en parte, a que al sujeto no le gusta usar ensayos basados en heces (véase, por ejemplo, doi: 10.1056/NEJMc1405215 (por ejemplo, 2014 N Engl J Med. 371(2):184-188)). La prueba Cologuard® parece dejar casi a la mitad de la población elegible fuera de los programas de cribado (véase, por ejemplo, van der Vlugt 2017 Br J Cancer. 116(1):44-49). El uso de cribado tal como se proporciona en el presente documento, por ejemplo, mediante un análisis basado en sangre, aumentará el número de individuos que eligen realizar el cribado de cáncer colorrectal (véase, por ejemplo, Adler 2014 BMC Gastroenterol. 14:183; Liles 2017 Cancer Treatment and Research Communications 10: 27-31). Según el conocimiento actual, solo una tecnología de cribado existente de cáncer colorrectal, Epirocolon, está aprobada por la FDA y tiene marca de CE-IVD y se basa en sangre. Epirocolon se basa en la hipermetilación del gen SEPT9. La prueba Epirocolon presenta una baja precisión para la detección de cáncer colorrectal con una sensibilidad del 68% y una sensibilidad de adenoma avanzado de tan solo el 22% (véase, por ejemplo, Potter 2014 Clin Chem. 60(9):1183-91). Existe una necesidad en la técnica, entre otras cosas, de un cribado de cáncer colorrectal no invasivo que logre probablemente una alta adherencia de sujetos con una especificidad y/o sensibilidad altas y/o mejoradas.

En diversas realizaciones, el cribado según métodos y composiciones de la presente divulgación reduce la mortalidad por cáncer colorrectal, por ejemplo, mediante diagnóstico de cáncer colorrectal temprano. Los datos respaldan que el cribado de cáncer colorrectal reduce la mortalidad por cáncer colorrectal, cuyo efecto persistió durante más de 30 años (véase, por ejemplo, Shaikat 2013 N Engl J Med. 369(12):1106-14). Además, el cáncer colorrectal es particularmente difícil de tratar, al menos en parte porque el cáncer colorrectal, en ausencia de un cribado a tiempo, puede no detectarse hasta que el cáncer ha pasado de los estadios tempranos. Al menos por este motivo, con frecuencia el tratamiento de cáncer colorrectal no es satisfactorio. Para maximizar la mejoría de desenlaces de cáncer colorrectal en toda la población, el uso de cribado según la presente divulgación puede emparejarse, por ejemplo, con inclusión de sujetos elegibles para garantizar un cribado extendido.

El cribado de cáncer colorrectal incluyendo uno o más métodos y/o composiciones dados a conocer en el presente documento va seguido por tratamiento de cáncer colorrectal, por ejemplo, tratamiento de cáncer colorrectal en estadio temprano. El tratamiento de cáncer colorrectal, por ejemplo, cáncer colorrectal en estadio temprano, incluye la administración de una pauta terapéutica que incluye una o más de cirugía, radioterapia y quimioterapia. El tratamiento de cáncer colorrectal, por ejemplo, cáncer colorrectal en estadio temprano, incluye la administración de una pauta terapéutica que incluye uno o más de tratamientos proporcionados en el presente documento para el tratamiento de cáncer colorrectal en estadio 0, cáncer colorrectal en estadio I y/o cáncer colorrectal en estadio II.

El tratamiento de cáncer colorrectal incluye tratamiento de cáncer colorrectal en estadio temprano, por ejemplo, cáncer colorrectal en estadio 0 o cáncer colorrectal en estadio I, mediante una o más de extirpación quirúrgica de tejido canceroso, por ejemplo, mediante escisión local (por ejemplo, mediante colonoscopia), colectomía parcial o colectomía

completa.

El tratamiento de cáncer colorrectal incluye tratamiento de cáncer colorrectal en estadio temprano, por ejemplo, cáncer colorrectal en estadio II, mediante una o más de extirpación quirúrgica de tejido canceroso (por ejemplo, mediante escisión local (por ejemplo, mediante colonoscopia), colectomía parcial o colectomía completa), cirugía para extirpar ganglios linfáticos cerca de tejido de cáncer colorrectal identificado, y quimioterapia (por ejemplo, administración de uno o más de 5-FU y leucovorina, oxaliplatino o capecitabina).

El tratamiento de cáncer colorrectal incluye tratamiento de cáncer colorrectal en estadio III, mediante una o más de extirpación quirúrgica de tejido canceroso (por ejemplo, mediante escisión local (por ejemplo, mediante escisión basada en colonoscopia), colectomía parcial o colectomía completa), extirpación quirúrgica de ganglios linfáticos cerca de tejido de cáncer colorrectal identificado, quimioterapia (por ejemplo, administración de uno o más de 5-FU, leucovorina, oxaliplatino, capecitabina, por ejemplo, en una combinación de (i) 5-FU y leucovorina, (ii) 5-FU, leucovorina y oxaliplatino (por ejemplo, FOLFOX), o (iii) capecitabina y oxaliplatino (por ejemplo, CAPEOX)), y radioterapia.

El tratamiento de cáncer colorrectal incluye tratamiento de cáncer colorrectal en estadio IV, mediante una o más de extirpación quirúrgica de tejido canceroso (por ejemplo, mediante escisión local (por ejemplo, mediante colonoscopia), colectomía parcial o colectomía completa), extirpación quirúrgica de ganglios linfáticos cerca de tejido de cáncer colorrectal identificado, extirpación quirúrgica de metástasis, quimioterapia (por ejemplo, administración de uno o más de 5-FU, leucovorina, oxaliplatino, capecitabina, irinotecán, agente terapéutico dirigido a VEGF (por ejemplo, bevacizumab, ziv-aflibercept o ramucirumab), agente terapéutico dirigido a EGFR (por ejemplo, cetuximab o panitumumab), regorafenib, trifluridina y tipiracilo, por ejemplo, en una combinación de o que incluye (i) 5-FU y leucovorina, (ii) 5-FU, leucovorina y oxaliplatino (por ejemplo, FOLFOX), (iii) capecitabina y oxaliplatino (por ejemplo, CAPEOX), (iv) leucovorina, 5-FU, oxaliplatino e irinotecán (FOLFOXIRI), y (v) trifluridina y tipiracilo (Lonsurf)), radioterapia, infusión arterial hepática (por ejemplo, si el cáncer se ha metastatizado al hígado), ablación de tumores, embolización de tumores, endoprótesis de colon, colorrectomía, colostomía (por ejemplo, colostomía de descarga) e inmunoterapia (por ejemplo, pembrolizumab).

Los expertos en la técnica apreciarán que los tratamientos de cáncer colorrectal proporcionados en el presente documento pueden usarse, por ejemplo, según se determine por un profesional médico, solos o en cualquier combinación, en cualquier orden, pauta y/o programa terapéutico. Los expertos en la técnica apreciarán además que opciones de tratamiento avanzadas pueden ser apropiadas para cánceres en estadio temprano en sujetos que han padecido anteriormente un cáncer o cáncer colorrectal, por ejemplo, sujetos a los que se les diagnostica que tienen un cáncer colorrectal recurrente.

En algunas realizaciones, los métodos y las composiciones para cribado de cáncer colorrectal proporcionados en el presente documento pueden proporcionar información para decisiones y/o acciones de tratamiento y/o pago (por ejemplo, reembolso o reducción de coste de atención médica, tal como cribado o tratamiento), por ejemplo, por individuos, instalaciones de atención sanitaria, profesionales de atención sanitaria, proveedores de seguros de salud, organismos gubernamentales u otras partes interesadas en el coste de atención sanitaria.

En algunas realizaciones, los métodos y las composiciones para cribado de cáncer colorrectal proporcionados en el presente documento pueden proporcionar información para la toma de decisiones referente a si los proveedores de seguro de salud reembolsan (o no) a un receptor o pagador de coste de atención sanitaria, por ejemplo, por (1) cribado realizado por el propio paciente (por ejemplo, reembolso por cribado no disponible de otro modo, disponible solo para cribado periódico/regular o disponible solo para cribado temporal y/o adicional); y/o por (2) tratamiento, incluyendo inicio, mantenimiento y/o alteración de terapia, por ejemplo, basándose en resultados de cribado. Por ejemplo, en algunas realizaciones, los métodos y las composiciones para cribado de cáncer colorrectal proporcionados en el presente documento se usan como base para, para contribuir a, o para respaldar, una determinación sobre si se proporcionará un reembolso o reducción de coste a un receptor o pagador de coste de atención sanitaria. En algunos casos, una parte que busca reembolso o reducción de coste puede proporcionar resultados de un cribado realizado según la presente memoria descriptiva junto con una petición de tal reembolso o reducción de coste de un coste de atención sanitaria. En algunos casos, una parte que realiza una determinación sobre si proporcionar o no un reembolso o reducción de coste de un coste de atención sanitaria llegará a una determinación basándose total o parcialmente en la recepción y/o revisión de resultados de un cribado realizado según la presente memoria descriptiva.

Para evitar cualquier duda, los expertos en la técnica apreciarán, a partir de la presente divulgación, que los métodos y las composiciones para diagnóstico de cáncer colorrectal de la presente memoria descriptiva son al menos para su uso *in vitro*. Por consiguiente, todos los aspectos y realizaciones de la presente divulgación pueden realizarse y/o usarse al menos *in vitro*.

Kits

La presente divulgación incluye, entre otras cosas, kits que incluyen una o más composiciones tal como se abarca por la redacción de las reivindicaciones para su uso en el cribado de cáncer colorrectal tal como se proporciona en el presente documento, opcionalmente en combinación con instrucciones para el uso de las mismas en el cribado de cáncer colorrectal.

Un kit para cribado de cáncer colorrectal puede incluir uno o más de: uno o más cebadores de oligonucleótidos (por ejemplo, uno o más pares de cebadores de oligonucleótidos, por ejemplo, tal como se encuentran en la tabla 13), una o más MSRE, uno o más reactivos para qPCR (por ejemplo, reactivos suficientes para una mezcla de reacción de qPCR completa, incluyendo, sin limitación, dNTP y polimerasa), e instrucciones para el uso de uno o más componentes del kit para cribado de cáncer colorrectal.

Un kit para cribado de cáncer colorrectal puede incluir uno o más de: uno o más cebadores de oligonucleótidos (por ejemplo, uno o más pares de cebadores de oligonucleótidos, por ejemplo, tal como se encuentran en la tabla 13), uno o más reactivos de bisulfito, uno o más reactivos para qPCR (por ejemplo, reactivos suficientes para una mezcla de reacción de qPCR completa, incluyendo, sin limitación, dNTP y polimerasa), e instrucciones para el uso de uno o más componentes del kit para cribado de cáncer colorrectal.

Un kit de la presente divulgación incluye al menos un par de cebadores de oligonucleótidos para la amplificación de un locus de metilación y/o DMR tal como se da a conocer en el presente documento.

En algunos casos, un kit de la presente divulgación incluye uno o más pares de cebadores de oligonucleótidos para la amplificación de uno o más loci de metilación de la presente divulgación. En algunos casos, un kit de la presente divulgación incluye uno o más pares de cebadores de oligonucleótidos para la amplificación de uno o más loci de metilación que son o incluyen la totalidad o una porción de uno o más genes proporcionados en la tabla 1. En algunos casos particulares, un kit de la presente divulgación incluye pares de cebadores de oligonucleótidos para una pluralidad de loci de metilación que son o incluyen, cada uno, la totalidad o una porción de un gen identificado en la tabla 1, incluyendo la pluralidad de loci de metilación, por ejemplo, 3, 4, 5, 6, 7, 8, 9, 10, 11, 12, 13, 14, 15 o 16 loci de metilación, por ejemplo, tal como se proporciona en cualquiera de las tablas 1 a 6.

En algunos casos, un kit de la presente divulgación incluye uno o más pares de cebadores de oligonucleótidos para la amplificación de una o más DMR de la presente divulgación. En algunos casos, un kit de la presente divulgación incluye uno o más pares de cebadores de oligonucleótidos para la amplificación de una o más DMR que son, incluyen la totalidad o una porción de, o están dentro de un gen identificado en la tabla 1.

Un kit de la presente divulgación incluye pares de cebadores de oligonucleótidos para una pluralidad de DMR cada una de las cuales es, incluye la totalidad o una porción de, o está dentro de un gen identificado en la tabla 1, por ejemplo, 2, 3, 4, 5, 6, 7, 8, 9, 10, 11, 12, 13, 14, 15 o 16 DMR, por ejemplo, según una cualquiera de las tablas 1 a 6.

En algunos casos, un kit de la presente divulgación incluye uno o más pares de cebadores de oligonucleótidos para la amplificación de una o más DMR de la tabla 7. En algunos casos particulares, un kit de la presente divulgación incluye pares de cebadores de oligonucleótidos para una pluralidad de DMR de la tabla 7, incluyendo la pluralidad de DMR, por ejemplo, 2, 3, 4, 5, 6, 7, 8, 9, 10, 11, 12, 13, 14, 15, 16, 17, 18, 19, 20, 21, 22, 23, 24, 25, 26, 27 o 28 DMR de la tabla 7, por ejemplo, tal como se proporciona en cualquiera de las tablas 8 a 12.

Un kit de la presente divulgación incluye uno o más pares de cebadores de oligonucleótidos proporcionados en la tabla 13. Los expertos en la técnica apreciarán que los pares de cebadores de oligonucleótidos proporcionados en la tabla 13 pueden proporcionarse en cualquier combinación de uno o más pares de cebadores de oligonucleótidos, por ejemplo, en una combinación tal como se proporciona en una cualquiera de las tablas 1-12.

En diversas realizaciones particulares, un kit de la presente divulgación no incluye pares de cebadores de oligonucleótidos que amplifican la totalidad o una porción de uno o más de FGF14, ZNF471, PDGFD y ALK.

Un kit de la presente divulgación puede incluir además una o más MSRE de manera individual o en una única disolución. En diversas realizaciones, una o más MSRE se seleccionan del conjunto de MSRE que incluyen Acil, Hin6I, HpyCH4IV y HpaII (por ejemplo, de tal manera que el kit incluye Acil, Hin6I y HpyCH4IV, o bien de manera individual o bien en una única disolución). En determinadas realizaciones, un kit de la presente divulgación incluye uno o más reactivos para qPCR (por ejemplo, reactivos suficientes para una mezcla de reacción de qPCR completa, incluyendo, sin limitación, dNTP y polimerasa).

Ejemplos

Los presentes ejemplos confirman que la presente divulgación proporciona métodos y composiciones para, entre otras cosas, cribado y tratamiento de cáncer colorrectal. Los presentes ejemplos demuestran además que las composiciones y los métodos proporcionados en el presente documento proporcionan un grado notablemente alto de

sensibilidad y especificidad en el cribado y/o tratamiento de cáncer colorrectal. También se proporcionan estudios clínicos que comparan la metilación de biomarcadores en muestras de sujetos a los que se les diagnostica que tienen cáncer colorrectal y la metilación de biomarcadores en muestras de sujetos de control, demostrando adicionalmente el cribado de cáncer colorrectal incluyendo los métodos y/o las composiciones de la presente divulgación. Salvo si se menciona específicamente lo contrario, las muestras de los presentes ejemplos son seres humanos o de origen humano. Con la excepción del ejemplo 1, todos los experimentos se realizaron usando muestras de plasma.

Ejemplo 1. Identificación de biomarcadores de metilación asociados con cáncer colorrectal

- El presente ejemplo incluye la identificación de loci de CpG que están hipermetilados en uno o más de cáncer de colon y cáncer rectal en comparación con controles sanos. En particular, experimentos del presente ejemplo examinaron la metilación de CpG en muestras de (i) cánceres de colon de 341 sujetos a los que anteriormente se les diagnosticó que padecían cáncer de colon, sujetos que no se habían tratado anteriormente mediante quimioterapia o radioterapia; (ii) cánceres rectales de 118 sujetos a los que anteriormente se les diagnosticó que padecían cáncer rectal, sujetos que no se habían tratado anteriormente mediante quimioterapia o radioterapia; (iii) colonos de 40 sujetos de control sano a los que no se les diagnosticó que padecían cáncer colorrectal; y (iv) leucocitos de 10 sujetos de control sano a los que no se les diagnosticó que padecían cáncer colorrectal. Las muestras de tejido eran de tejido congelado reciente.
- Se analizaron las muestras para detectar metilación de ADN mediante una plataforma de análisis de metilómica global (matriz de perlas Infinium HumanMethylation450 (HM450)). La matriz Infinium HumanMethylation450 evalúa el estado de metilación de >450.000 CpG ubicados a lo largo de todo el genoma. Se obtuvieron perfiles de metilación de ADN de todas las muestras de tejido.
- Se identificaron sitios de metilación de CpG para los que el estado de metilación no difirió sustancialmente entre un cáncer colorrectal y controles sanos y se eliminaron de la consideración (valor de b medio < 0,25 y valor de b > 0,3 en no más de cinco muestras a lo largo de todo el conjunto). Este filtrado produjo una lista de sitios de metilación de CpG para los que el estado de metilación difirió sustancialmente entre un cáncer colorrectal y controles sanos. Entonces se filtró adicionalmente el conjunto resultante de sitios de metilación de CpG excluyendo sitios de metilación de CpG con una diferencia de valor de b medio igual o inferior a 0,1, proporcionando 253 sitios de metilación de CpG. Cada uno de los 253 sitios de metilación de CpG estaba asociado con un estado hipermetilado en el estado de cáncer colorrectal en comparación con controles. Por tanto, el presente ejemplo generó un conjunto de 253 sitios de metilación de CpG individuales que son biomarcadores de metilación para cáncer colorrectal. Los 253 biomarcadores de metilación representan una pluralidad de DMR juntas encontradas dentro de 36 genes, es decir, dentro de 36 loci de metilación. Cada una de las 36 DMR está hipermetilada en cáncer colorrectal en comparación con controles sanos.

Ejemplo 2. Desarrollo de ensayo de ADN libre de células para detectar biomarcadores de metilación mediante MSRE-qPCR

- El presente ejemplo desarrolla un ensayo para determinar el estado de metilación de biomarcadores de metilación de cáncer colorrectal basándose en ADN libre de células circulante (ADNlc). El ADNlc es incompleto y está fragmentado, y se desconoce el mecanismo mediante el cual se transmite el ADNlc desde células cancerosas hasta la sangre (como una porción denominada ADN tumoral circulante). Al menos porque los 253 biomarcadores de metilación del ejemplo 1 se identificaron a partir de muestras de tejido, antes de los experimentos del presente ejemplo no se sabía si los biomarcadores de metilación de cáncer colorrectal identificados podían analizarse de manera suficiente a partir de ADNlc como para captar de manera satisfactoria la porción de ADNlc que permite identificar sujetos o muestras para cáncer colorrectal.

- Como etapa crítica hacia la determinación de si los biomarcadores de metilación de cáncer colorrectal identificados en el ejemplo 1 podían analizarse de manera suficiente a partir de ADNlc como para captar de manera satisfactoria la porción de ADNlc que permite la identificación de sujetos o muestras para cáncer colorrectal, se desarrolló un ensayo sensible para el cribado de estos biomarcadores. En particular, se desarrolló una metodología de qPCR con enzimas de restricción sensibles a la metilación (MSRE). La metodología de MSRE-qPCR se desarrolló para medir la metilación de DMR que cubren sitios de CpG identificados en muestras de sangre, en particular en ADN libre de células (ADNlc) de tumores presentes en sangre.

- El desarrollo de la metodología de MSRE-qPCR fue significativo, al menos en parte, porque analizar biomarcadores de metilación de CpG derivados a partir de tejido tumoral mediante análisis de ADNlc resulta difícil debido a la baja concentración de ADN derivado de tumor circulante en sangre (0,1 - 1%) en comparación con el contexto de ADN no tumoral de la muestra. Por tanto, aunque generalmente se prefiere desarrollar análisis de biomarcadores que se basan en muestras fáciles de obtener tales como sangre, orina o heces, el uso de sangre para el análisis de biomarcadores de metilación derivados de tumor es difícil. Por tanto, incluso tras la identificación de biomarcadores de metilación característicos de cáncer colorrectal en tejido, tal como se comentó anteriormente, no puede predecirse si la naturaleza fragmentada y mal entendida del ADNlc permitirá un cribado satisfactorio usando biomarcadores de metilación

identificados en tejido.

MSRE-qPCR requiere el diseño de cebadores de oligonucleótidos (pares de cebadores de oligonucleótidos de MSRE-qPCR) que amplifican loci que incluyen, cada uno, al menos un sitio de escisión de MSRE de cáncer colorrectal (es decir, un sitio de escisión de MSRE que cubre al menos un sitio de biomarcador de metilación de cáncer colorrectal, de tal manera que se permite la escisión del sitio de escisión de MSRE en moléculas de ácido nucleico en las que la totalidad del al menos un sitio de biomarcador de metilación de cáncer colorrectal no están metilados y se bloquea en moléculas de ácido nucleico en las que al menos uno del al menos un sitio de biomarcador de metilación de cáncer colorrectal está metilado). Los ensayos de MSRE-qPCR pueden usar múltiples enzimas de restricción para potenciar el intervalo de sitios de biomarcador de metilación de cáncer colorrectal que pueden someterse a ensayo mediante una única reacción de MSRE-qPCR, ya que es poco probable que una única MSRE escinda sitios que juntos incluyen todos los sitios de biomarcador de metilación de interés. Los ensayos de MSRE-qPCR de los presentes ejemplos usan las MSRE Acil, Hin6I y HpyCH4IV, que se encuentra que juntas proporcionan una cobertura suficiente. En la figura 1 se proporciona un flujo de trabajo esquemático a modo de ejemplo para MSRE-qPCR. Tal como se realiza en los presentes ejemplos, se extrajo ADN tumoral libre de células circulante a partir de sangre de sujeto (normalmente una muestra de plasma de aproximadamente 4 ml) mediante kit de ADNIcc QIAamp MinElute según el protocolo del fabricante (QIAamp MinElute ccfDNA Handbook 08/2018, Qiagen). Tal como se muestra en la figura 1, se dividió ADNIc aislado en dos alícuotas, una primera de tales alícuotas se usa en un análisis de control de calidad de qPCR y una segunda de tales alícuotas se usa en MSRE-qPCR

Para MSRE-qPCR, 2/3 del ADNIc eluido en volumen se digirió con MSRE. Dado que el ADN sin metilar se escinde de manera selectiva, poner en contacto el ADNIc con las MSRE enriquece la muestra para la señal derivada de metilación; el ADN metilado permanece intacto y cuantificable. El 1/3 restante de ADNIc eluido en volumen se usó para qPCR usando los cebadores de oligonucleótidos de MSRE-qPCR para confirmar que se amplificaron amplicones satisfactoriamente a partir de ADNIc, amplificación que confirma que hay molde presente, proporcionando por tanto un control de calidad técnica.

Tal como se aplica en el presente documento, se desarrollaron satisfactoriamente pares de cebadores de oligonucleótidos de MSRE-qPCR para la amplificación de DMR juntos incluyendo 180 de los 253 sitios de biomarcador de metilación de CpG identificados en el ejemplo 1. Las DMR incluyeron normalmente de 1 a 15 sitios de escisión de MSRE, sitios de escisión de MSRE que juntos cubrían cada uno de los 180 sitios de biomarcador de metilación. Tal como se aplica en el presente documento, el estado de metilación de seis genes (JUB, H19, TBP, TCEB2, SNRPN, IRF4) proporcionó un control de metilación, control que permitió la monitorización de la robustez y reproducibilidad del ensayo.

Ejemplo 3. MSRE-qPCR de ADNIc distingue satisfactoriamente sujetos en función del estado de cáncer colorrectal

Para examinar el poder de diagnóstico y pronóstico clínico de biomarcadores de metilación identificados, se sometieron a ensayo las DMR amplificadas mediante los pares de cebadores de oligonucleótidos de MSRE-qPCR que cubrían los 180 sitios de biomarcador de metilación, y controles apropiados, en ADNIc extraído a partir de plasma de sujetos humanos. Los sujetos eran individuos no diagnosticados que buscaban, o estaban en proceso de obtener, un diagnóstico referente a posible cáncer colorrectal, de tal manera que pudo realizarse el análisis de biomarcador de metilación antes que una prueba de diagnóstico tradicional para detectar cáncer colorrectal y después se comparó con un diagnóstico tradicional posterior. En particular, se tomaron muestras de ADNIc a partir de individuos no diagnosticados que buscaban, o estaban en proceso de obtener, un diagnóstico referente a posible cáncer colorrectal en centros de cribado y clínicas oncológicas en España y en Estados Unidos entre 2017 y 2018. Un primer grupo de sujetos incluyó 70 de tales individuos (véase la descripción del primer grupo de sujetos en la figura 2), y un segundo grupo de sujetos incluyó 63 de tales individuos (véase la descripción del segundo grupo de sujetos en la figura 3). Los resultados iniciales basándose en el análisis de MSRE-qPCR de un pequeño panel de DMR sometidas a prueba de genes mostrados en la tabla 14 en el segundo grupo de sujetos proporcionaron prueba de concepto para el diagnóstico de cáncer colorrectal: los resultados demostraron una sensibilidad de diagnóstico global del 80% para cáncer colorrectal, con una sensibilidad de diagnóstico de hasta el 75% para cáncer colorrectal localizado temprano, y una especificidad del 90% (figura 4). El panel de prueba de concepto representativo de DMR presentó un rendimiento similar, y/o estadísticamente igual de bueno, con respecto a cánceres proximales y cánceres distales (figura 4). El panel de prueba de concepto de DMR también presentó un rendimiento similar, y/o estadísticamente igual de bueno, con respecto a cáncer localizado y cáncer avanzado (figura 4). Además, el análisis mediante MSRE-qPCR de la metilación de genes de control de MSRE-qPCR y de controles de ADN sin digerir mostró una alta fiabilidad técnica de los ensayos de MSRE-qPCR desarrollados en la medición del estado de metilación de biomarcador de cáncer colorrectal en ADNIc en plasma.

Las figuras 5-9 muestran la asociación del estado de metilación de DMR de cáncer colorrectal con el cáncer colorrectal. Los resultados se presentan como el valor de Ct de MSRE-qPCR restado de 45 (es decir, 45 - valor de Ct) con fines de presentación. Los resultados demuestran el poder predictivo sorprendentemente alto de biomarcadores de metilación de cáncer colorrectal individuales, o de tan solo tres biomarcadores de metilación de cáncer colorrectal

individuales, de la presente divulgación para cáncer colorrectal, por ejemplo, para su uso en la determinación del cribado de cáncer colorrectal en un sujeto.

Tabla 14. Panel de DMR de prueba de concepto

gen	chr	inicio	terminación	anchura	uid
PDGFD	chr11	104163499	104164026	528	PDGFD_chr11_104163499_104164026
FGF14	chr13	101919879	102403137	483259	FGF14_chr13_101919879_102403137
ALK	chr19	58439728	58440994	1267	ALK_chr19_58439728_58440994
LONRF2	chr2	29193215	29922286	729072	LONRF2_chr2_29193215_29922286
JAM2	chr2	68293114	68320928	27815	JAM2_chr2_68293114_68320928

Ejemplo 4. Validación adicional de biomarcadores de metilación mediante MSRE-qPCR

Para verificar el poder predictivo de DMR de biomarcador de metilación para cáncer colorrectal, se analizaron adicionalmente datos derivados del análisis de MSRE-qPCR de muestras de los 133 sujetos del primer y segundo grupos de sujetos identificados en el ejemplo 3 (véanse las figuras 2 y 3). Se usó una validación cruzada de Monte-Carlo a lo largo de 50 series y se usó un algoritmo de bosque aleatorio para la clasificación de características y se usaron marcadores con VIP >2 para construir un modelo de clasificación basado en algoritmo de máquina de vectores de soporte (SVM). Este análisis identificó varios subconjuntos de marcadores (2, 3, 5, 8, 15, 28 tal como se describe en las tablas 7-12) que, en el modelo de SVM, dieron una buena predicción.

Todos los modelos (paneles de 2, 3, 5, 8, 15 y 28 DMR de cáncer colorrectal) se aplicaron a ADNlc extraído a partir de plasma de un tercer grupo de sujetos. El tercer grupo de sujetos incluyó 82 sujetos que o bien habían recibido anteriormente un diagnóstico confirmado de cáncer colorrectal o bien eran sujetos de control que se sabía que no tenían cáncer colorrectal (incluyendo el grupo de control sujetos que tenían pólipos hiperplásicos y/o adenoma no avanzado, pero no cáncer colorrectal), basándose en cribado por colonoscopia. Los 82 sujetos eran sujetos que acudían a unidades de oncología y cribado de cáncer colorrectal en España y Estados Unidos. En la figura 10 se muestra una descripción adicional del tercer grupo de sujetos.

Pares de cebadores de oligonucleótidos (tabla 13) para la amplificación de las 28 DMR en MSRE-qPCR cubren al menos un sitio de escisión de MSRE, normalmente de 3 a 15 sitios de escisión de MSRE. Se llevó a cabo MSRE-qPCR según la metodología descrita en el ejemplo 2.

Independientemente de la suficiencia y utilidad de todos los paneles sometidos a prueba para el cribado de cáncer colorrectal, los expertos en la técnica apreciarán que el panel de 28 DMR proporcionó una sensibilidad aumentada y especificidad comparable en comparación con todos los demás paneles de DMR indicados en la tabla 15. Para evitar cualquier duda, todos los paneles sometidos a prueba, por ejemplo, tal como se describe en las tablas 7-14, son individualmente suficientes por sí solos (por ejemplo, tanto en cuanto a la sensibilidad como en cuanto a la especificidad), y útiles, para el cribado clínico de cáncer colorrectal. El análisis del tercer grupo de sujetos usando el panel de 28 DMR de cáncer colorrectal mostró una sensibilidad general para el diagnóstico de cáncer colorrectal del 79%, con una sensibilidad del 75% para cáncer localizado (temprano) y una sensibilidad del 84% para cáncer avanzado. Los datos también revelaron una especificidad del 87% a un AUC del 82% (figura 11). En la figura 11 se proporciona un análisis de curva ROC de los datos del segundo grupo de validación basándose en un panel de 28 marcadores identificado mediante el modelo de SVM.

Por tanto, la evaluación del rendimiento del panel de 28 DMR de cáncer colorrectal y subconjuntos del mismo reveló que tanto el panel completo como cada uno de los diversos conjuntos de 2, 3, 5, 8 y 15 de las 28 DMR de cáncer colorrectal son individualmente suficientes para el cribado clínico de cáncer colorrectal (véanse las tablas 7-14). Por ejemplo, por destacar tan solo un ejemplo, el subconjunto de 3 DMR (tabla 9) alcanzó una buena separación de sujetos con cáncer colorrectal con respecto a sujetos de control, demostrando un rendimiento suficiente para el cribado clínico de cáncer colorrectal, al menos en parte tal como se demuestra mediante la sensibilidad determinada del 60% y la especificidad del 87% (tabla 15).

En la tabla 16 se describen características del modelo de SVM. Los vectores de SVM de soporte de entrada y sus valores de coeficiente (ponderación) se facilitan en la tabla 17 (debido al tamaño de la tabla 17, la tabla 17 se presenta en varias porciones, con los coeficientes y nombres de gen repetidos en cada porción para referencia). Con fines de predicción, se usó la información proporcionada en combinación con la función de predicción () en el paquete R (véase el protocolo seguro de transferencia de hipertexto ([HTTPS://cran.r-project.org/web/packages/e1071/index.html](https://cran.r-project.org/web/packages/e1071/index.html))).

Tabla 15. Métrica de precisión para la aplicación del panel de 28 DMR de cáncer colorrectal y subconjuntos del mismo al tercer grupo de sujetos

	2	3	5	8	15	28
--	---	---	---	---	----	----

AUC	0,77	0,82	0,83	0,83	0,82	0,82
AUC CI LOW	0,67	0,73	0,73	0,74	0,73	0,72
AUC CI HIGH	0,87	0,91	0,92	0,92	0,92	0,92
Sensibilidad	0,63	0,60	0,65	0,53	0,72	0,79
Especificidad	0,79	0,87	0,82	0,87	0,79	0,87

Tabla 16. Características de entrada de modelo de SVM

var.	valor
tipo	0
núcleo	2
coste	1
grado	3
gamma	0,035714
coef0	0
nu	0,5
épsilon	0,1
nclases	2
rho	-0,73551
probA	-2,14936
probB	-0,10114
sigma	0

5 Tabla 17. Vectores de SVM

coef.	GSG1L	ZNF492 2	ZNF568 2	ZNF568 1	ZNF542 2
	GSG1L '861	ZNF492 '499	ZNF568 '252	ZNF568 '405	ZNF542 '525
1	0,166333806	0,423405118	-0,939531248	0,275236404	-0,052862411
1	0,183718034	-2,19255911	-0,092363545	-0,327541264	0,309450278
0,160992568	-0,094429617	-2,19255911	-0,939531248	-0,413652359	0,137466406
1	0,475386751	0,318930431	-0,147777884	0,019978514	0,164983826
1	-0,152377044	0,473593938	1,146062978	0,429006217	0,574305439
1	0,315065536	0,442866089	0,835406834	0,041506288	0,55940017
0,539110203	-0,428593114	0,344536972	0,864793226	-0,0507556	0,174156299
1	0,143154835	-2,19255911	0,848840613	-0,373672208	0,025103611
0,228841426	-0,16396653	0,392677269	-0,939531248	-0,0507556	0,161544148
1	0,691723813	0,288202582	-0,939531248	0,232180856	0,641952428
1	0,152812739	0,548365038	0,897538063	0,321367348	0,6259006
0,086502196	0,152812739	0,413162502	-0,939531248	-0,318315075	0,260148235
1	0,058165275	0,455157229	-0,939531248	-0,035378619	0,421813073
0,022981588	-0,055797999	-2,19255911	-0,939531248	-0,469009492	0,310596837
0,199753156	0,029191561	0,425453641	-0,939531248	-0,192223828	0,392002536
0,640672506	0,401986676	0,512515881	0,731295044	-0,352144434	-2,050168434
0,488436741	0,11224954	-2,19255911	-0,939531248	-0,327541264	-2,050168434
0,290813367	0,038849466	0,455157229	0,842963334	0,038430892	0,370217912
0,93438076	-0,165898111	0,292299628	0,996612184	-0,293711905	0,182182213
1	0,34597083	0,531976852	-0,939531248	0,622756182	0,534175869
0,177133374	0,291886565	0,201140342	0,931122511	0,312141159	0,439011461
0,363673626	-0,252819252	0,199091819	-0,939531248	-0,232203979	0,408054364
0,372869951	-0,022961123	-2,19255911	-0,939531248	-0,438255529	-2,050168434
0,180416799	-0,0152348	0,246207854	-0,939531248	-0,247580961	0,130587052
1	1,837151292	1,131169911	-0,939531248	1,084065621	1,180835225
0,236974727	-4,54286045	0,032137172	-0,240135117	-0,619703909	-2,050168434
0,433173404	-4,54286045	-2,19255911	-0,939531248	-0,40442617	0,427545869
0,037394649	0,15474432	-2,19255911	-0,939531248	-0,204525413	0,471115116
1	0,245528623	0,455157229	-0,939531248	-0,207600809	0,380536944
0,263636311	-4,54286045	-2,19255911	-0,939531248	-1,72992196	-2,050168434
1	0,682065908	0,557583393	1,034394689	0,828807731	0,838014042
1	-0,042276933	0,55553487	0,775794438	0,158371346	0,349579848
1	0,025328399	0,467448369	0,848001002	-0,524366624	0,018224256
0,26169536	-4,54286045	-2,19255911	-0,939531248	-7,963750185	-2,050168434

Tabla 17, continuación. Vectores de SVM

coef.	GSG1L	ZNF492 2	ZNF568 2	ZNF568 1	ZNF542 2
	GSG1L '861	ZNF492 '499	ZNF568 '252	ZNF568 '405	ZNF542 '525
0,1799778	0,295749727	0,267717349	-0,939531248	0,226030064	0,467675439
0,898868481	-0,18521392	0,324051739	-0,939531248	-0,023077034	0,29339845
0,042908076	0,019533657	0,191921987	-0,939531248	-0,622779305	0,275053503
0,140898434	-4,54286045	0,204213127	-0,939531248	-0,567422172	0,123707697
0,140415448	0,293818146	-2,19255911	-0,939531248	-0,699664211	0,061793503
1	0,166333806	0,135587597	-0,939531248	-0,044604807	0,459649525
0,108835219	-0,378372011	0,333270094	-0,939531248	-0,604326927	-2,050168434
1	0,608665834	0,370143513	0,901736119	0,641208559	0,750875547
-1	0,322791859	-2,19255911	1,066299914	0,186049912	0,550227697
-1	0,025328399	-2,19255911	-0,497895756	0,026129307	0,433278665
-1	0,311202374	0,387555961	-0,939531248	-0,182997639	0,5192706
-1	-0,059661161	0,322003216	1,020121298	0,422855425	0,403468127
-1	0,403918257	0,612893521	0,959669292	0,468986368	0,589210708
-1	0,172128548	0,145830214	0,701908652	0,182974516	0,491753181
-1	-0,16396653	0,411113978	-0,939531248	-0,336767452	0,473408235
-1	0,336312926	0,694834453	-0,939531248	0,819581542	0,740556515
-0,27309104	1,360050807	0,923244798	1,68509337	2,378807448	1,22669759
-1	2,101777876	1,346264856	1,939495565	3,255295383	1,550027268
-1	0,712971203	0,404968409	0,776634049	0,475137161	-2,050168434
-0,675668601	0,382670867	0,677422005	1,048668079	0,579700634	0,674056084
-1	0,245528623	0,403944147	-0,939531248	-0,545894398	-2,050168434
-0,228886868	1,516508861	0,993918852	1,713640151	2,252716201	1,264534042
-1	0,523676274	0,505346049	0,922726399	0,272161008	0,602969418
-0,253709663	0,53719734	0,671276435	-0,939531248	0,186049912	0,764634257
-1	-0,007508476	-2,19255911	-0,939531248	-0,284485716	0,336967697
-1	0,465728846	0,297420936	-0,939531248	0,075335647	0,648831783
-1	0,206897005	0,52480702	0,981499183	0,066109458	0,583477912
-1	0,626050062	0,583189934	-0,939531248	0,804204561	0,654564579
-1	0,094865312	0,356828111	0,968065404	0,112240402	0,397735331
-1	0,04850737	-2,19255911	-0,939531248	-1,041033197	0,29339845
-1	-0,241229766	-2,19255911	0,913490675	-0,14916828	0,136319847
-1	0,419370905	-2,19255911	-0,939531248	0,099938817	0,659150816
-1	0,228144395	0,438769043	0,834567222	0,413629236	0,549081138
-1	0,45220778	0,585238457	0,886623117	-0,103037336	0,838014042
-1	0,237802299	0,444914613	-0,939531248	0,078411043	0,295691568

5 Tabla 17, continuación. Vectores de SVM

coef.	ZNF542 1	ZNF471 2	ZNF471 1	ZNF471 3	ZNF132 2
	ZNF542 '502	ZNF471 '527	ZNF471 '558	ZNF471 '662	ZNF132 '268
1	0,210023302	0,448781467	0,381358009	0,276869984	-0,079808848
1	0,096511033	-1,701659498	0,111027436	0,245615084	0,220719423
0,160992568	0,011755205	0,491015986	0,192253523	0,011882788	0,004011962
1	0,075322076	0,362552655	0,179561947	0,342097602	0,355650484
1	0,438561338	0,531490735	0,353436542	0,351609963	0,275918493
1	0,322022075	0,502454502	0,314092655	0,193976554	0,091921593
0,539110203	0,007214715	0,395108431	0,091990071	0,143696932	-0,206562268
1	0,010241709	0,604521258	0,298862764	0,238820541	0,200275323
0,228841426	0,010241709	-1,701659498	-0,009542539	-3,291624259	0,120543333
1	0,477912258	0,220891037	0,146563849	0,172234015	0,333161974
1	0,228185265	0,381030258	0,097066702	0,160003836	0,380183404
0,086502196	0,116186493	-1,701659498	-0,38775151	-0,122649173	-0,237228418
1	0,194888333	0,592202857	0,357244014	0,299971432	0,053077803
0,022981588	-0,13808099	-1,701659498	-0,060308843	-3,291624259	-0,186118168
0,199753156	0,15705091	0,495415416	0,260788035	0,227949271	-0,034831828
0,640672506	0,120726984	-1,701659498	0,215098361	0,210283458	0,183920043

0,488436741	0,05867361	-1,701659498	0,02853219	0,007806062	-0,341493329
0,290813367	0,063214101	0,449661352	0,10848912	0,248332902	0,433338064
0,93438076	0,043538641	0,359912998	0,034877978	-0,051985921	0,051033393
1	0,211536799	-1,701659498	-0,187224606	-0,012577568	0,482403904
0,177133374	0,264509192	0,375750943	0,046300397	-3,291624259	-7,69E-05
0,363673626	0,073808579	0,258726128	0,171947002	-0,049268103	-0,204517858
0,372869951	-3,407234345	0,527971191	0,279825399	0,138261297	-0,406914449
0,180416799	-3,407234345	-1,701659498	-0,136458301	-3,291624259	-0,406914449
1	1,345145995	1,182606248	1,282459921	1,285180239	1,347189337
0,236974727	-3,407234345	-1,701659498	-2,980640533	-0,383559643	-0,085942078
0,433173404	0,001160727	0,382790029	0,060261131	-0,069651734	-0,110474998
0,037394649	-0,468023319	0,373111285	0,013302299	-0,008500842	-0,257672518
1	0,455209804	0,5957224	0,409279477	0,446733572	0,001967552
0,263636311	-3,407234345	-1,701659498	-2,980640533	0,049932232	-5,066124854
1	0,721585263	0,52181199	0,325515074	0,344815419	0,791109815
1	0,060187107	0,342315281	0,10848912	-0,046550286	0,071477493
1	-0,038190193	0,419745234	0,317900128	0,173592923	-0,413047679
0,26169536	-3,407234345	0,529730963	0,213829203	-0,096829908	-0,366026249

Tabla 17, continuación. Vectores de SVM

coef.	ZNF542 1	ZNF471 2	ZNF471 1	ZNF471 3	ZNF132 2
	ZNF542 '502	ZNF471 '527	ZNF471 '558	ZNF471 '662	ZNF132 '268
0,1799778	0,155537413	-1,701659498	-0,034925691	0,191258736	-5,066124854
0,898868481	0,278130664	0,655554636	0,5463485	0,405966311	-0,192251398
0,042908076	0,079862567	0,491895872	0,225251622	0,179028558	0,020367243
0,140898434	0,051106125	-1,701659498	-0,243067541	-3,291624259	-5,066124854
0,140415448	-0,074514119	-1,701659498	-2,980640533	0,154568201	-0,304693949
1	0,128294469	0,220011151	-0,135189143	0,202130006	0,106232463
0,108835219	-3,407234345	-1,701659498	-2,980640533	-3,291624259	0,026500473
1	0,526344159	-1,701659498	-0,140265774	0,233384906	0,603024094
-1	0,368940479	0,572845368	0,377550536	0,036343145	0,177786813
-1	0,31445459	0,503334388	0,298862764	0,181746375	0,132809793
-1	0,240293241	0,61683966	0,287440345	0,473911746	0,378138994
-1	0,134348456	0,407426833	0,248096459	0,279587802	-0,165674068
-1	0,424939866	0,570205711	0,39151127	0,305407067	0,523292104
-1	0,347751522	0,558767195	0,404202846	0,324431789	0,210497373
-1	0,325049069	0,280723273	0,102143332	0,295894706	-0,286294258
-1	0,577803055	0,540289593	0,434662629	0,505166646	0,881063855
-0,27309104	1,379956424	0,847369747	0,820486547	0,710361859	1,046661066
-1	1,806762557	1,486166858	1,711435198	1,720031023	2,25286297
-1	0,343211032	0,614200002	0,400395374	0,426349941	0,654134345
-0,675668601	0,455209804	0,547328679	0,424509368	0,408684128	0,776798945
-1	-0,012460745	0,328237108	-0,031118218	-0,007141934	0,077610723
-0,228886868	1,384496915	1,151810244	1,269768345	1,328665317	1,330834057
-1	0,391642933	0,754981735	0,631382061	-3,291624259	0,118498923
-0,253709663	0,741260723	1,184366019	1,220271198	1,031064312	0,367916944
-1	-0,147161972	-1,701659498	-0,187224606	-0,133520443	0,065344263
-1	0,536938638	0,610680459	0,408010319	0,446733572	0,425160424
-1	0,188834345	-1,701659498	0,259518877	0,237461632	0,480359494
-1	0,421912872	0,484856786	0,344552438	0,318996154	0,692978135
-1	0,190347842	0,604521258	0,31663097	0,270075441	-0,024609778
-1	0,060187107	0,410946376	0,26332635	0,282305619	0,108276873
-1	0,043538641	0,546448794	0,279825399	0,100211854	-0,063453568
-1	0,443101829	0,402147518	0,429585999	0,274152167	0,055122213
-1	0,446128822	0,451421124	0,211290888	0,308124884	0,220719423
-1	0,774557655	0,410946376	0,221444149	0,145055841	0,717511055
-1	0,110132505	0,549968337	0,243019828	-0,111777904	0,273874083

5 Tabla 17, continuación. Vectores de SVM

coef.	ZNF132 1	JAM2	MCIDAS 1	MCIDAS 2	PDGFD 1
	ZNF132 '415	JAM2 '320	MCIDAS '855	MCIDAS '003	PDGFD '388
1	0,238896666	0,406419198	0,492859834	0,416450063	0,046762915
1	-0,397730773	-2,423671354	0,320276073	0,121123394	-0,124572283
0,160992568	-0,170552517	-2,423671354	-2,052243039	0,091026409	-0,261640442
1	0,347202579	0,464995238	0,485753444	0,245273459	0,426555938
1	0,120024323	0,545266109	0,761887461	0,544362251	-0,027482338
1	0,006435195	0,297945048	0,524330991	0,190722673	0,235231633
0,539110203	-0,693590827	0,228521593	0,262409754	0,038356684	-0,53577676
1	-0,550944015	0,287097633	0,044142056	-0,183608583	0,20382018
0,228841426	-0,352823443	0,214419954	0,199467441	0,028951376	0,121008168
1	0,299653641	0,447639374	0,58219731	0,501097835	0,423700352
1	0,26795435	0,317470395	0,572045325	0,252797705	0,266643087
0,086502196	-0,487545432	0,333741518	0,359868819	0,213295412	-0,16169491
1	0,088325031	0,395571783	0,40961355	0,333683353	0,126719341
0,022981588	-1,155872162	-2,423671354	-2,052243039	0,019546069	-0,669989332
0,199753156	-0,231309492	-2,423671354	0,225862604	0,043999869	-0,17882843
0,640672506	0,407959554	0,378215919	0,320276073	0,141815072	0,152419621
0,488436741	-0,410938811	-0,105578787	0,311139286	-4,590935879	-0,375863908
0,290813367	-0,049038566	0,15367443	-2,052243039	0,168149934	0,358021859
0,93438076	-0,614342598	0,187301416	-0,001541881	-0,078269134	-0,624299946
1	0,415884377	0,216589437	0,588288502	0,241511336	0,469389738
0,177133374	0,135873968	0,230691076	0,443115103	0,15122038	0,132430514
0,363673626	-0,025264097	0,130894859	0,318245676	0,072215793	-0,247362509
0,372869951	-0,281500037	0,267572287	0,200482639	-0,042528964	-0,190250776
0,180416799	-6,542110115	0,37930066	0,199467441	-0,245683615	-0,435831227
1	1,855560534	1,410889819	1,44105532	1,953277379	1,120463492
0,236974727	-0,71208208	-2,423671354	-2,052243039	-4,590935879	-0,344452455
0,433173404	0,104174677	-0,128358358	0,297941704	-0,078269134	0,292343366
0,037394649	-0,226026277	0,150420206	-2,052243039	0,049643054	-0,104583177
1	-0,424146849	0,275165477	-2,052243039	0,072215793	0,063896435
0,263636311	-6,542110115	-0,08605344	-2,052243039	-0,591798947	-7,103626036
1	0,69061157	0,407503939	0,605546878	0,314872738	1,134741426
1	-0,038472135	0,309877205	0,161905093	-0,241921492	0,295198953
1	-0,014697667	0,199233573	0,256318562	-0,24004043	-0,407275361
0,26169536	-0,878503361	0,122216927	0,038050865	-4,590935879	-0,415842121

Tabla 17, continuación. Vectores de SVM

coef.	ZNF132 1	JAM2	MCIDAS 1	MCIDAS 2	PDGFD 1
	ZNF132 '415	JAM2 '320	MCIDAS '855	MCIDAS '003	PDGFD '388
0,1799778	-0,125645187	0,492113775	0,581182112	0,352493969	-7,103626036
0,898868481	0,101533069	-2,423671354	0,41671994	0,02142713	-0,470098267
0,042908076	-0,281500037	-2,423671354	0,402507159	-0,345379879	-0,235940162
0,140898434	-0,532452762	0,177538743	-2,052243039	-0,040647902	-0,707111958
0,140415448	-0,136211617	-2,423671354	0,160889894	0,143696133	-0,147416977
1	0,006435195	0,180792967	0,542604565	0,326159107	-0,304474242
0,108835219	-0,292066467	-2,423671354	0,051248446	-0,388644296	-0,632866706
1	0,574380834	0,446554633	0,667473992	0,598913037	0,812060135
-1	0,196630944	0,384724368	0,345656038	0,218938597	0,363733032
-1	0,180781298	0,228521593	0,117236355	-0,119652489	0,546490577
-1	0,471358137	0,249131681	0,483723047	-0,149749474	0,483667671
-1	-0,022622489	0,469334204	0,406567954	0,145577195	-0,007493231
-1	0,574380834	0,309877205	0,617729261	0,132409764	0,466534151
-1	0,030209663	0,205742022	0,451236692	-0,003026671	-0,010348818
-1	0,02228484	0,213335212	0,123327546	0,237749213	0,078174368
-1	0,970621979	0,511639122	0,606562077	0,311110614	0,689269909
-0,27309104	0,981188409	1,000857535	1,309079503	1,5507302	1,465989476
-1	2,840880179	1,538889315	1,185225275	1,65795071	2,031395631
-1	0,574380834	0,560452489	0,650215616	0,561291805	0,777793095
-0,675668601	1,139684867	0,64072336	0,720264319	0,572578175	0,892016561

-1	-0,178477339	0,079912009	0,120281951	0,008259699	0,123863754
-0,228886868	1,945375193	1,1646535	1,014671911	1,069178434	1,683014061
-1	0,064550562	0,462825755	0,547680558	0,290418937	0,395144485
-0,253709663	0,79099266	0,783909237	0,578136516	0,538719066	0,709259016
-1	-0,276216822	-2,423671354	0,205558632	-0,010550917	-0,298763069
-1	0,36833544	0,443300408	0,530422182	0,094788532	0,400855659
-1	0,36833544	0,212250471	0,372051202	0,143696133	0,226664874
-1	0,761934976	0,514893347	0,615698864	0,350612908	0,717825776
-1	0,283803995	0,427029286	0,48169265	0,243392397	0,149564034
-1	-0,659249928	0,18296245	0,281698527	-0,371714741	0,118152581
-1	-0,241875922	0,190555641	0,327382464	-0,001145609	-0,116005524
-1	0,149082006	0,290351858	0,572045325	0,388234139	0,452256218
-1	0,347202579	0,420520837	0,494890231	0,164387811	0,466534151
-1	1,055153423	0,579977836	0,862392122	0,811472996	0,186686661
-1	-0,123003579	-2,423671354	0,184239462	0,29418106	0,443689458

Tabla 17, continuación. Vectores de SVM

coef.	PDGFD_2	ST6GALNAC5	ZNF492_1	CNRIP1_1	LONRF2_1
	PDGFD '921	ST6GALNAC5 '456	ZNF492 '069	CNRIP1 '272	LONRF2 '281
1	1,302789852	0,466406944	-0,240707793	-0,064165795	0,182108844
1	-0,682617737	0,569041467	-0,17761095	-0,307307386	-0,063816882
0,160992568	-0,682617737	0,705281983	-0,150569446	0,093547669	-0,189987472
1	-0,682617737	0,569041467	0,176933218	0,189928119	0,325387311
1	1,475318586	0,828806718	-0,132541776	0,498783653	0,197078236
1	-0,682617737	-1,277471664	0,08679487	0,38268902	0,201355206
0,539110203	-0,682617737	-1,277471664	-0,210661677	0,019071866	0,100846431
1	-0,682617737	0,367405503	0,056748754	-0,149593922	0,090154008
0,228841426	-0,682617737	0,246605578	0,194960887	0,161452077	-0,098032635
1	1,096640133	0,76522781	0,480398989	0,178975795	0,534958799
1	-0,682617737	0,792475913	0,065762589	0,119833246	0,338218218
0,086502196	1,281555546	-1,277471664	-0,327841529	-0,079499049	-0,207095348
1	-0,682617737	0,638978265	0,149891714	0,369546231	0,333941249
0,022981588	-0,682617737	-1,277471664	-0,360892257	-3,744146627	-0,585607118
0,199753156	-0,682617737	-1,277471664	-0,162587892	-0,042261148	-5,029378066
0,640672506	-0,682617737	0,586298599	0,23702545	-0,07073719	-0,22634171
0,488436741	1,209005001	-1,277471664	0,017688804	-0,348926217	-0,160048688
0,290813367	-0,682617737	0,638069995	0,110831763	-0,007213711	0,165000968
0,93438076	1,368262294	0,469131755	-0,57421968	-0,379592724	-0,014631737
1	-0,682617737	-1,277471664	0,423311368	0,316975076	0,498604562
0,177133374	-0,682617737	0,554509145	0,243034673	0,222785091	0,154308545
0,363673626	-0,682617737	0,566316656	-0,369906092	-0,186831823	-0,068093851
0,372869951	-0,682617737	-1,277471664	-0,231693959	-0,06635626	-0,435913198
0,180416799	-0,682617737	-1,277471664	-1,154109717	-2,41672497	-0,136525357
1	-0,682617737	1,508192759	1,468916202	2,071537366	0,917747538
0,236974727	-0,682617737	-1,277471664	-0,330846141	-4,848140877	-5,029378066
0,433173404	-0,682617737	0,542701634	0,056748754	-0,243783907	0,263371258
0,037394649	-0,682617737	-1,277471664	0,149891714	-0,362069006	-0,068093851
1	-0,682617737	0,620812863	0,336177632	0,045357444	-0,311881093
0,263636311	-0,682617737	-1,277471664	-7,154319065	-0,734448018	-5,029378066
1	1,438158551	-1,277471664	1,072307472	0,660878047	0,791576948
1	1,220506917	0,624445943	0,131864044	-0,048832542	-0,016770221
1	-0,682617737	0,609913622	-0,204652454	-0,160546246	-0,269111401
0,26169536	-0,682617737	-1,277471664	-7,154319065	0,207451837	-5,029378066

5 Tabla 17, continuación. Vectores de SVM

coef.	PDGFD_2	ST6GALNAC5	ZNF492_1	CNRIP1_1	LONRF2_1
	PDGFD '921	ST6GALNAC5 '456	ZNF492 '069	CNRIP1 '272	LONRF2 '281
0,1799778	-0,682617737	-1,277471664	0,534481997	0,062881162	0,607667275
0,898868481	-0,682617737	0,698015822	-0,021371147	0,268784851	-0,040293551

ES 2 984 254 T3

0,042908076	-0,682617737	-1,277471664	-0,339859976	-0,567972695	-0,326850485
0,140898434	-0,682617737	-1,277471664	-0,571215068	-0,537306188	-0,442328652
0,140415448	-0,682617737	-1,277471664	-0,144560222	-3,146149742	0,111538853
1	-0,682617737	-1,277471664	-0,021371147	0,178975795	0,505020015
0,108835219	-0,682617737	-1,277471664	-0,318827695	-4,848140877	-0,463713497
1	-0,682617737	-1,277471664	0,429320592	0,560116667	0,757361195
-1	1,29571175	-1,277471664	0,092804093	-0,136451133	0,107261884
-1	-0,682617737	0,76613608	0,393265253	-0,094832302	0,220601567
-1	-0,682617737	-1,277471664	0,324159186	0,260022992	0,415203663
-1	1,442582365	0,811549586	-0,108504883	0,424307851	0,248401866
-1	-0,682617737	0,770677431	0,579551171	0,380498555	0,637606059
-1	1,147071609	-1,277471664	-0,084467991	-0,241593443	0,094430977
-1	-0,682617737	0,633528644	0,342186855	0,216213697	0,081600069
-1	-0,682617737	0,821540557	0,792878594	0,619259216	0,872839362
-0,27309104	2,042451502	1,427356719	1,264602614	1,732015325	1,51224625
-1	-0,682617737	1,5981115	2,0127509	2,529344505	2,128129808
-1	1,308983191	0,435525761	0,480398989	0,316975076	0,733837865
-0,675668601	-0,682617737	0,837889419	0,726777139	0,551354808	0,63332909
-1	-0,682617737	-1,277471664	0,083790259	-0,06635626	-0,040293551
-0,228886868	1,923893295	1,317456036	1,381782466	1,839348099	1,349721423
-1	-0,682617737	0,856963091	0,315145351	0,343260654	0,259094289
-0,253709663	1,235547883	1,01500209	0,964141455	1,026685666	0,729560896
-1	1,354106091	-1,277471664	-0,048412651	-0,099213232	-0,076647789
-1	-0,682617737	0,617179782	0,393265253	0,303832288	0,505020015
-1	1,269168867	0,629895564	0,342186855	0,481259935	0,421619117
-1	1,248819324	0,831531528	0,315145351	0,308213217	0,673960297
-1	1,336410836	0,788842833	-0,168597115	0,371736696	0,188524298
-1	1,133800168	0,567224926	-0,126532553	-0,134260668	-0,001800829
-1	-0,682617737	-1,277471664	-0,105500272	-0,090451373	0,216324598
-1	-0,682617737	0,717997765	0,390260641	0,411165062	0,513573954
-1	-0,682617737	0,735254897	0,231016227	0,384879485	0,541374253
-1	-0,682617737	1,01681863	0,231016227	1,147161228	0,703899081
-1	1,284209834	-1,277471664	0,158905548	-0,103594161	-0,574914695

Tabla 17, continuación. Vectores de SVM

coef.	LONRF2 2	ADAMTS2 2	ADAMTS2 1	ADAMTS2 3	ALK
	LONRF2 '387	ADAMTS2 '254	ADAMTS2 '284	ADAMTS2 '328	ALK '434
1	0,816278101	-1,226540092	0,479237716	0,308464228	1,224961864
1	0,707526931	0,608032885	0,377972809	0,108720604	-0,67135809
0,160992568	-1,17952336	-1,226540092	-1,402761026	-3,569757964	-0,67135809
1	0,644016248	0,715511247	0,413319994	0,342021157	-0,67135809
1	1,028560383	0,889956898	0,805960341	0,757487893	-0,67135809
1	0,704916903	0,774210969	0,512674242	0,359598595	-0,67135809
0,539110203	-1,17952336	0,74444773	0,34931293	-0,159734825	-0,67135809
1	-1,17952336	-1,226540092	-1,344485938	-0,001537876	1,290071562
0,228841426	-1,17952336	0,651850986	0,265243951	0,155061125	-0,67135809
1	0,849338456	0,647717203	0,611073161	0,319649871	1,311232214
1	0,788437801	0,675826929	0,455354484	0,27330935	-0,67135809
0,086502196	0,548315219	-1,226540092	0,357910894	0,155061125	1,30146576
1	0,564845397	0,690708548	-1,172526662	0,340423208	1,271352524
0,022981588	-1,17952336	-1,226540092	-1,818329276	-0,437777949	-0,67135809
0,199753156	0,650976323	0,717164761	0,579547294	0,310062177	-0,67135809
0,640672506	-1,17952336	0,763463132	0,44580119	0,290886789	-0,67135809
0,488436741	-1,17952336	0,617127208	0,287216525	-0,153343029	-0,67135809
0,290813367	0,570935463	0,735353407	0,491656997	0,316453973	-0,67135809
0,93438076	-1,17952336	0,666732606	0,444845861	0,169442666	-0,67135809
1	-0,840219712	0,793226371	0,47350574	0,389959626	-0,67135809
0,177133374	-1,17952336	-1,226540092	0,355044906	0,129493941	-0,67135809
0,363673626	0,538745116	-1,226540092	0,304412453	-0,142157387	-0,67135809
0,372869951	-1,17952336	-1,226540092	0,354089577	0,111916502	-0,67135809

0,180416799	0,499594695	-1,226540092	-1,818329276	-3,569757964	-0,67135809
1	0,880658793	1,437269791	1,395398525	1,705071643	1,21519541
0,236974727	-1,17952336	-1,226540092	-1,818329276	-3,569757964	-0,67135809
0,433173404	-1,17952336	-1,226540092	0,347402271	0,057586237	-0,67135809
0,037394649	-1,17952336	-1,226540092	-1,818329276	-3,569757964	-0,67135809
1	-1,17952336	0,671693146	0,532736158	-0,081435325	-0,67135809
0,263636311	-1,17952336	-1,226540092	-1,818329276	-3,569757964	-0,67135809
1	0,846728428	0,660118553	0,491656997	0,417124759	1,282746721
1	0,650106314	-1,226540092	0,401856042	-0,322725622	-0,67135809
1	0,640536211	-1,226540092	0,567128013	0,254133962	-0,67135809
0,26169536	0,519604911	-1,226540092	0,536557475	0,284494993	-0,67135809

Tabla 17, continuación. Vectores de SVM

coef.	LONRF2_2	ADAMTS2_2	ADAMTS2_1	ADAMTS2_3	ALK
	LONRF2 '387	ADAMTS2 '254	ADAMTS2 '284	ADAMTS2 '328	ALK '434
0,1799778	0,525694976	0,613820181	0,533691487	0,266917554	-0,67135809
0,898868481	-1,17952336	0,719645031	0,407588018	-0,172518417	1,353553518
0,042908076	0,605735837	0,541065597	0,508852925	0,28928884	-0,67135809
0,140898434	-1,17952336	-1,226540092	-1,818329276	-3,569757964	-0,67135809
0,140415448	-1,17952336	-1,226540092	-1,818329276	-0,332313316	-0,67135809
1	0,771037614	-1,226540092	0,249958682	-0,099012764	-0,67135809
0,108835219	0,456094228	0,611339911	-1,818329276	-0,242828173	-0,67135809
1	0,865868634	-1,226540092	0,373196163	0,410732963	-0,67135809
-1	-1,17952336	0,717991517	0,575725977	0,27330935	1,293327047
-1	-0,466985698	0,596458292	0,295814489	0,17903036	-0,67135809
-1	0,741457296	0,675000172	0,399945384	0,287690891	-0,67135809
-1	0,838898344	0,763463132	0,587189928	0,35160885	-0,67135809
-1	0,764077539	0,795706641	0,609162503	0,4315063	-0,67135809
-1	0,920679223	-1,226540092	0,530825499	0,139081635	1,257516713
-1	-1,17952336	0,608859641	0,236584071	0,044802645	-0,67135809
-1	0,706656922	0,8155488	0,656928968	0,760683791	1,349484162
-0,27309104	1,371344069	1,329791428	1,262607751	1,433420315	1,942796285
-1	1,875079486	1,591046526	1,560670496	2,013475797	2,200793463
-1	0,539615126	0,697322601	0,524138194	0,247742166	-0,67135809
-0,675668601	0,845858419	0,760982862	0,572859989	0,501816055	1,410524504
-1	-1,17952336	0,765943402	0,286261196	-0,031898906	1,241239289
-0,22886868	1,433114734	1,358727911	1,26451841	1,481358784	1,862223034
-1	0,513514845	0,884996358	0,706606092	0,567331964	1,322626411
-0,253709663	1,074670879	0,993301477	0,790675072	0,69996173	1,619689409
-1	-1,17952336	0,583230186	0,338804308	0,166246768	-0,67135809
-1	0,977229831	0,713030978	0,603430527	0,370784238	-0,67135809
-1	0,684036679	0,742794216	0,471595082	0,263721656	-0,67135809
-1	0,950259541	0,777517995	0,650241663	0,568929913	1,333206737
-1	0,843248391	0,738660433	0,582413282	0,319649871	-0,67135809
-1	-1,17952336	-1,226540092	0,244226706	-0,234838428	-0,67135809
-1	0,717097034	-1,226540092	0,458220472	0,107122655	-0,67135809
-1	0,689256735	-1,226540092	0,342625625	0,242948319	-0,67135809
-1	0,864128615	0,785785562	0,597698551	0,452279637	-0,67135809
-1	1,023340327	-1,226540092	0,275752573	0,006451869	1,64085006
-1	-1,17952336	0,702283141	0,516495559	0,334031412	-0,67135809

5 Tabla 17, continuación. Vectores de SVM

coef.	FGF14	DMRT1	CNRIP1_2
	FGF14 '577	DMRT1 '934	CNRIP1 '232
1	0,955300844	1,131612847	0,296394201
1	-0,93950462	-0,701307401	0,101966839
0,160992568	0,846924723	-0,701307401	-2,336804129
1	-0,93950462	-0,701307401	0,230086604
1	1,296419127	1,516680127	0,443619546

1	0,974844079	-0,701307401	0,407656103
0,539110203	-0,93950462	1,17300758	0,203114022
1	-0,93950462	-0,701307401	0,261554616
0,228841426	-0,93950462	1,199962289	0,268297762
1	-0,93950462	-0,701307401	0,368321087
1	0,734106957	-0,701307401	0,228962746
0,086502196	0,761645152	-0,701307401	0,236829749
1	-0,93950462	-0,701307401	0,536899725
0,022981588	-0,93950462	-0,701307401	-2,336804129
0,199753156	0,771416769	-0,701307401	0,216600313
0,640672506	0,814944884	-0,701307401	0,384055093
0,488436741	-0,93950462	-0,701307401	0,073870399
0,290813367	-0,93950462	-0,701307401	0,268297762
0,93438076	-0,93950462	-0,701307401	0,027792238
1	0,960630817	-0,701307401	0,3997891
0,177133374	-0,93950462	-0,701307401	0,092975978
0,363673626	0,769640112	-0,701307401	0,317747496
0,372869951	-0,93950462	-0,701307401	0,225591173
0,180416799	-0,93950462	1,108508811	-2,336804129
1	1,728146955	1,533045486	1,467453809
0,236974727	-0,93950462	-0,701307401	-2,336804129
0,433173404	-0,93950462	-0,701307401	0,284031768
0,037394649	-0,93950462	-0,701307401	-2,336804129
1	0,834488119	-0,701307401	0,25031604
0,263636311	-0,93950462	-0,701307401	-2,336804129
1	0,798066635	-0,701307401	0,540271298
1	-0,93950462	-0,701307401	-0,045258506
1	0,853143025	1,17300758	-2,336804129
0,26169536	-0,93950462	-0,701307401	0,450362691

Tabla 17, continuación. Vectores de SVM

coef.	FGF14	DMRT1	CNRIP1_2
	FGF14 '577	DMRT1 '934	CNRIP1 '232
0,1799778	-0,93950462	1,108508811	0,412151533
0,898868481	-0,93950462	-0,701307401	0,412151533
0,042908076	-0,93950462	-0,701307401	0,205361737
0,140898434	-0,93950462	-0,701307401	-2,336804129
0,140415448	0,748320219	-0,701307401	-2,336804129
1	0,726111997	-0,701307401	0,384055093
0,108835219	-0,93950462	-0,701307401	-2,336804129
1	-0,93950462	1,12487417	0,598711893
-1	0,830046474	-0,701307401	0,314375923
-1	-0,93950462	-0,701307401	0,078365829
-1	-0,93950462	-0,701307401	0,552633732
-1	0,867356287	1,072890087	0,532404295
-1	1,115200039	-0,701307401	0,452610406
-1	0,632837467	1,202850294	0,307632777
-1	0,974844079	-0,701307401	0,05476482
-1	0,946417555	-0,701307401	0,585225602
-0,27309104	1,777893371	2,092355709	1,213461994
-1	1,891599465	2,29451603	1,66750046
-1	0,822939843	-0,701307401	-2,336804129
-0,675668601	0,790071676	-0,701307401	0,593092605
-1	-0,93950462	-0,701307401	0,252563755
-0,228886868	1,602004256	1,983574202	1,266283301
-1	1,124971657	1,209588971	0,542519013
-0,253709663	1,057458663	-0,701307401	0,829102699
-1	1,010377234	-0,701307401	0,017677519
-1	0,846924723	1,254834377	0,354834796
-1	1,049463703	1,121023497	0,557129162

-1	-0,93950462	-0,701307401	0,488573849
-1	0,948194213	0,985287281	0,479582988
-1	-0,93950462	-0,701307401	-2,336804129
-1	-0,93950462	-0,701307401	0,325614499
-1	0,225094519	-0,701307401	0,389674381
-1	0,870909602	1,213439644	0,285155626
-1	-0,93950462	1,568664209	0,829102699
-1	-0,93950462	-0,701307401	0,224467316

Ejemplo 5. Diversos biomarcadores de metilación individuales son, cada uno de ellos, altamente informativos

La evaluación del rendimiento de DMR de cáncer colorrectal individuales del panel de 28 DMR de cáncer colorrectal reveló que diversas DMR de cáncer colorrectal individuales son suficientes para el cribado de cáncer colorrectal (véanse las figuras 12-19). Para DMR de cáncer colorrectal seleccionadas, las figuras 12-19 muestran el estado de metilación de la DMR indicada en muestras de cáncer colorrectal y muestras de control. Los resultados se presentan como el valor de Ct de MSRE-qPCR restado de 45 (es decir, 45 - valor de Ct) con fines de presentación. Los datos proporcionados en este ejemplo, así como datos proporcionados por los presentes ejemplos de manera acumulativa (incluyendo, por ejemplo, las figuras 5-9), demuestran que, para cada DMR de cáncer colorrectal individual, la señal de estado de metilación es lo suficientemente estable a lo largo de los grupos de sujetos como para permitir el cribado clínico. Por tanto, los resultados presentados en las figuras 12-19 confirman que los marcadores de metilación de cáncer colorrectal proporcionados en el presente documento pueden proporcionar una señal robusta para el cribado de cáncer colorrectal. Además, los expertos en la técnica apreciarán que la presente divulgación proporciona biomarcadores de metilación que son independientemente útiles de manera individual en el cribado de cáncer colorrectal, y específicamente que los biomarcadores de metilación proporcionados en el presente documento son útiles tanto de manera individual como en combinación.

Ejemplo 6. Validación de marcadores

Se usaron muestras de plasma sanguíneo para determinar un panel de DMR viable mínimo para la detección de cáncer colorrectal. Se encontró que el estado de metilación de DMR era útil para distinguir cáncer colorrectal no solo de sujetos sanos, sino también de sujetos que padecen otros tipos de cánceres (por ejemplo, cáncer de mama, cáncer de pulmón).

Se analizaron muestras de plasma sanguíneo de 215 sujetos usando MSRE-qPCR y se usaron como conjunto de entrenamiento para determinar un panel de DMR viable mínimo para la detección de cáncer colorrectal. La figura 21 presenta una vista detallada de la cohorte de sujetos usada para entrenar un algoritmo para detectar cáncer colorrectal. El conjunto de entrenamiento incluyó 93 sujetos humanos a los que se les había diagnosticado cáncer colorrectal (CRC), 91 sujetos a los que se les había diagnosticado que estaban sanos, y 31 sujetos a los que se les había diagnosticado que tenían adenoma no avanzado (NAA). La columna de NAA+sanos es la suma de las columnas de sanos y NAA. Con el fin de calcular las especificidades, se consideró que todos los pacientes que no tenían un diagnóstico de cáncer colorrectal eran controles. La figura 21 también indica la distribución de cáncer colorrectal. El cáncer colorrectal se clasifica como localizado o avanzado tal como se determina mediante histología. La localización del cáncer colorrectal tal como se determina mediante colonoscopia se encuentra que está o bien en la parte proximal o bien en la parte distal del colon.

Las DMR seleccionadas que mostraron potencial en la detección de cáncer colorrectal se validaron adicionalmente usando un conjunto de sujetos de validación independiente (véase la figura 22). Se recogieron muestras de plasma de 774 sujetos humanos en España, Ucrania, R. U. y EE. UU. De esos 774 sujetos, a 152 sujetos se les diagnosticó que tenían cáncer colorrectal (CRC). El grupo de control incluyó 622 sujetos. 148 sujetos de los sujetos del grupo de control tenían adenoma no avanzado, y 52 de los sujetos del grupo de control tenían cáncer distinto de CRC (es decir, cáncer de mama o cáncer de pulmón). La figura 22 expone el número de hombres y mujeres en cada grupo, intervalo de edad y número total de sujetos. Para aquellos que padecen cáncer (es decir, cáncer colorrectal, de mama o de pulmón), el cáncer se clasifica como localizado o avanzado.

Se implementó un algoritmo de selección de características de bosque aleatorio para la clasificación de características. El algoritmo usó una validación cruzada de Monte-Carlo a lo largo de 50 iteraciones de subconjuntos con el conjunto de entrenamiento de la figura 21 para clasificar los marcadores previamente seleccionados según su varianza de importancia (VIP) de aparición en las 50 iteraciones. Los marcadores con VIP > 2 se usaron adicionalmente para la construcción del algoritmo de máquina de vectores de soporte con el conjunto de entrenamiento.

Se encontró que la totalidad de los paneles de 3 DMR (figura 23), 5 DMR (figura 24) y 6 DMR (figura 25) presentaron un buen rendimiento en la evaluación del estado de cáncer colorrectal de sujetos del conjunto de validación (figura 22). Las tablas 18, 19 y 20 (mostradas a continuación) identifican los marcadores incluidos en cada uno de los paneles de 3, 5 y 6 marcadores, respectivamente.

Tabla 18. Panel de 3 DMR.

DMR	SEQ ID NO
ZNF132 '415	SEQ ID NO: 40
ADAMTS2 '254	SEQ ID NO: 21
ADAMTS2 '284	SEQ ID NO: 22

5 Tabla 19. Panel de 5 DMR.

DMR	SEQ ID
ZNF132 '415	SEQ ID NO: 40
ADAMTS2 '254	SEQ ID NO: 21
ADAMTS2 '284	SEQ ID NO: 22
ZNF542 '502	SEQ ID NO: 35
LONRF2 '281	SEQ ID NO: 19

Tabla 20. Panel de 6 DMR.

DMR	SEQ ID
ZNF132 '415	SEQ ID NO: 40
ADAMTS2 '254	SEQ ID NO: 21
ADAMTS2 '284	SEQ ID NO: 22
ZNF542 '502	SEQ ID NO: 35
LONRF2 '281	SEQ ID NO: 19
ZNF492 '069	SEQ ID NO: 42

Además, la tabla 21 (a continuación) muestra la precisión, sensibilidad, especificidad y AUC de cada uno de los paneles de 3 DMR (tabla 18), 5 DMR (tabla 19) y 6 DMR (tabla 20) tal como se presentaron anteriormente.

Tabla 21. Análisis de curva ROC de cada modelo

	3 DMR (2 genes)	5 DMR (4 genes)	6 DMR (5 genes)
AUC	0,85	0,87	0,86
Sensibilidad	0,58	0,60	0,69
Especificidad	0,89	0,90	0,87
Precisión	0,83	0,84	0,83

El algoritmo de mejor rendimiento usó los 6 marcadores de la tabla 20 y dio como resultado que se detectó el 69% de los casos de cáncer colorrectal con una especificidad del 87% con un AUC total del 86%. Adicionalmente, tanto el panel de 3 marcadores como el de 5 marcadores presentaron un buen rendimiento en la clasificación de cáncer colorrectal. En el panel de 3 marcadores, se detectó el 58% de los casos de cáncer colorrectal con una especificidad del 89% y un AUC del 84,5%.

Estos hallazgos son especialmente notables ya que se mantuvo una alta especificidad aunque se incluyeron sujetos que tenían diagnósticos de cáncer distintos de cáncer colorrectal en el grupo de control. Este hallazgo indica que los marcadores en cuestión no son generalmente indicativos de cáncer, sino que son importantes de manera específica y sorprendente para detectar cáncer colorrectal.

La presente divulgación incluye combinaciones de DMR en las que cada una de las DMR es, incluye la totalidad de, incluye una porción de, o está presente en un gen identificado en la tabla 22.

La presente divulgación incluye combinaciones de DMR en las que cada una de las DMR es, incluye la totalidad de, incluye una porción de, o está presente en un gen identificado en la tabla 23.

La presente divulgación incluye combinaciones de DMR en las que cada una de las DMR es, incluye la totalidad de, incluye una porción de, o está presente en un gen identificado en la tabla 24. En algunas realizaciones particulares, un biomarcador de metilación de cáncer colorrectal incluye dos DMR, cada una de las cuales es, incluye la totalidad de, incluye una porción de, o está presente en a diferente gen identificado en la tabla 22. Un biomarcador de metilación de cáncer colorrectal incluye cuatro DMR, cada una de las cuales es, incluye la totalidad de, incluye una porción de, o está presente en a diferente gen identificado en la tabla 23. Un biomarcador de metilación de cáncer colorrectal incluye cinco DMR, cada una de las cuales es, incluye la totalidad de, incluye una porción de, o está presente en a diferente gen identificado en la tabla 24.

Un biomarcador de metilación de cáncer colorrectal incluye dos o más DMR que incluyen la totalidad de, incluyen una porción de, o están presentes en el mismo gen de la tabla 22. En diversas realizaciones, un biomarcador de metilación de cáncer colorrectal incluye dos o más DMR que incluyen la totalidad de, incluyen una porción de, o están presentes en el mismo gen de la tabla 24.

Tabla 22. Panel de genes de DMR de la tabla 18.

ZNF132
ADAMTS2

Tabla 23. Panel de genes de DMR de la tabla 19.

ZNF132
ADAMTS2
ZNF542
LONRF2

Tabla 24. Panel de genes de DMR de la tabla 20

ZNF132
ADAMTS2
ZNF542
LONRF2
ZNF492

Ejemplo 7. Diversos biomarcadores de metilación individuales son, cada uno de ellos, altamente informativos

La evaluación del rendimiento de DMR de cáncer colorrectal individuales del panel de DMR de cáncer colorrectal (por ejemplo, tal como se expone en el ejemplo 6) reveló que diversas DMR de cáncer colorrectal individuales son suficientes para el cribado de cáncer colorrectal no solo de individuos sanos sino también de individuos que padecen otros cánceres. Un análisis de una variable a lo largo del estado de metilación de cada uno de los marcadores de metilación tal como se muestran en la tabla 25 a continuación muestra varios marcadores con alta precisión individual tal como se indica mediante valores de p que son de menos de 0,001.

Tabla 25. Valores de p de la prueba de la t entre grupos de CRC y de control en el conjunto de validación

Nombre de gen de referencia	Valor de p de la prueba de la t de Student
ZNF132 '415	4,52E-25
ADAMTS2 '254	8,00E-29
ADAMTS2 '284	1,62E-21
ZNF542 '502	1,76E-37
LONRF2 '281	9,26E-38
ZNF492 '069	1,18E-25

Para las DMR de cáncer colorrectal seleccionadas de la tabla 25, las figuras 26-31 muestran adicionalmente el estado de metilación de la DMR indicada en muestras de cáncer colorrectal y muestras de control (es decir, del grupo de validación de la figura 22). En este caso, las muestras de control comprenden sujetos sanos, sujetos que tienen adenomas no avanzados, sujetos que tienen cáncer de mama y sujetos que tienen cáncer de pulmón (véase, la figura 22). Los resultados se presentan como el valor de Ct de MSRE-qPCR restado de 45 (es decir, 45 - valor de Ct) con fines de presentación. Los datos proporcionados en este ejemplo, así como datos proporcionados por los presentes ejemplos de manera acumulativa (incluyendo, por ejemplo, las figuras 23-25), demuestran que, para cada DMR de cáncer colorrectal individual, la señal de estado de metilación es estable de manera suficiente y sorprendente a lo largo de grupos de sujetos como para permitir un cribado clínico, particularmente para distinguir cáncer colorrectal de otras formas de cáncer. Por tanto, los resultados presentados en las figuras 23-25 confirman adicionalmente que los marcadores de metilación de cáncer colorrectal proporcionados en el presente documento pueden proporcionar una señal robusta para el cribado de cáncer colorrectal. Además, los expertos en la técnica apreciarán que la presente divulgación proporciona que estos biomarcadores de metilación son útiles de manera individual en el cribado de cáncer colorrectal, y específicamente que los biomarcadores de metilación proporcionados en el presente documento son útiles tanto de manera individual como en combinación.

Secuencias

- SEQ ID NO: 1 (ZNF132) (véase la tabla 1)
- 5 ZNF132 chr19, pb de 58439728 a 58440994 de hg38
- SEQ ID NO: 2 (DMRT1) (véase la tabla 1)
- DMRT1 chr9, pb de 841340 a 968090 de hg38
- 10 SEQ ID NO: 3 (ALK) (véase la tabla 1)
- ALK chr2, pb de 29193215 a 29922286 de hg38
- SEQ ID NO: 4 (JAM2) (véase la tabla 1)
- 15 JAM2 chr21, pb de 25637848 a 25714704 de hg38
- SEQ ID NO: 5 (FGF14) (véase la tabla 1)
- 20 FGF14 chr13, pb de 101919879 a 102403137 de hg38
- SEQ ID NO: 6 (MCIDAS) (véase la tabla 1)
- MCIDAS chr5, pb de 55220951 a 55221051 de hg38
- 25 SEQ ID NO: 7 (ST6GALNAC5) (véase la tabla 1)
- ST6GALNAC5 chr1, pb de 76866255 a 77063388 de hg38
- 30 SEQ ID NO: 8 (LONRF2) (véase la tabla 1)
- LONRF2 chr2, pb de 100285667 a 100323015 de hg38
- SEQ ID NO: 9 (PDGFD) (véase la tabla 1)
- 35 PDGFD chr11, pb de 104163499 a 104164026 de hg38
- SEQ ID NO: 10 (GSG1L) (véase la tabla 1)
- 40 GSG1L chr16, pb de 27920615 a 28064275 de hg38
- SEQ ID NO: 11 (ZNF492) (véase la tabla 1)
- ZNF492 chr19, pb de 22633051 a 22666433 de hg38
- 45 SEQ ID NO: 12 (ZNF568) (véase la tabla 1)
- ZNF568 chr19, pb de 36916312 a 36943940 de hg38
- 50 SEQ ID NO: 13 (ADAMTS2) (véase la tabla 1)
- ADAMTS2 chr5, pb de 179118114 a 179344392 de hg38
- SEQ ID NO: 14 (ZNF542) (véase la tabla 1)
- 55 ZNF542 chr19, pb de 56367838 a 56370986 de hg38
- SEQ ID NO: 15 (ZNF471) (véase la tabla 1)
- 60 ZNF471 chr19, pb de 56507245 a 56508589 de hg38
- SEQ ID NO: 16 (CNRIP1) (véase la tabla 1)
- CNRIP1 chr2, pb de 68293114 a 68320928 de hg38

SEQ ID NO: 17 (véase la tabla 7)

CCTCCTCACCCATCATCAGCGCCCGCGGCTTTGGGTGGCCGACCAGAGGGCGGCCGGAA
AGCACCTCGGTGCCCCGCGACCCTCCGAACAGAGGCGGGGAGGTACC

5

SEQ ID NO: 18 (véase la tabla 7)

GCGTGCTGGGTTTAATCTTCACCTCAACCTTGTAGGAGGAGCCGGTGAGCAGCTTGATGG
TGCGGTTCTGGCCGAAGCGCTGCCCCTCCACCTTGTAAGACCGGGCCGT

10

SEQ ID NO: 19 (véase la tabla 7)

AGGAAGCAAAGTGACCCCTAAGCCTAGACAAAGCTCTCGAAAGCCCAAAGCCTCGGGCCC
ACCGGCCAGCTCCCCACCCGCTGCTGGGCCGGACAGGTGTAGGGGAGGCGGACC

SEQ ID NO: 20 (véase la tabla 7)

15

CTCTCAGTCCCGCCGGCTTAGGTAACCCAGGTCGCTGCGGTAAACGCAGTGACCGCGCTC
CAGGTCCGCGTCTCTTGC

SEQ ID NO: 21 (véase la tabla 7)

CCACTGCGAAGGGAAGGGGCATTCCGCCAGGCGACCCCAGAAGCCAGCCTGCACCTCCC
CGGCTTTCCTGCAACCGGGAAGGGGCGTTAACAGGG

20

SEQ ID NO: 22 (véase la tabla 7)

GCGACCCCAGAAGCCAGCCTGCACCTCCCCGGCTTTCCTGCAACCGGGAAGGGGCGTTA
ACAGGGCCACCACTCCGGGGCTCCGCCACTCCCCAGCCGTT

25

SEQ ID NO: 23 (véase la tabla 7)

CAACGGAACTTCCCGCGCTACGGCGGCTCCAACGGGCCGCTTCCGCCGCATTGCGTAG
CGAAGCCCCCGGCGAG

30

SEQ ID NO: 24 (véase la tabla 7)

CAAAGCGTCTGGGGCGCTAGTGGGGGCGGCCAGCGGCTCGAGCGCCGGGGGCGAGCAGC
AGAGGAGGCGGCTCCGGCTCCGGGGCGTCGGACCTGGGTGCCGGGAGCAAGAAGT

SEQ ID NO: 25 (véase la tabla 7)

35

CGCTCAGCCGCTCTCCTCTTCTCTCTCCCGCCCCGCCGCGAGCGCCATGGTCTGGCAGTGT
GTTTAGCGCT

SEQ ID NO: 26 (véase la tabla 7)

GGGTTTCGGAGCGTGCAAAAGGTGACCTAGGCGCGCTACGCACCACGCACTCAGCGGTAC
TCTCCTCTCCCGGGCCCCCACGGGTCCCGATGCTGGGCGGGGATGCACTGAACTGTTT

40

SEQ ID NO: 27 (véase la tabla 7)

GCGCCCCACTTACATCCAGCACCGAGGCCAGGTGCCGGGTTCCGGCTGGCGAGTTCCTTC
AGCTGCACGTTCCGCTCCTTGAGCGAGGCGATCTCCTCCTGTTTCTGGGTCAATGTCACGT

45

SEQ ID NO: 28 (véase la tabla 7)

AACGTCTATCACCCAGGGAAAGCTACTCTTGACTCCTTCCACCTATCAAAATTGCCTAAGAA
AGGTTGAGTCTGACCAAGGGGCGGCGCAGCTTGCAACTTTCGCCAACTCCGGGA

SEQ ID NO: 29 (véase la tabla 7)

GGTGCATTTGGGATCAGCGACTAGAGACAGCGTCGCTCCAAGAAAAAGCCGGGTTCTGCT
CCCGGGACCGACGCCGCGCCGCCCTGCGCTCTCGCCGCTGCGCTCGCCCTGCGCTGG
5 CCCGGGTCGCTGTGCTAATC

SEQ ID NO: 30 (véase la tabla 7)

CCGAAAGAAATCCGAGCCAGGGTGAGGGTCTGAGACGCAAGGAGAATCCAGGCAAGGC
10 GCTCCTGAGAAAAGATCCCCACGGCGGACGTGGGGCAACAAAACC

SEQ ID NO: 31 (véase la tabla 7)

CGAGAGAGGGGAAGGGGCTGGTTGGAACCGGTGGCAAGAGGCTGTGGCGGGACTCAGG
15 CCTCCCCGCGAGTCGGCTCCACAATCTGCGCCCCAAGTTCG

SEQ ID NO: 32 (véase la tabla 7)

GCCCAAGCCTCACCTCACACAGGAAAGCAGATGTGTTCTGGCCGGAAGTTGAGTGGGGC
CGCGGGGCTGCTGGGAGGTGTTGTCTCGAAACGTCGCTGGCGCGGAGGGATGGTTC
20 G

SEQ ID NO: 33 (véase la tabla 7)

GGTCGCCTTCACCCAGCATCTCAGAACTGCGCGCGGGATGAACATTGGGTGTTTCCGG
CAGGTGACGCTG

SEQ ID NO: 34 (véase la tabla 7)

CCAGAGGCCAGGGATCCGTTGAGGTCAGCGCTGGCGTCCGGGCCTGAGTTTGGAGGTG
25 GCGGGTGCCTTACAAGAATGCTCGCGT

SEQ ID NO: 35 (véase la tabla 7)

GGGAGGAGTGGGCGGCTGAATGGCCAGAGGCCAGGGATCCGTTGAGGTCAGCGCTGG
30 CGTCCGGGCCTGAGTTTGGAGGTGGCGGGTGC

SEQ ID NO: 36 (véase la tabla 7)

CCCCACGCGTACTCACACCGAAGGCTCAGCCGTCGCGCGTTTCCCTCCCAGGCCCCAGG
AACTAGTAACTAGGGACGCTTCTGGTCTCTAGGCGAGGAGAGGGGGAGAGCGCAATCTTT
GCGCCTGCGCACACTCCTGCTCTTACCCGC

35 SEQ ID NO: 37 (véase la tabla 7)

GTGCGCGGTTTCCCTCCCAGGCCCCAGGAACTAGTAACTAGGGACGCTTCTGGTCTCTAG
GCGAGGAGAGGGGGAGAGCGCAATCTTTCGCGCTGCGCACACTCCTGCTCTTACCCGC

SEQ ID NO: 38 (véase la tabla 7)

40 CTGCTCTTACCCGCCGGAACCCTGGGCCACGCCCGGCTCGCGTAATCACGCACTGCGCA
GGCACCGCCCGCTCTGCTCTAAGGTCCCTC

SEQ ID NO: 39 (véase la tabla 7)

CTACTGCTAGGTCGTTGCCAAGGTGATTGAGGAATGGCGTTTATTGCGTCGCTGCTCAGG
CAACGCAAACCTACATTATCCAGAAGGACCCTCGCGGTGCCTCAGGGCTGGCCATTGGCAG
CCGAGGAGACAGGCACTTCCGGGCGGAGTGTAAGACGCTGGCCAATCA

SEQ ID NO: 40 (véase la tabla 7)

5

GTGTAAGACGCTGGCCAATCACAGCCTGGCAGCGGGACTTCCGTCGTCGTCCTCGGACCA
TCACTTTGGCATTCTCGATTTGTCTGCTTCTGAAGGGACCGCGTTGT

SEQ ID NO: 41 (véase la tabla 7)

10

CCGCGTGGTCTGGGCTCTGTAGCGTCCCAGCTGAGCCGGCGATATGCAGCGCACTTGTG
GGGCGGAGGTGGAGGGAATTC

SEQ ID NO: 42 (véase la tabla 7)

15

CAACGTAAAGGCAAACACCTTCTGCGGTGTGCTTGGCTCAGCTCAGGCAGGAAGCCCTG
CCTGAAAAGGCTGCACCTTCGGCTGTCACTCTGTCCTCATTCGGCC

SEQ ID NO: 43 (véase la tabla 7)

GCCGGTGAGCAGCTTGATGGTGCGGTTCTGGCCGAAGCGCTGCCCGTCCACCTTGTA
GACCGGGCCGT

20

SEQ ID NO: 44 (véase la tabla 7)

CGGGAAGGGGCGTTAACAGGGCCACCACTCCGGGGCTCCGCCACTCCCCAGCCGTTCCC
TCCTCCGGAGACCTTGCCCTGCCAAGA

SEQ ID NO: 45 (véase la tabla 13)

25

CCTCCTCACCCATCATCAGCGCCC

SEQ ID NO: 46 (véase la tabla 13)

30

GGTACCTCCCGCCGCTCTGTTC

SEQ ID NO: 47 (véase la tabla 13)

35

GCGTGCTGGGTTTAATCTTCACCTCAA

SEQ ID NO: 48 (véase la tabla 13)

ACGGCCCGGTCTTTTACAAGGTGG

40

SEQ ID NO: 49 (véase la tabla 13)

AGGAAGCAAAGTGACCCCTAAGCCT

SEQ ID NO: 50 (véase la tabla 13)

45

GGTCCGCCTCCCCTACACCT

SEQ ID NO: 51 (véase la tabla 13)

50

CTCTCAGTCCCGCCGGCTTAGGTA

SEQ ID NO: 52 (véase la tabla 13)

GCAAGAGACGCGGACCTGGAGC

SEQ ID NO: 53 (véase la tabla 13)
 5 CCACTGCGAAGGGAAGGGGCA
 SEQ ID NO: 54 (véase la tabla 13)
 CCCTGTTAACGCCCCTTCCCGGTT
 10 SEQ ID NO: 55 (véase la tabla 13)
 GCGACCCCAGAAGCCAGCCT
 SEQ ID NO: 56 (véase la tabla 13)
 15 AACGGCTGGGGAGTGGCGGA
 SEQ ID NO: 57 (véase la tabla 13)
 20 CAACGGAAACTTCCCGCGCTAC
 SEQ ID NO: 58 (véase la tabla 13)
 CTCGCCGGGGGCTTCGCTAC
 25 SEQ ID NO: 59 (véase la tabla 13)
 CAAAGCGTCTGGGGCGCTAGT
 30 SEQ ID NO: 60 (véase la tabla 13)
 ACTTCTTG CTCCCG GCACCCAG GTC
 SEQ ID NO: 61 (véase la tabla 13)
 35 CGCTCAGCCGCTCTCCTCTTCTCT
 SEQ ID NO: 62 (véase la tabla 13)
 40 AG CG CTAAACACACTG CCAGACCA
 SEQ ID NO: 63 (véase la tabla 13)
 GGGTTCGGAGCGTGCAAAAGGTGA
 45 SEQ ID NO: 64 (véase la tabla 13)
 GAACAGTTCAGTGCATCCCCGCCC
 50 SEQ ID NO: 65 (véase la tabla 13)
 GCGCCCCACTTACATCCAGCACC
 SEQ ID NO: 66 (véase la tabla 13)
 55 ACGTGACATTGACCCAGAAACAGGAGGA
 SEQ ID NO: 67 (véase la tabla 13)
 60 AACGTCTATCACCCAGGGAAAGCT
 SEQ ID NO: 68 (véase la tabla 13)
 TCCCGGAGTTGGCGAAAGTTGCAA

SEQ ID NO: 69 (véase la tabla 13)

GGTGCATTTGGGATCAGCGACTAGAGAC

5

SEQ ID NO: 70 (véase la tabla 13)

GATTAGCACAGCGACCCGGGCCAG

10

SEQ ID NO: 71 (véase la tabla 13)

CCGAAAGAAATCCGAGCCAGGGTGA

SEQ ID NO: 72 (véase la tabla 13)

15

GGTTTTGTTGCCCCACGTCC

SEQ ID NO: 73 (véase la tabla 13)

20

CGAGAGAGGGGAAGGGGCTGGTTG

SEQ ID NO: 74 (véase la tabla 13)

CGAACTTGGGGCGCAGATTGTGG

25

SEQ ID NO: 75 (véase la tabla 13)

GCCCAAGCCTCACCTCACACAG

30

SEQ ID NO: 76 (véase la tabla 13)

CGAACCATCCCTCCGCGCCA

SEQ ID NO: 77 (véase la tabla 13)

35

GGTCGCCTTACCCAGCATCTCAG

SEQ ID NO: 78 (véase la tabla 13)

40

CAGCGTCACCTGCCGAAACACC

SEQ ID NO: 79 (véase la tabla 13)

CCAGAGGCCAGGGATCCGTTTCAG

45

SEQ ID NO: 80 (véase la tabla 13)

ACGCGAGCATTCTTGTAAAGGCACCC

50

SEQ ID NO: 81 (véase la tabla 13)

GGGAGGAGTGGGCGGCTGAATGG

SEQ ID NO: 82 (véase la tabla 13)

55

GCACCCGCCACCTCCAACTCAG

SEQ ID NO: 83 (véase la tabla 13)

60

CCCCACGCGTACTCACACCGAAG

SEQ ID NO: 84 (véase la tabla 13)

GCGGGTAAGAGCAGGAGTGTG

SEQ ID NO: 85 (véase la tabla 13)
 5 GTCGCGCGTTTCCCTCCCAG
 SEQ ID NO: 86 (véase la tabla 13)
 GCGGGTAAGAGCAGGAGTGTG
 10 SEQ ID NO: 87 (véase la tabla 13)
 CTGCTCTTACCCGCCGAACCCCTG
 SEQ ID NO: 88 (véase la tabla 13)
 15 GAGGGACCTTAGAGCAGAGCGGGC
 SEQ ID NO: 89 (véase la tabla 13)
 20 CTACTGCTAGGTCGTTGCCAAGG
 SEQ ID NO: 90 (véase la tabla 13)
 TGATTGGCCAGCGTCTTACACTCCG
 25 SEQ ID NO: 91 (véase la tabla 13)
 GTGTAAGACGCTGGCCAATCACA
 30 SEQ ID NO: 92 (véase la tabla 13)
 ACAACGCGGTCCCTTCAGAAGCAG
 SEQ ID NO: 93 (véase la tabla 13)
 35 CCGCGTGGTCTGGGCTCTGTAG
 SEQ ID NO: 94 (véase la tabla 13)
 40 GAATTCCCTCCACCTCCGCCCCAC
 SEQ ID NO: 95 (véase la tabla 13)
 CAACGTTAAAGGCAAACACCTTCTGC
 45 SEQ ID NO: 96 (véase la tabla 13)
 GGCCGAATGAGGACAGAGTGACAG
 50 SEQ ID NO: 97 (véase la tabla 13)
 GCCGGTGAGCAGCTTGATGGT
 SEQ ID NO: 98 (véase la tabla 13)
 55 ACGGCCCGGTCTTTTACAAGG
 SEQ ID NO: 99 (véase la tabla 13)
 60 CGGGAAGGGGCGTTAACAGGGC
 SEQ ID NO: 100 (véase la tabla 13)
 TCTTGGCAGGCAAGGTCTCCGGAG
 65

REIVINDICACIONES

1. Método *in vitro* de cribado de cáncer colorrectal en un sujeto, comprendiendo el método:
5 - determinar un estado de metilación para cada uno de los siguientes, en una muestra de ADN de un sujeto:
 (a) un locus de metilación dentro del gen ZNF132;
 (b) un primer locus de metilación dentro del gen ADAMTS2; y
10 (c) un segundo locus de metilación dentro del gen ADAMTS2; y
 - comparar los datos obtenidos con valores de referencia obtenidos a partir de individuos sanos,
15 - diagnosticar cáncer colorrectal en el sujeto si se detecta una hipermetilación de los loci, en comparación con la muestra de referencia.
2. Método según la reivindicación 1, que comprende además determinar un estado de metilación para cada uno de los siguientes, en una muestra de ADN de un sujeto:
20 (d) un locus de metilación dentro del gen ZNF542; y
 (e) un locus de metilación dentro del gen LONRF2.
- 25 3. Método según las reivindicaciones 1 a 2, que comprende además determinar un estado de metilación para un locus de metilación dentro del gen ZNF492 en una muestra de ADN de un sujeto.
4. Método según las reivindicaciones 1 a 3, en el que el locus de metilación dentro del gen ZNF132 comprende ZNF132 '415 (SEQ ID NO: 40).
- 30 5. Método según las reivindicaciones 1 a 4, en el que el primer locus de metilación dentro del gen ADAMTS2 comprende ADAMTS2 '254 (SEQ ID NO: 21).
6. Método según las reivindicaciones 1 a 5, en el que el segundo locus de metilación dentro del gen ADAMTS2 comprende ADAMTS2 '284 (SEQ ID NO: 22).
- 35 7. Método según las reivindicaciones 2 a 6, en el que el locus de metilación dentro del gen ZNF542 comprende ZNF542 '502 (SEQ ID NO: 35).
- 40 8. Método según las reivindicaciones 2 a 7, en el que el locus de metilación dentro del gen LONRF2 comprende LONRF2 '281 (SEQ ID NO: 19).
9. Método según las reivindicaciones 3 a 8, en el que el locus de metilación dentro del gen ZNF492 comprende ZNF492 '069 (SEQ ID NO: 42).
- 45 10. Método según una cualquiera de las reivindicaciones 1 a 9, en el que el ADN se aísla a partir de sangre o plasma del sujeto humano.
- 50 11. Método según las reivindicaciones 1 a 10, en el que el ADN es ADN libre de células del sujeto humano.
12. Método según las reivindicaciones 1 a 11, en el que estado de metilación se determina usando reacción en cadena de la polimerasa cuantitativa (qPCR).
- 55 13. Kit que comprende:
 (a) un par de cebadores de oligonucleótidos para la amplificación de un locus de metilación dentro del gen ZNF132;
 (b) un par de cebadores de oligonucleótidos para la amplificación de un primer locus de metilación dentro del gen ADAMTS2; y
60 (c) un par de cebadores de oligonucleótidos para la amplificación de un segundo locus de metilación dentro del gen ADAMTS2.

comprendiendo el kit opcionalmente además:

(d) al menos una enzima de restricción específica de la metilación y/o un reactivo de bisulfito

5 (e) una polimerasa.

14. Kit según la reivindicación 13, que comprende además:

10 (f) un par de cebadores de oligonucleótidos para la amplificación de un locus de metilación dentro del gen ZNF542; y

(g) un par de cebadores de oligonucleótidos para la amplificación de un locus de metilación dentro del gen LONRF2.

15 15. Kit según las reivindicaciones 13 a 14, que comprende además:

(h) un par de cebadores de oligonucleótidos para la amplificación de un locus de metilación dentro del gen ZNF492.

20 16. Kit según las reivindicaciones 13 a 15, en el que (a) es un par de cebadores de oligonucleótidos para la amplificación de ZNF132 '415 (par de cebadores SEQ ID NO: 91 y SEQ ID NO: 92).

17. Kit según las reivindicaciones 13 a 16, en el que (b) es un par de cebadores de oligonucleótidos para la amplificación de ADAMTS2 '254 (par de cebadores SEQ ID NO: 53 y SEQ ID NO: 54).

25 18. Kit según las reivindicaciones 13 a 17, en el que (c) es un par de cebadores de oligonucleótidos para la amplificación de ADAMTS2 '284 (par de cebadores SEQ ID NO: 55 y SEQ ID NO: 56).

30 19. Kit según las reivindicaciones 14 a 18, en el que (f) es un par de cebadores de oligonucleótidos para la amplificación de ZNF542 '502 (par de cebadores SEQ ID NO: 81 y SEQ ID NO: 82).

20. Kit según las reivindicaciones 14 a 19, en el que (g) es un par de cebadores de oligonucleótidos para la amplificación de LONRF2 '281 (par de cebadores SEQ ID NO: 49 y SEQ ID NO: 50).

35 21. Kit según las reivindicaciones 15 a 20, en el que (h) es un par de cebadores de oligonucleótidos para la amplificación de ZNF492 '069 (par de cebadores SEQ ID NO: 95 y SEQ ID NO: 96).

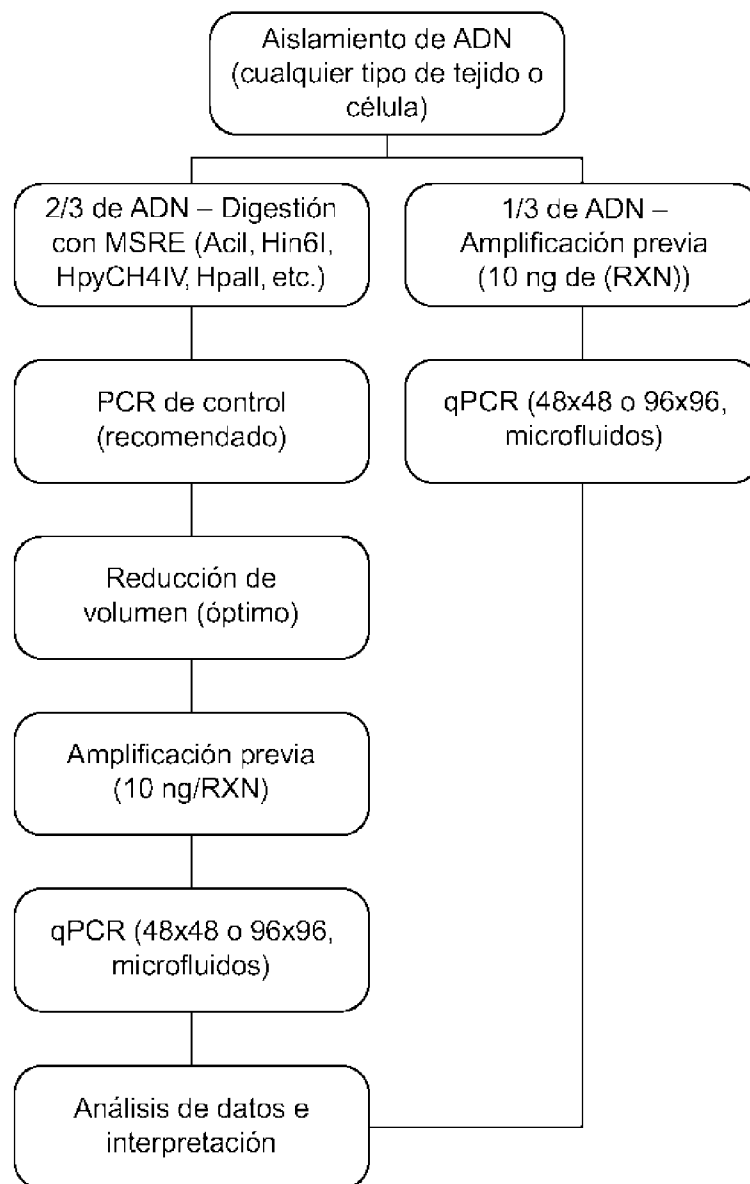


Fig. 1

	Entrenamiento (n = 70)			
	CRC	Sanos + adenoma no avanzado	Sanos	Adenoma no avanzado
Mujeres (%)	15 (21.4)	20 (28.6)	15 (21.4)	5 (7.1)
Hombres (%)	15 (21.4)	20 (28.6)	15 (21.4)	5 (7.1)
Edad (intervalo)	64 (41-80)	60 (46-84)	60 (46-77)	60 (48-84)
IMC (d.e.)	25.0 ($\pm$ 4.4)	26.7 ($\pm$ 4.3)	26.7 ($\pm$ 4.7)	27.2 ($\pm$ 3.0)
	CRC, todos	Proximal	Distal	
Localizado	17	6	11	
Avanzado	13	9	4	

Fig. 2

	Validación (n = 63)			
	CRC	Sanos + adenoma no avanzado	Sanos	Adenoma no avanzado
Mujeres (%)	11 (17.5)	25 (39.7)	20 (31.7)	5 (7.9)
Hombres (%)	9 (14.3)	18 (28.6)	11 (17.5)	7 (11.1)
Edad (intervalo)	61 (45-84)	57 (47-80)	55 (47-80)	63 (55-70)
IMC (d.e.)	25.4 ($\pm$ 3.8)	26.3 ($\pm$ 4.0)	26.3 ($\pm$ 4.0)	26.7 ($\pm$ 4.0)
	CRC, todos	Proximal	Distal	
Localizado	13	5	8	
Avanzado	7	4	3	

Fig. 3

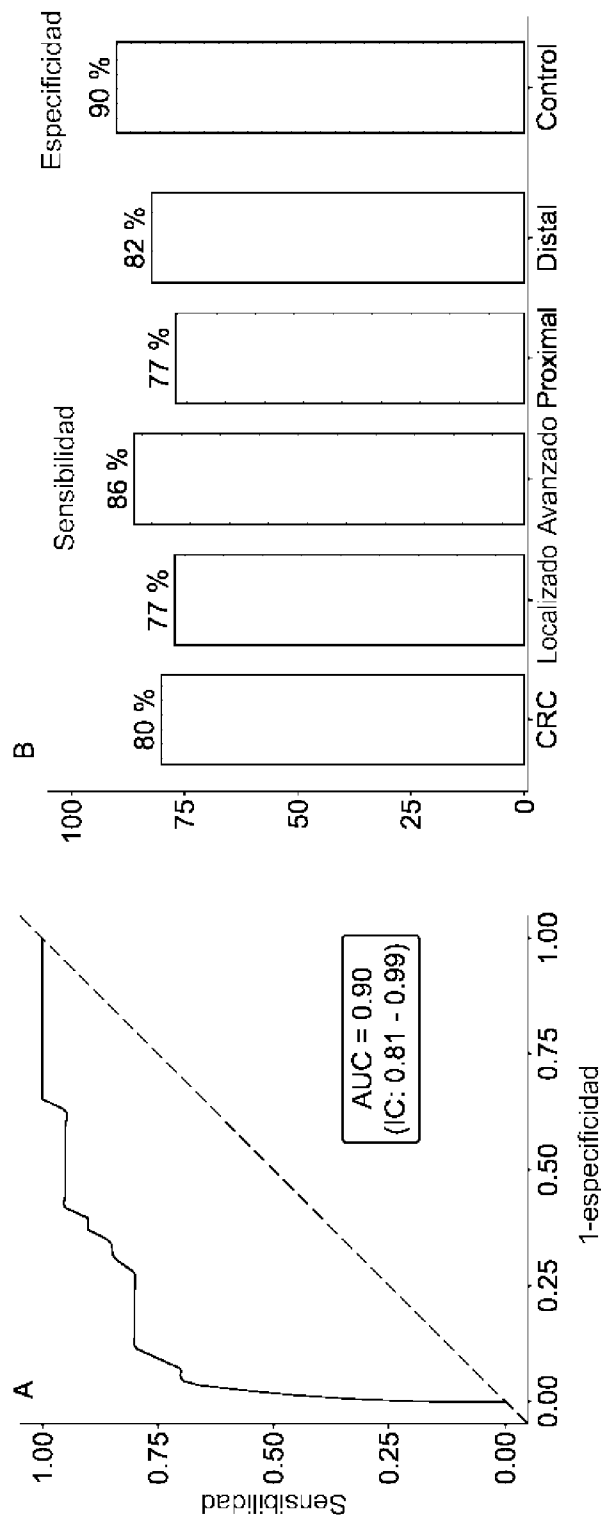


Fig. 4

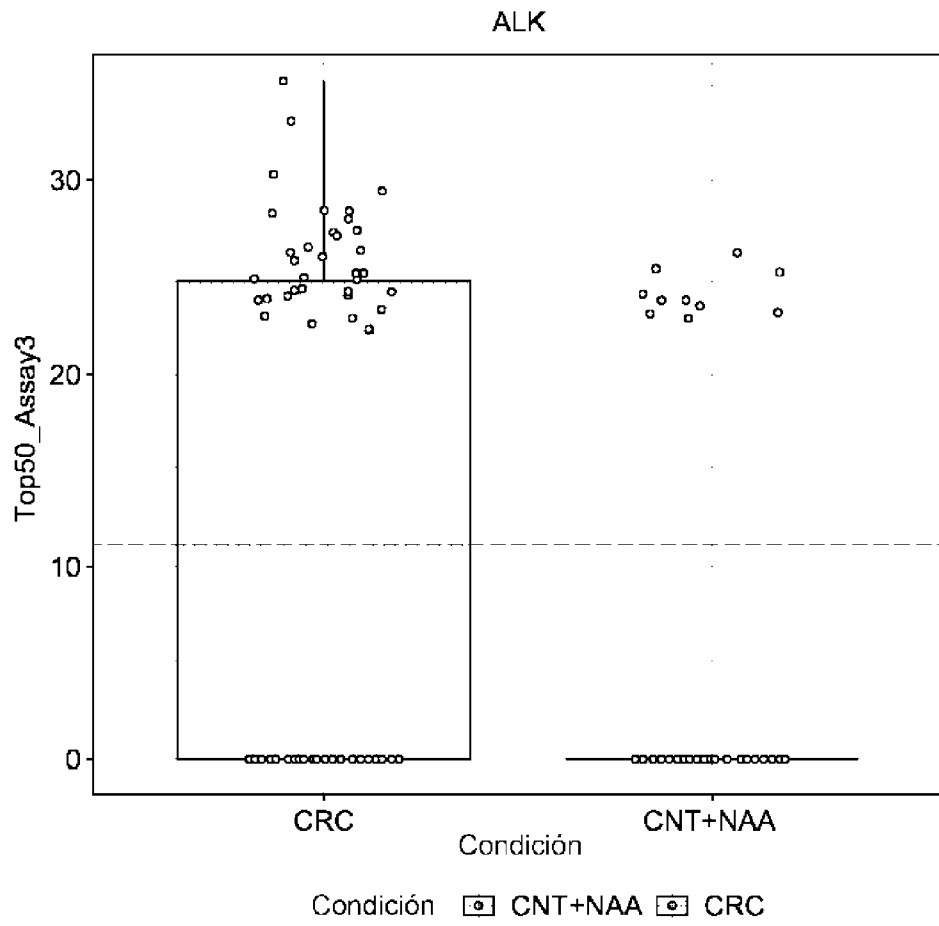


Fig. 5

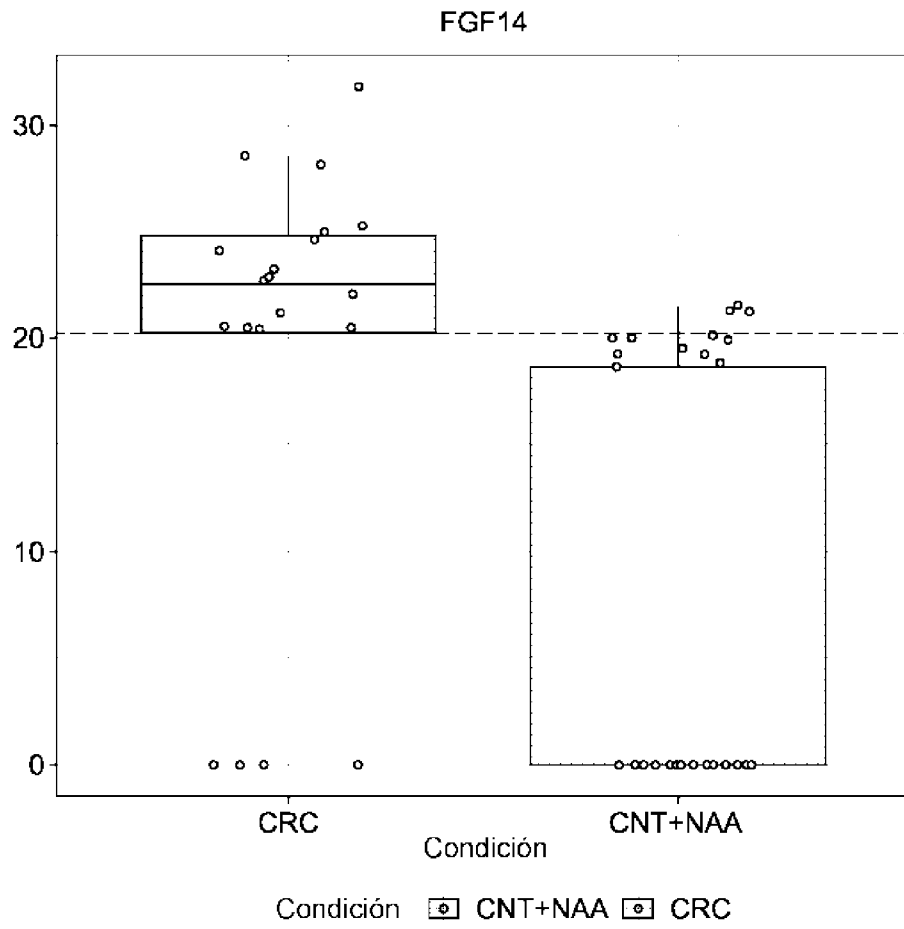


Fig. 6

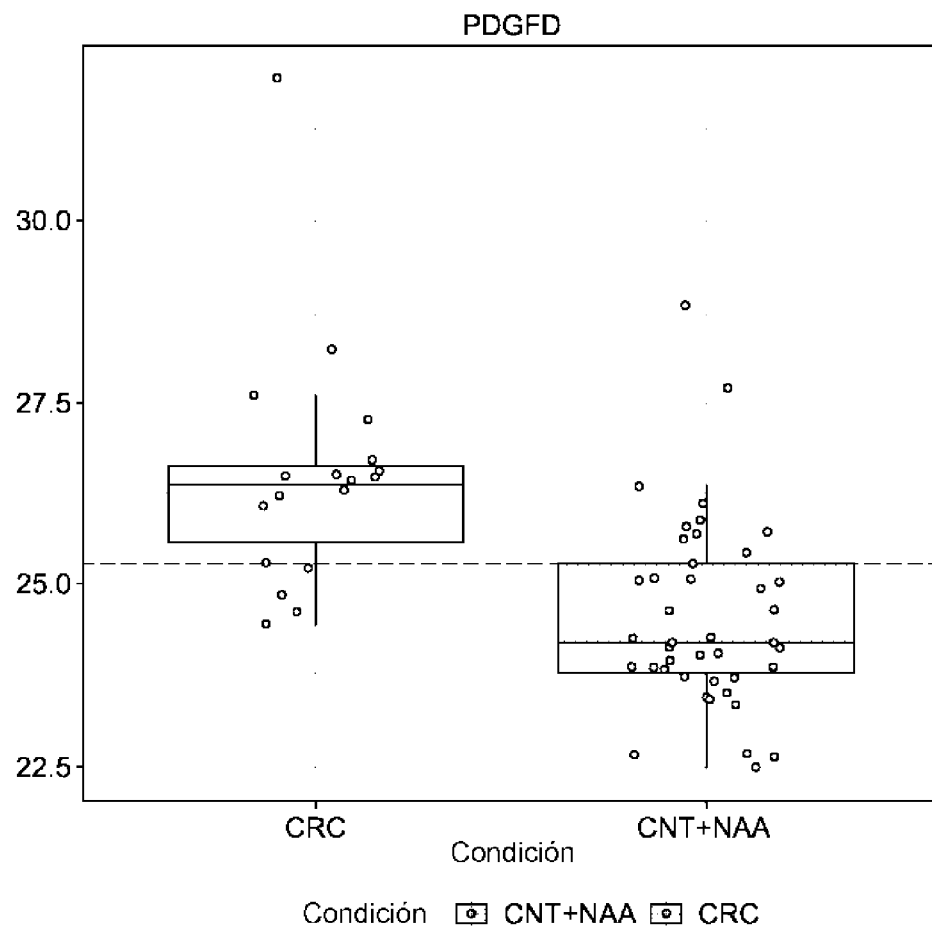


Fig. 7

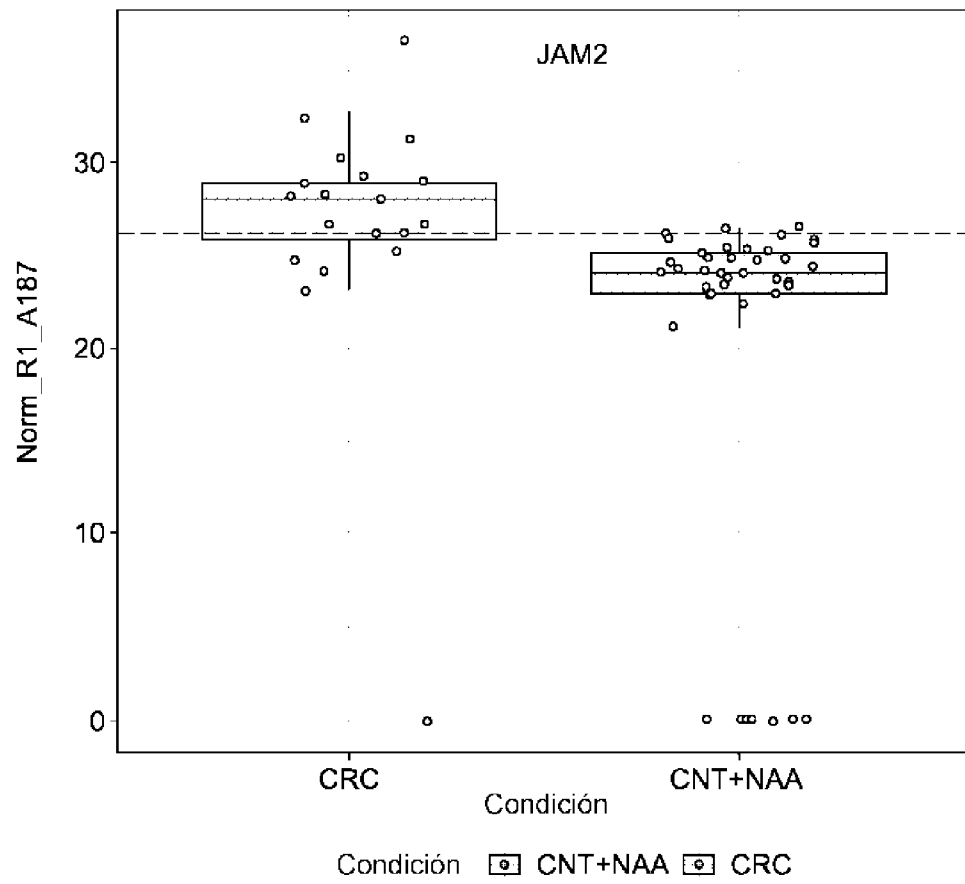


Fig. 8

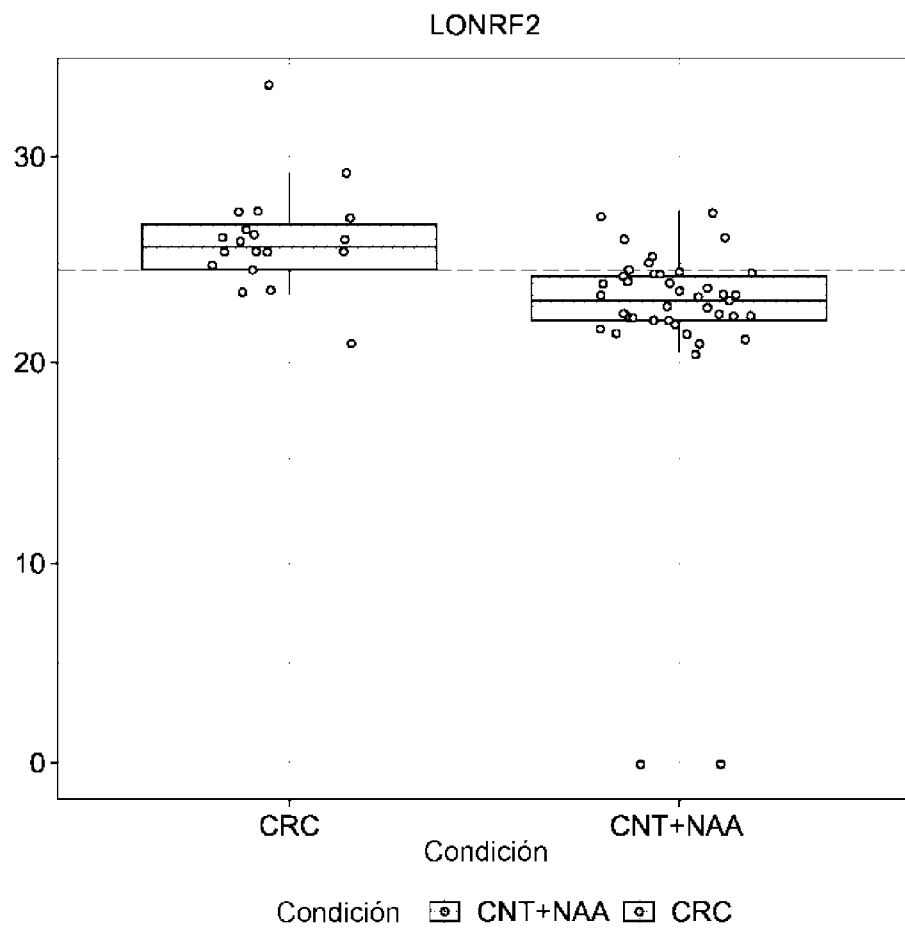


Fig. 9

Validación = 82 muestras					
	CRC	Control + NAA	Control	NAA	
Mujeres	20	14	11	3	
Hombres	23	25	19	6	
Edad (intervalo)	63 (36-84)	65 (45-83)	64 (45-79)	66 (55-83)	
IMC (d.e.)	27.2 ($\pm$ 5)	26.04 ($\pm$ 3.3)	26 ($\pm$ 3.4)	27.5 ($\pm$ 2.5)	
	CRC, todos	Proximal	Distal		
Localizado	24	12	12		
Avanzado	19	9	10		

Fig. 10

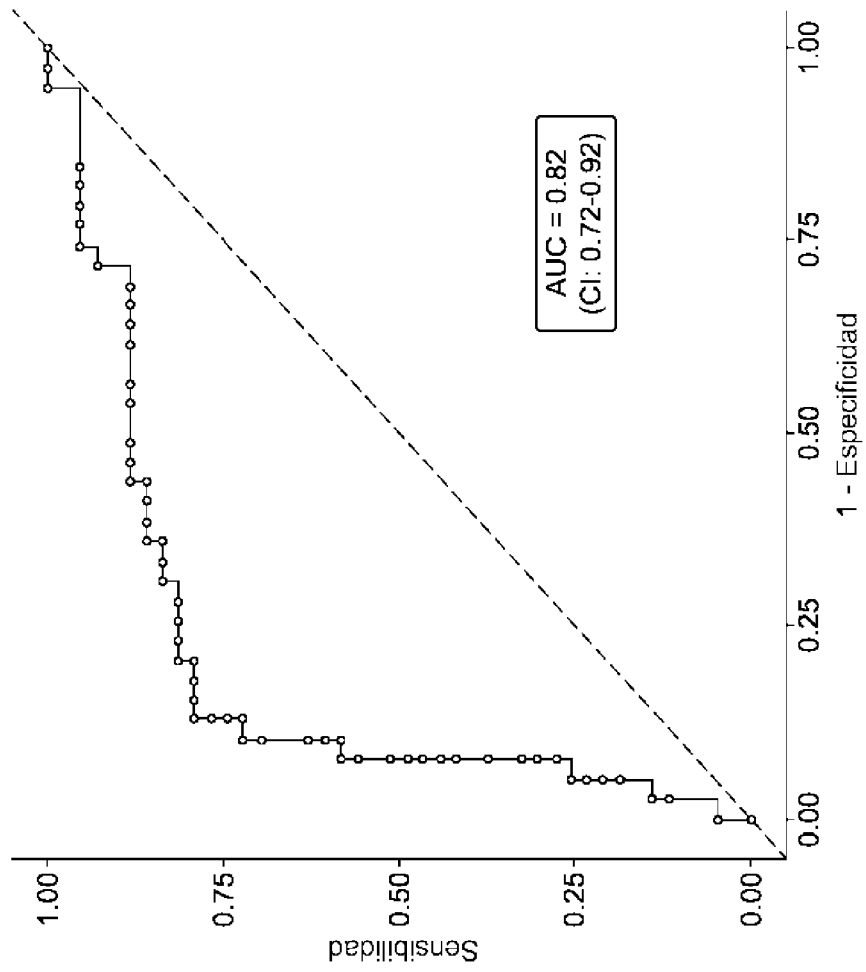


Fig. 11

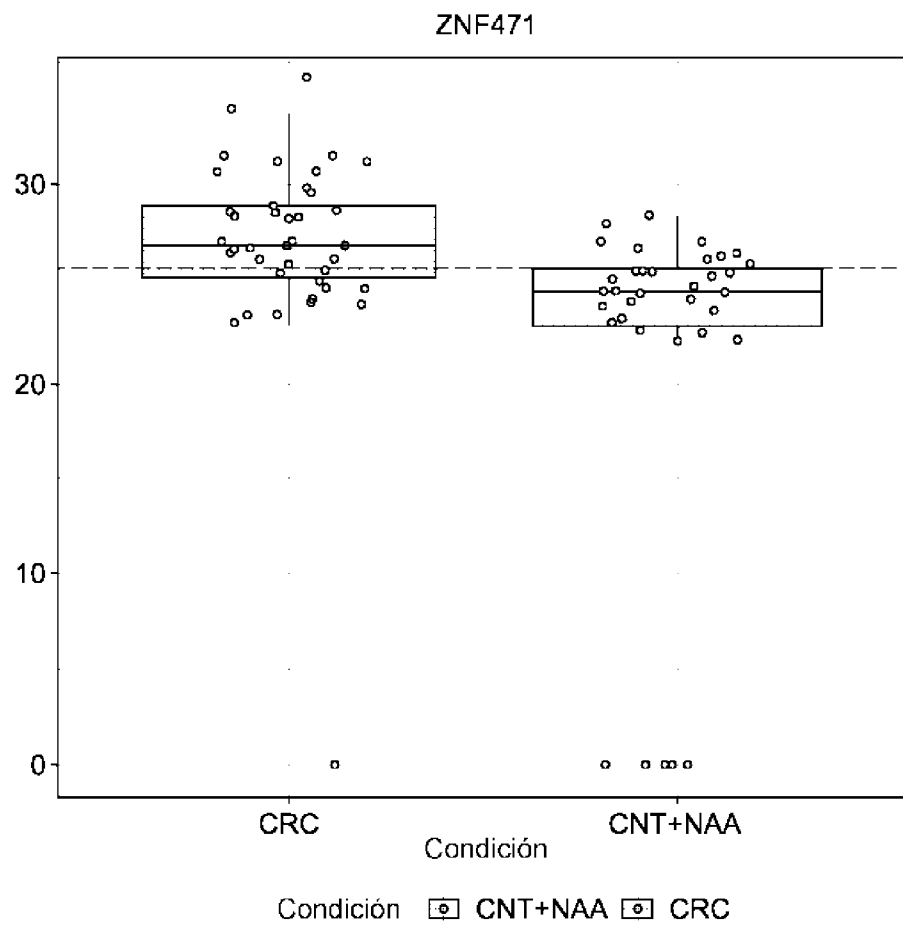


Fig. 12

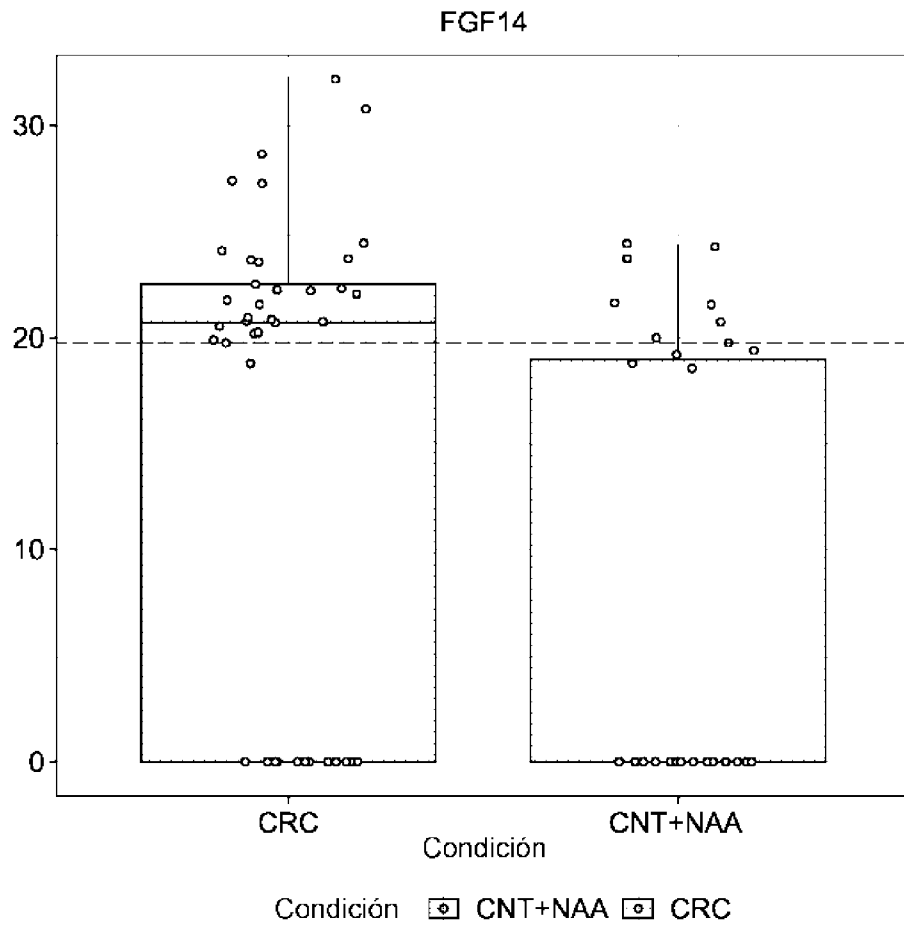


Fig. 13

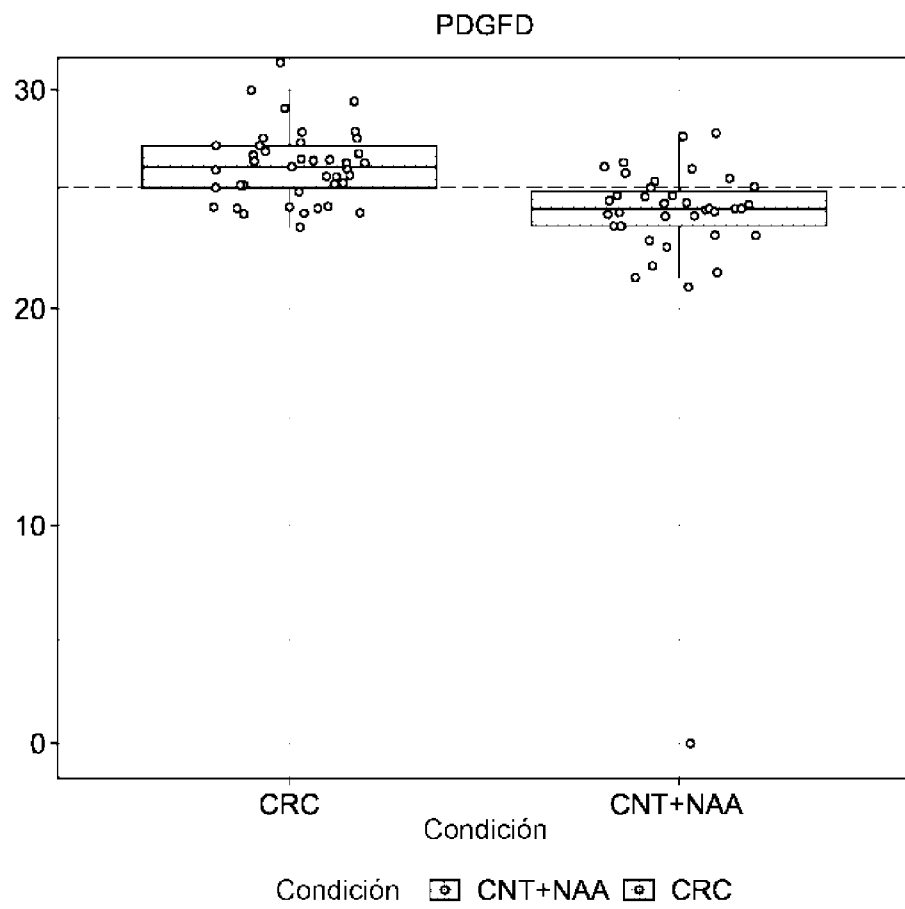


Fig. 14

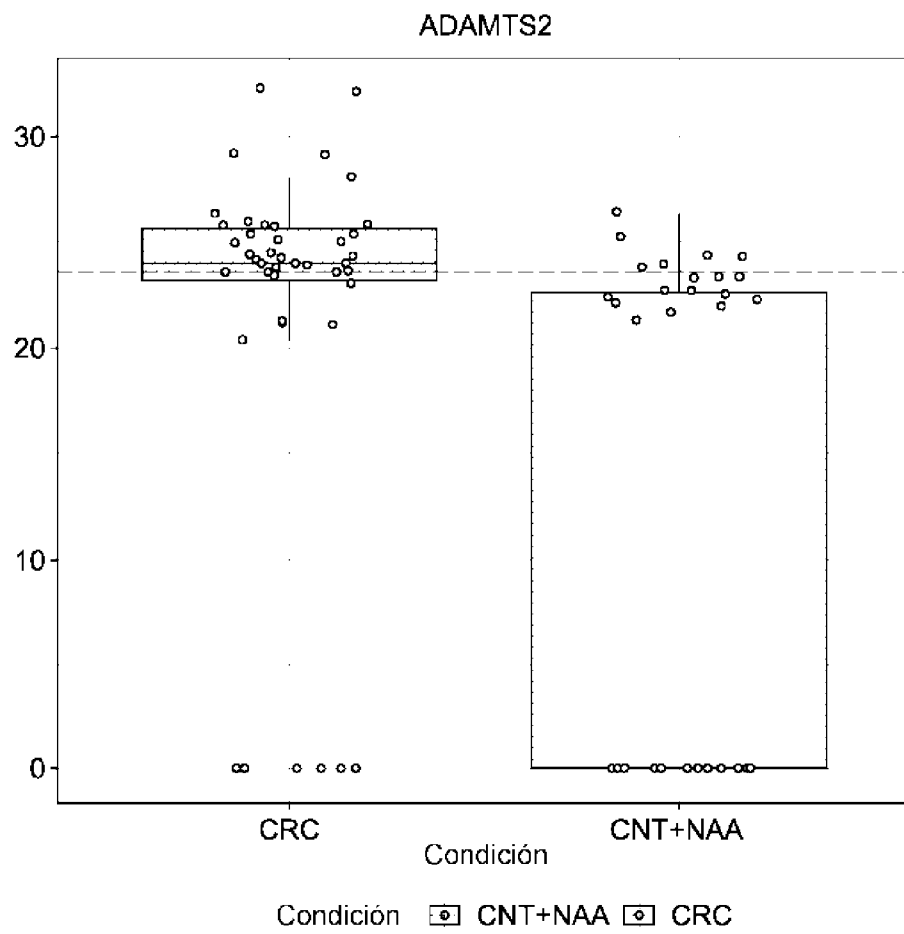


Fig. 15

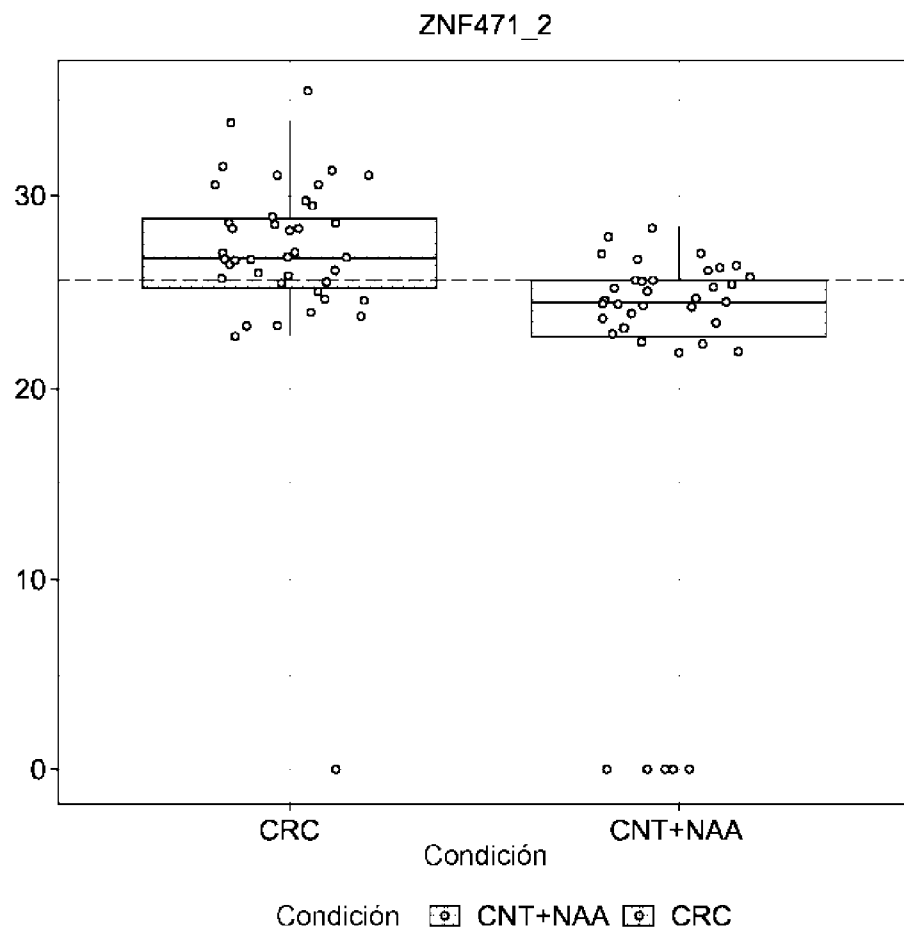
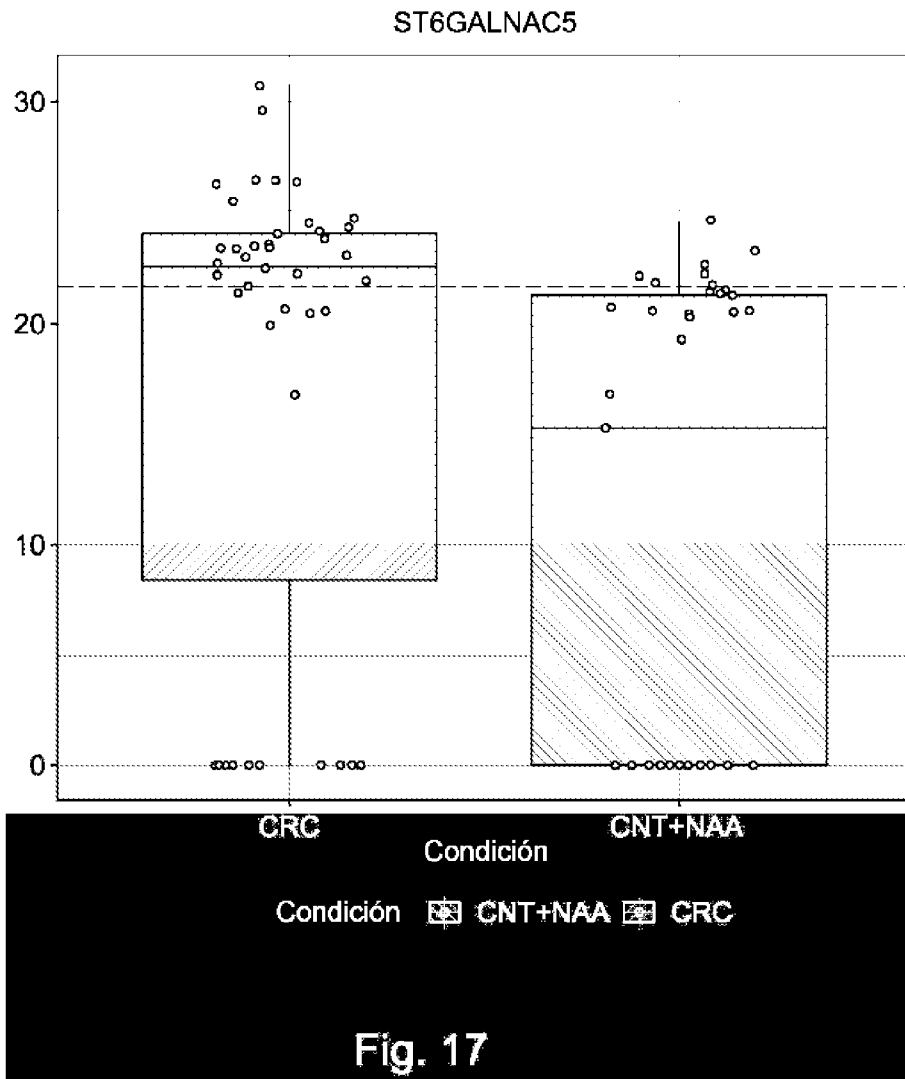


Fig. 16



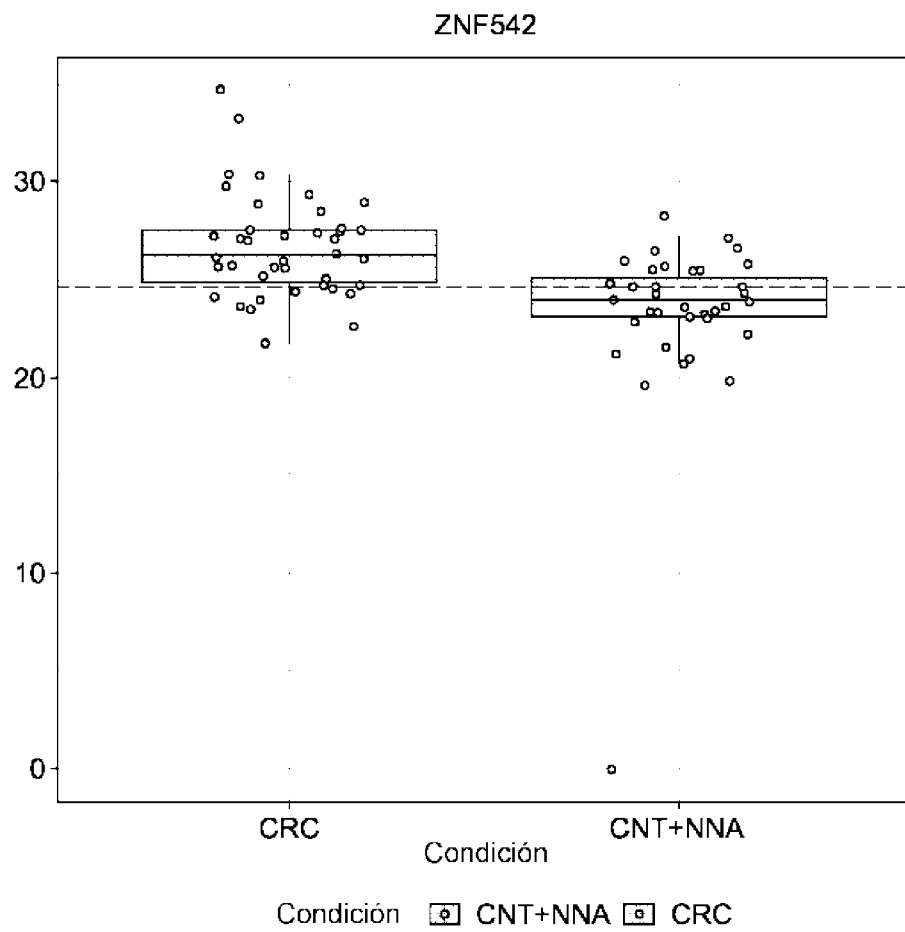


Fig. 18

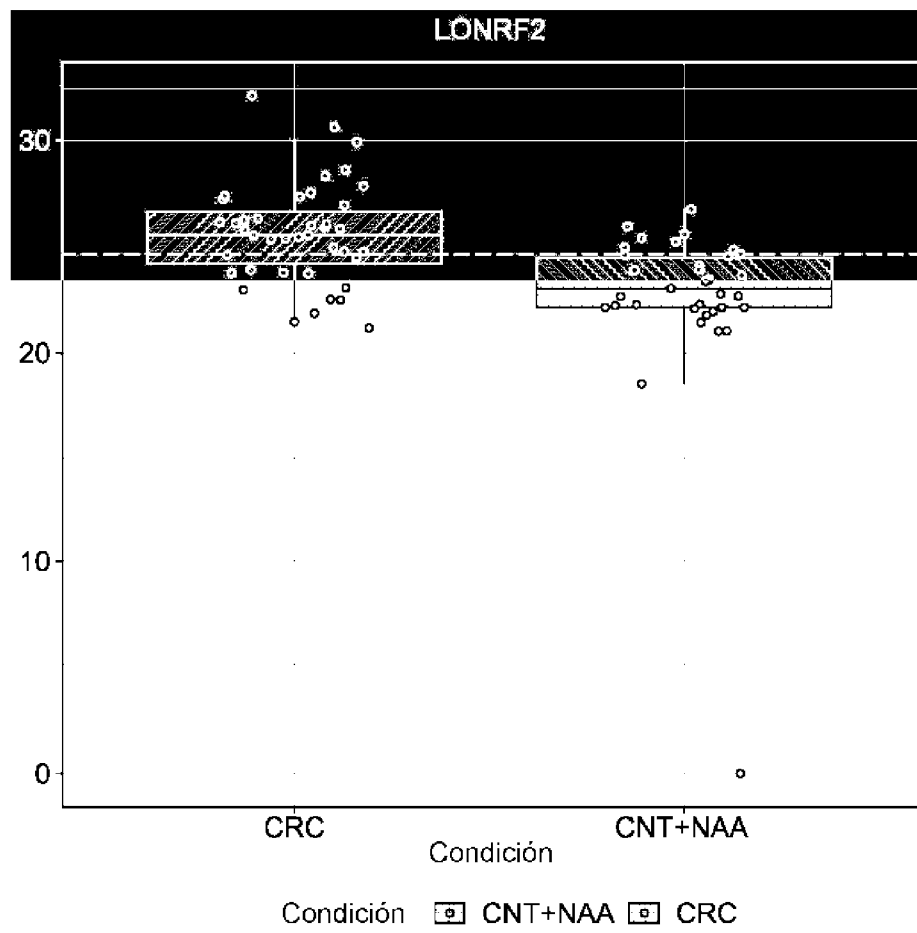


Fig. 19

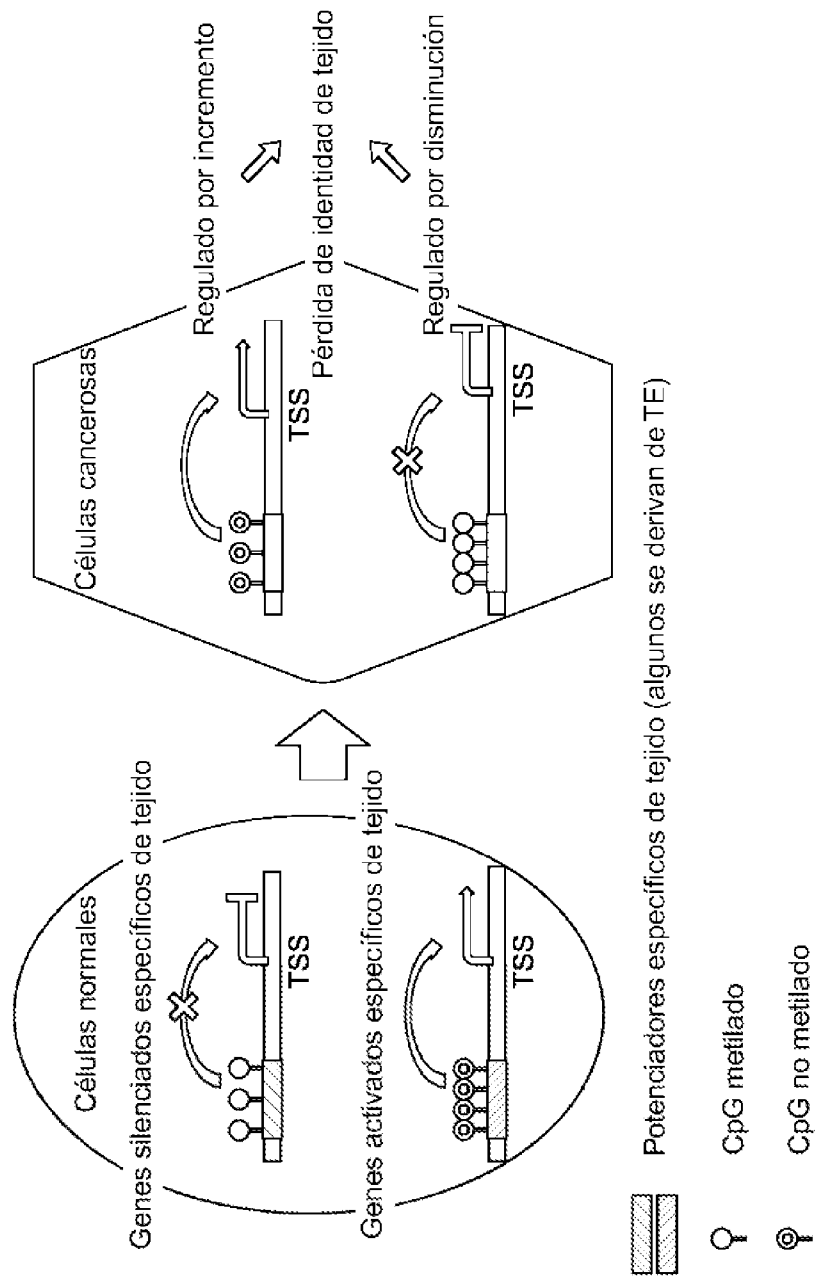


Fig. 20

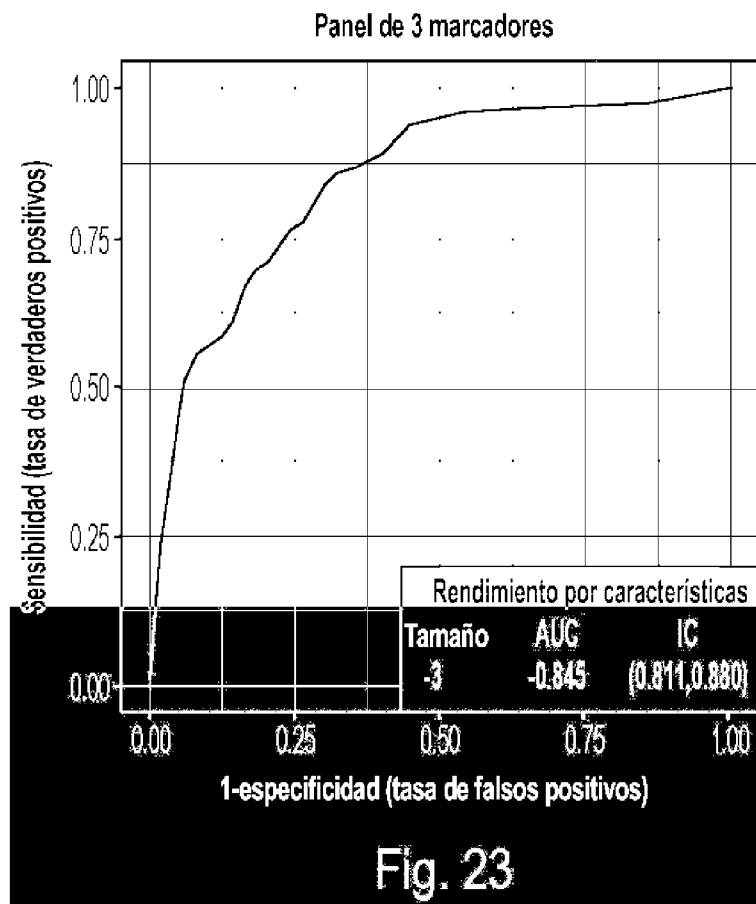
Conjunto de entrenamiento					CRC, todos		
	CRC	Sanos+ NAA	Sanos	NAA		Proximal	Distal
Mujeres	46	59	46	13	Localizado	54	31
Hombres	47	63	45	18	Avanzado	39	17
Edad (intervalo)	63(36-84)	61(45-84)	61(45-80)	63(48-84)	Total	93	48
Total	93	122	91	31			
Muestras totales	215						

Fig. 21

Conjunto de validación					Control				
					(NAA+Sanos +Cáncer de pulmón +Cáncer de mama)				
					CRC	Sanos	NAA	Cáncer de mama	Cáncer de pulmón
Mujeres	71	223	73	328					
Hombres	81	199	75	294					
Edad (intervalo)	65 (41-84)	61 (41-82)	66 (50-82)	61 (41-82)					
Total	152	422	148	622					
Muestras totales	774								

					CRC, todos	Cáncer de mama	Cáncer de pulmón
Localizado					86	24	19
Avanzado					62	2	6
Desconocido					4	0	1
Total					152	26	26

Fig. 22



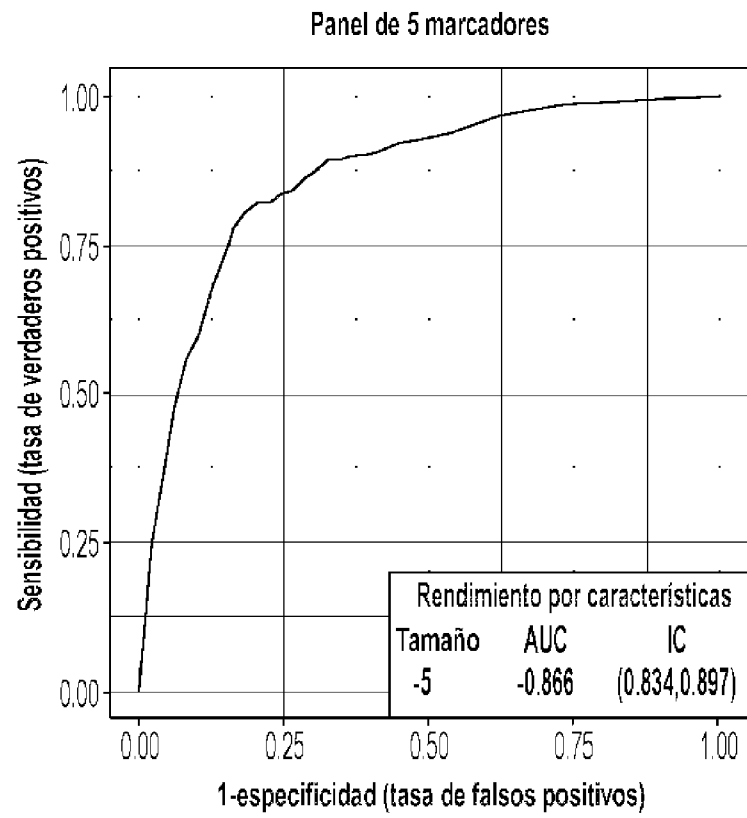


Fig. 24

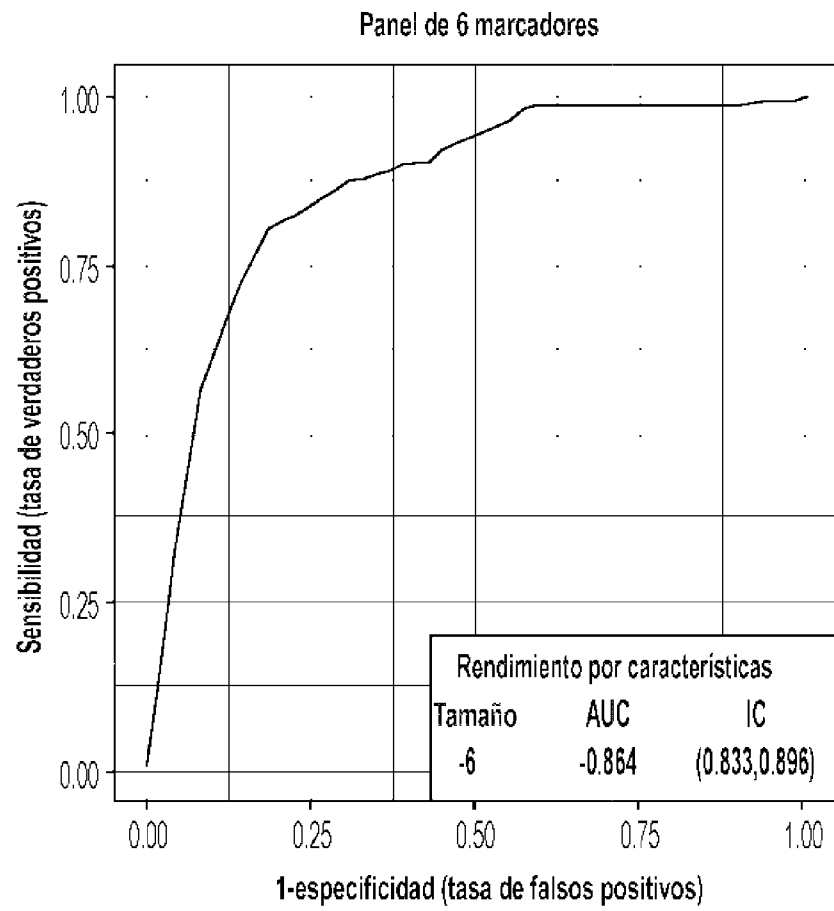


Fig. 25

ZNF132 415

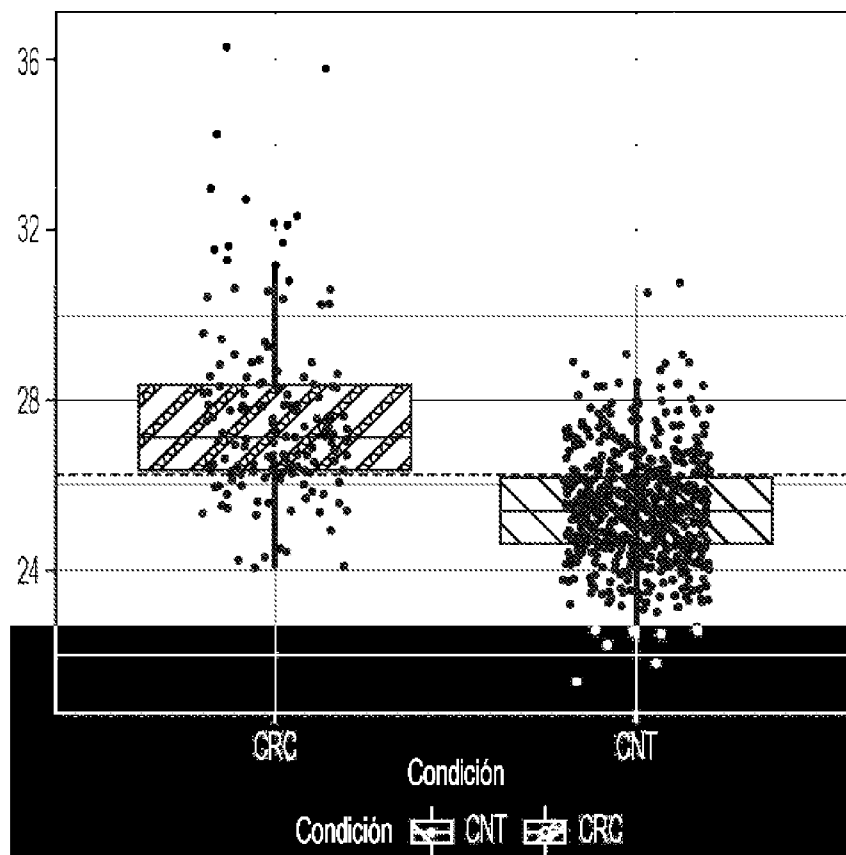


Fig. 26

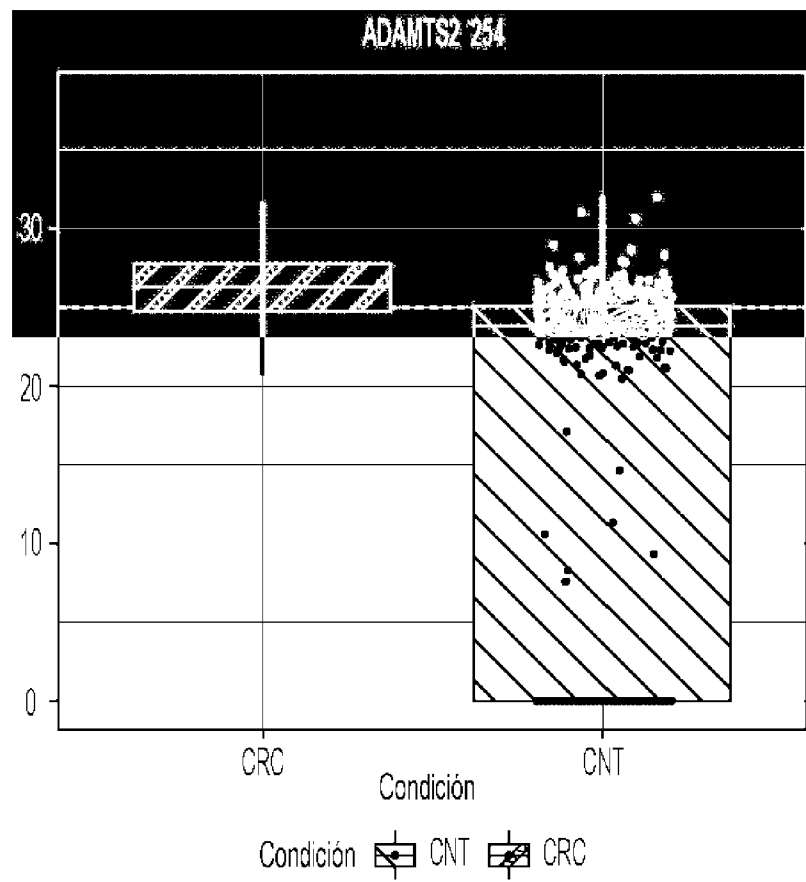


Fig. 27

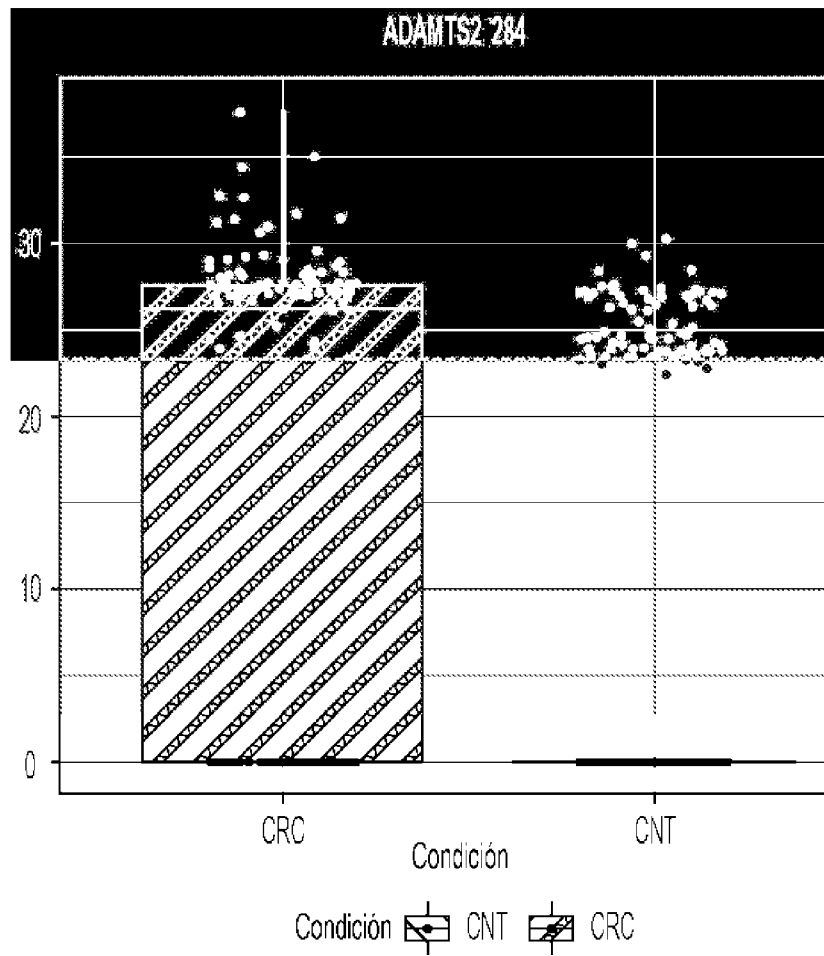


Fig. 28

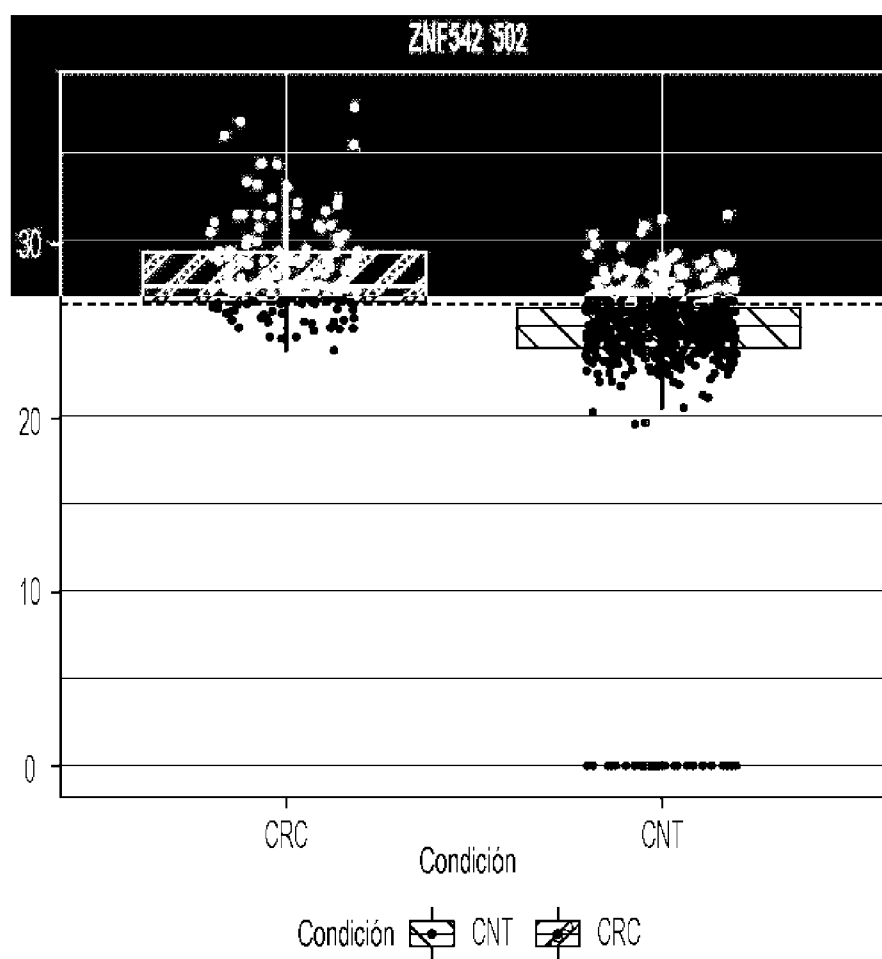


Fig. 29

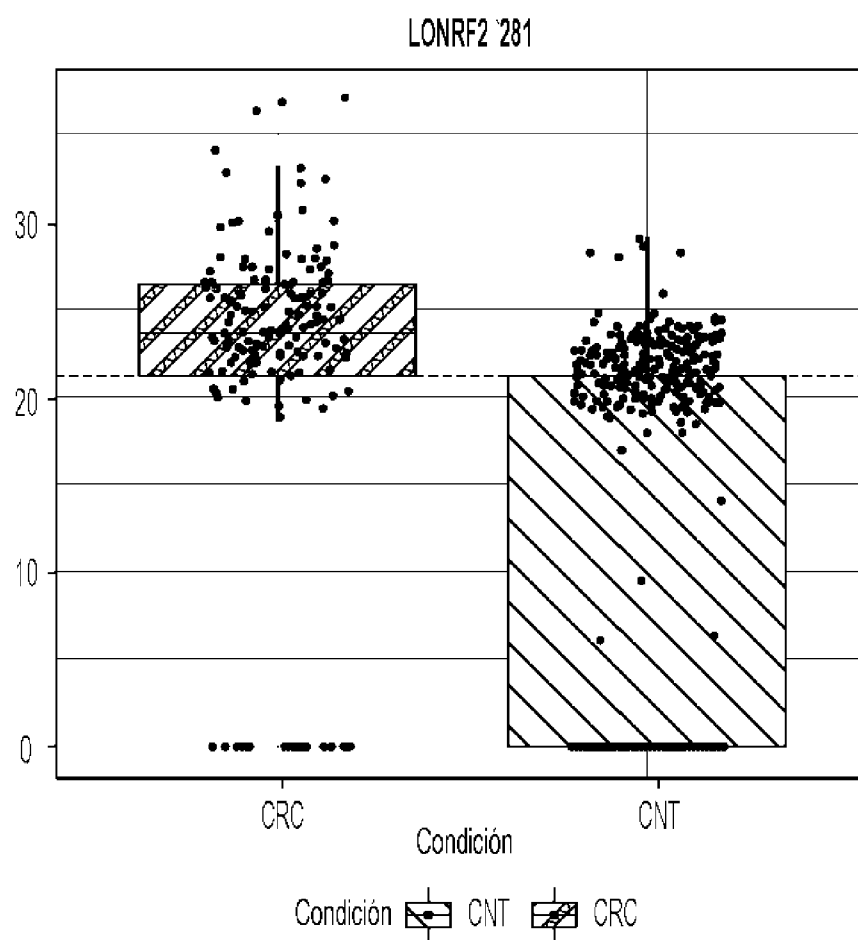


Fig. 30

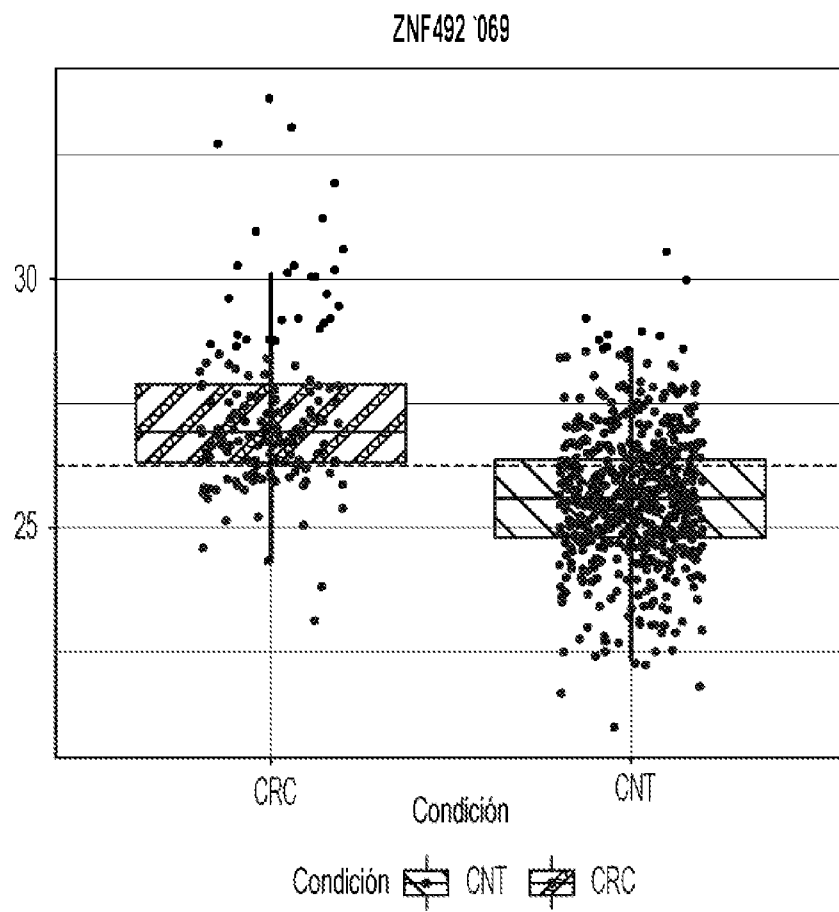


Fig. 31