

19



OFICINA ESPAÑOLA DE
PATENTES Y MARCAS

ESPAÑA



11 Número de publicación: **2 707 341**

51 Int. Cl.:

C12Q 1/68

(2008.01)

12

TRADUCCIÓN DE PATENTE EUROPEA

T3

96 Fecha de presentación y número de la solicitud europea: **13.09.2011** **E 16153959 (8)**

97 Fecha y número de publicación de la concesión europea: **24.10.2018** **EP 3034628**

54 Título: **Diagnóstico de cáncer mediante marcador de metilación**

30 Prioridad:

13.09.2010 AU 2010904116

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

03.04.2019

73 Titular/es:

**CLINICAL GENOMICS PTY LTD (50.0%)
Riverside Life Sciences Building, 11 Julius Avenue
North Ryde, New South Wales 2113, AU y
COMMONWEALTH SCIENTIFIC AND INDUSTRIAL
RESEARCH ORGANISATION (50.0%)**

72 Inventor/es:

**ROSS, JASON;
DREW, HORACE;
MOLLOY, PETER LAURENCE;
MITCHELL, SUSAN;
DUESING, KONSTA;
XU, ZHENG-ZHOU y
BUCKLEY, MICHAEL**

74 Agente/Representante:

ELZABURU, S.L.P

ES 2 707 341 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

Diagnóstico de cáncer mediante marcador de metilación

Campo de la invención

La presente invención se refiere en general a moléculas de ácido nucleico con respecto a las cuales los cambios en los niveles de metilación del ADN son indicativos de la aparición o predisposición a la aparición de una neoplasia. Más concretamente, la presente invención está dirigida a moléculas de ácido nucleico con respecto a las cuales los cambios en los niveles de metilación del ADN son indicativos de la aparición y/o la progresión de una neoplasia de intestino grueso, tal como un adenoma o adenocarcinoma. El estado de metilación del ADN de la presente invención es útil en una variedad de aplicaciones que incluyen, pero no se limitan a, aquellas relacionadas con el diagnóstico y/o control de neoplasias colorrectales, tales como los adenocarcinomas colorrectales. Por consiguiente, en un aspecto relacionado, la presente invención está dirigida a un método de escrutinio de la aparición, predisposición a la aparición y/o progresión de una neoplasia mediante el escrutinio de la modulación en la metilación del ADN de una o más moléculas de ácido nucleico.

Antecedentes de la invención

El cáncer colorrectal incluye crecimientos cancerosos en el colon, el recto y el apéndice. Con 655.000 muertes en todo el mundo por año, es la cuarta forma más común de cáncer en los Estados Unidos y la tercera causa de muerte relacionada con el cáncer en el mundo occidental. Los cánceres colorrectales surgen de pólipos adenomatosos en el colon. Estos crecimientos en forma de hongo son generalmente benignos, pero algunos se convierten en cáncer con el paso del tiempo. El cáncer de colon localizado generalmente se diagnostica a través de colonoscopia.

Los cánceres invasivos que están confinados dentro de la pared del colon (estadios I y II de TNM) son curables con cirugía. Si no se tratan, se diseminan a los ganglios linfáticos regionales (estadio III), donde hasta 73% son curables mediante cirugía y quimioterapia. El cáncer que se metastatiza a sitios distantes (estadio IV) generalmente no es curable, aunque la quimioterapia puede prolongar la supervivencia, y en casos raros, se ha observado que la cirugía y la quimioterapia juntas han llevado a la curación de pacientes (Markowitz y Bertagnolli, 2009, *N. Engl. J. Med.* 361(25): 2449-60). La radiación se utiliza con el cáncer de recto.

El cáncer colorrectal está precedido por adenomas. Los adenomas son tumores benignos, o neoplasias, de origen epitelial que derivan de tejido glandular o exhiben estructuras glandulares claramente definidas. Algunos adenomas muestran elementos tisulares reconocibles, tales como tejido fibroso (fibroadenomas) y estructura epitelial, mientras que otros, tales como los adenomas bronquiales, producen compuestos activos que podrían dar lugar a síndromes clínicos.

Los adenomas pueden progresar hasta convertirse en una neoplasia invasiva y en ese caso se denominan adenocarcinomas. En consecuencia, los adenocarcinomas se definen como tumores epiteliales malignos que surgen de estructuras glandulares, que son partes constitutivas de muchos órganos del cuerpo. El término adenocarcinoma también se aplica a los tumores que muestran un patrón de crecimiento glandular. Estos tumores pueden ser subclasificados según las sustancias que producen, por ejemplo, adenocarcinomas serosos y secretores de moco, o según la disposición microscópica de sus células en patrones, por ejemplo, adenocarcinomas papilares y foliculares. Estos carcinomas pueden ser sólidos o quísticos (cistoadenocarcinomas). Cada órgano puede producir tumores que muestran una variedad de tipos histológicos, por ejemplo, el ovario puede producir tanto mucinoso como cistoadenocarcinoma.

Los adenomas en diferentes órganos se comportan de manera diferente. En general, la probabilidad global de que el carcinoma esté presente dentro de un adenoma (es decir, un foco de cáncer que se haya desarrollado dentro de una lesión benigna) es de aproximadamente 5%. Sin embargo, esto está relacionado con el tamaño de un adenoma. Por ejemplo, en el intestino grueso (colon y recto específicamente) la aparición de un cáncer dentro de un adenoma es rara en adenomas de menos de 1 centímetro. Tal desarrollo se estima en 40 a 50% en los adenomas que miden más de 4 centímetros y muestran ciertos cambios histopatológicos tales como el cambio de vellosidades o displasia de alto grado. Los adenomas con grados más altos de displasia tienen una mayor incidencia de carcinoma. En cualquier adenoma colorrectal dado, los factores predictores de la presencia de cáncer actual o la aparición futura de cáncer en el órgano incluyen el tamaño (especialmente mayor que 9 mm), el grado de cambio de morfología tubular a vellosa, la presencia de displasia de alto grado y el cambio morfológico descrito como "adenoma serrado". En cualquier individuo dado, las características adicionales de aumento de la edad, la aparición familiar de adenoma o cáncer colorrectal, el género masculino o la multiplicidad de adenomas, predicen un futuro aumento del riesgo de cáncer en el órgano, los llamados factores de riesgo para el cáncer. Excepto por la presencia de adenomas y su tamaño, ninguno de estos está definido objetivamente y todos los que no sean número y tamaño están sujetos a error del observador y a confusión en cuanto a la definición precisa de la característica en cuestión. Debido a que tales factores pueden ser difíciles de evaluar y definir, su valor como factores predictores de riesgo actual o futuro de cáncer es poco preciso.

Una vez que se ha desarrollado un adenoma esporádico, la probabilidad de que ocurra un nuevo adenoma es aproximadamente de 30% en 26 meses.

Los síntomas de cáncer colorrectal dependen de la localización del tumor en el intestino y de si se ha producido metástasis. Desafortunadamente, muchos de los síntomas también pueden aparecer en otras enfermedades y, por lo tanto, los síntomas pueden no ser un diagnóstico concluyente de cáncer colorrectal.

Los síntomas locales son más probables si el tumor se encuentra localizado más cerca del ano. Puede haber un cambio en el hábito intestinal (estreñimiento de inicio reciente o diarrea en ausencia de otra causa), una sensación de defecación incompleta y reducción del diámetro de las heces. El tenesmo y el cambio en la forma de las heces son ambos característicos del cáncer de recto. El sangrado gastrointestinal inferior, incluido el paso de sangre roja brillante en las heces, puede indicar cáncer colorrectal, al igual que la mayor presencia de moco. Las melenas, heces de color negro con aspecto alquitranoso, normalmente se producen en el sangrado gastrointestinal superior (tal como el procedente de una úlcera duodenal) pero a veces se encuentra en el cáncer colorrectal cuando la enfermedad está localizada al principio del intestino grueso.

Un tumor que es lo suficientemente grande como para llenar toda la luz del intestino puede causar obstrucción intestinal. Esta situación se caracteriza por estreñimiento, dolor abdominal, distensión abdominal y vómitos. Esto conduce ocasionalmente a un intestino obstruido y distendido que se perfora y causa peritonitis.

Ciertos efectos locales del cáncer colorrectal ocurren cuando la enfermedad se ha vuelto más avanzada. Es más probable que se note un tumor grande al palpar el abdomen, y que un médico lo observe en el examen físico. La enfermedad puede invadir otros órganos y puede causar sangre o aire en la orina o flujo vaginal.

Si un tumor ha causado sangrado oculto crónico, puede aparecer anemia por deficiencia de hierro. Esto puede ser experimentado como fatiga, palpitaciones y notado como palidez. El cáncer colorrectal también puede conducir a pérdida de peso, generalmente debido a una disminución del apetito.

Los síntomas constitucionales más inusuales son una fiebre inexplicable y uno de varios síndromes paraneoplásicos. El síndrome paraneoplásico más común es la trombosis, generalmente trombosis venosa profunda.

El cáncer colorrectal se propaga más comúnmente al hígado. Esto puede pasar desapercibido, pero los depósitos grandes en el hígado pueden causar ictericia y dolor abdominal (debido al estiramiento de la cápsula). Si el depósito del tumor obstruye el conducto biliar, la ictericia puede ir acompañada de otras características de obstrucción biliar tales como heces pálidas.

El cáncer colorrectal puede tardar muchos años en desarrollarse y la detección temprana del cáncer colorrectal mejora considerablemente el pronóstico. Incluso los esfuerzos modestos para implementar los métodos de escrutinio de cáncer colorrectal pueden dar como resultado una disminución en las muertes por cáncer. A pesar de esto, las tasas de escrutinio de cáncer colorrectal siguen siendo bajas. Actualmente existen varias pruebas diferentes disponibles para este propósito:

- Examen rectal digital: el médico inserta un dedo enguantado y lubricado en el recto para detectar áreas anormales. Solo detecta tumores lo suficientemente grandes como para palparlos en la parte distal del recto, pero es útil como prueba de escrutinio inicial.
- Prueba de sangre oculta en materia fecal: una prueba para detectar sangre en las heces. Se pueden utilizar dos tipos de pruebas para detectar sangre oculta en heces, es decir, con base de guayaco (prueba química) e inmunoquímica. La sensibilidad de las pruebas inmunoquímicas es superior a la de las pruebas químicas sin una reducción inaceptable de la especificidad (Weitzel JN (diciembre de 1999). "Genetic cancer risk assessment. Putting it all together". *Cancer* 86 (11 Supl):2483-92).
- Endoscopia:
 - o Sigmoidoscopia: se inserta una sonda iluminada (sigmoidoscopio) en el recto y en la parte inferior del colon para detectar pólipos y otras anomalías,
 - o Colonoscopia: se inserta una sonda iluminada denominada colonoscopio en el recto y en todo el colon para detectar pólipos y otras anomalías que pueden ser causadas por el cáncer. Una colonoscopia tiene la ventaja de que si se encuentran pólipos durante el procedimiento, se pueden extirpar de inmediato. También se puede tomar tejido para realizar una biopsia.
- Enema de bario de doble contraste (DCBE): primero, se toma una preparación durante la noche para limpiar el colon. Se administra un enema que contiene sulfato de bario, a continuación se insufla aire en el colon, lo que lo distiende. El resultado es una capa delgada de bario sobre el revestimiento interno del colon que es visible en las películas de rayos X. Un cáncer o un pólipo precanceroso se pueden detectar de esta manera. Esta técnica puede pasar por alto el pólipo plano (menos común).
- La colonoscopia virtual reemplaza las películas de rayos X en el enema de bario de doble contraste (más arriba) por una exploración de tomografía computarizada especial y requiere un soporte lógico especial

para la estación de trabajo para que el radiólogo pueda interpretar. Esta técnica se acerca a la colonoscopia en sensibilidad para pólipos. Sin embargo, cualquier pólipo encontrado todavía debe ser extirpado por colonoscopia convencional.

- La tomografía axial computarizada convencional es un método de rayos X que se puede utilizar para determinar el grado de diseminación del cáncer, pero no es lo suficientemente sensible como para utilizarlo en el escrutinio. Algunos tipos de cáncer se encuentran en las exploraciones por TAC realizadas por otros motivos.
- Análisis de sangre: la medición de la sangre del paciente para determinar los niveles elevados de ciertas proteínas puede dar una indicación de la carga tumoral. En particular, los niveles altos de antígeno carcinoembrionario (CEA) en la sangre pueden indicar metástasis de adenocarcinoma. Si bien estas pruebas son con frecuencia falsas positivas o falsas negativas, y no se recomiendan para el escrutinio, pueden ser útiles para evaluar la recurrencia de la enfermedad. Los biomarcadores CA19-9 y CA 242 pueden indicar riesgos metastásicos relacionados con la e-selectina, ayudar a seguir el progreso terapéutico y evaluar la recurrencia de la enfermedad. Recientemente, un ensayo para la detección en plasma de secuencias metiladas del gen Septina 9 también está disponible para ayudar en el diagnóstico del cáncer colorrectal.
- La tomografía por emisión de positrones (PET) es una tecnología de exploración tridimensional en la que se inyecta un azúcar radioactivo al paciente, el azúcar se acumula en tejidos con alta actividad metabólica y se forma una imagen al medir la emisión de radiación del azúcar. Debido a que las células cancerosas a menudo tienen tasas metabólicas muy altas, esto se puede utilizar para diferenciar tumores benignos y malignos. La PET no se utiliza para el escrutinio y no tiene (todavía) un lugar en el trabajo de rutina de los casos de cáncer colorrectal.
- La prueba de ADN en heces es una tecnología emergente en el escrutinio del cáncer colorrectal. Los adenomas y cánceres premalignos eliminan marcadores de ADN de sus células que no se degradan durante el proceso digestivo y permanecen estables en las heces. La captura, seguida de la PCR, amplifica el ADN a niveles detectables para el ensayo.
- Altos niveles de proteína C reactiva como marcador de riesgo

A pesar de la existencia de estas pruebas, el diagnóstico sigue siendo problemático. La mayoría de las pruebas más sensibles son bastante invasivas y caras y, por lo tanto, la aceptación por parte de los pacientes es baja. Por lo tanto, existe la necesidad continua de desarrollar protocolos de diagnóstico más simples e informativos o ayudas para el diagnóstico que permitan una colonoscopia directa a las personas con más probabilidades de haber desarrollado adenomas o carcinomas. Una prueba de escrutinio simple y precisa permitiría configurar sistemas de escrutinio mucho más ampliamente aplicables.

En el trabajo previo a la presente invención, se ha determinado que los cambios en la metilación de ciertos genes son indicativos del desarrollo de neoplasias del intestino grueso, tales como adenomas y adenocarcinomas. Aún más, la identificación de nucleótidos de citosina de ADN genómico específicos que se vuelven hipermetilados ha permitido el desarrollo de reacciones de amplificación muy simples y específicas para uso rutinario en el contexto del diagnóstico. Por lo tanto, el diagnóstico se puede realizar basándose en el escrutinio de uno o más de un panel de estos genes metilados de manera diferencial. En consecuencia, los autores de la presente invención han identificado un panel de genes que facilitan el diagnóstico del desarrollo de adenocarcinoma y adenoma y/o el seguimiento de las afecciones caracterizadas por el desarrollo de estos tipos de neoplasias.

Compendio de la invención

A lo largo de esta memoria descriptiva y de las reivindicaciones que siguen, a menos que el contexto requiera lo contrario, se entenderá que la palabra "comprenden" y variaciones tales como "comprende" y "que comprende" implican la inclusión de un número entero o etapa o un grupo de números enteros o etapas establecidos pero no la exclusión de cualquier otro número entero o etapa o grupo de números enteros o etapas.

Como se emplea en la presente memoria, el término "derivado de" se tomará para indicar que un entero o grupo de números enteros concretos se originó a partir de la especie especificada, pero no necesariamente se obtuvo directamente de la fuente especificada. Adicionalmente, como se emplea en la presente memoria, las formas singulares "un", "uno", "una", "el" y "la" incluyen los referentes plurales a menos que el contexto indique claramente lo contrario.

A menos que se defina lo contrario, todos los términos técnicos y científicos utilizados en la presente memoria tienen el mismo significado que entiende comúnmente un experto en la técnica a la que pertenece esta invención.

La memoria descriptiva sujeto contiene información sobre la secuencia de nucleótidos preparada utilizando el programa Patentln Versión 3.5, que se presenta en la presente memoria después de la bibliografía. Cada secuencia de nucleótidos se identifica en la lista de secuencias mediante el indicador numérico <210> seguido del identificador

5 de secuencia (p. ej., <210> 1, <210> 2, etc.). La longitud, el tipo de secuencia (ADN, etc.) y el organismo fuente para cada secuencia se indican mediante la información proporcionada en los campos de indicadores numéricos <211>, <212> y <213>, respectivamente. Las secuencias de nucleótidos a las que se hace referencia en la memoria descriptiva se identifican mediante el indicador SEQ ID NO: seguido del identificador de secuencia (p. ej., SEQ ID NO: 1, SEQ ID NO: 2, etc.). El identificador de secuencia al que se hace referencia en la memoria descriptiva se correlaciona con la información proporcionada en el campo del indicador numérico <400> en la lista de secuencias, que está seguida por el identificador de secuencia (p. ej., <400> 1, <400> 2, etc.). Esto es, SEC ID NO: 1 como se detalla en la memoria descriptiva se correlaciona con la secuencia indicada como <400> 1 en la lista de secuencias.

10 Un aspecto de la presente invención se refiere a un método para escrutar la aparición o la predisposición a la aparición o el control de una neoplasia de intestino grueso en un individuo, comprendiendo dicho método la evaluación del estado de metilación de una región de ADN seleccionada entre:

(i) la región definida por una o más de las coordenadas Hg19 y 2kb aguas arriba del sitio de inicio de la transcripción:

- | | |
|-----------------------------------|-----------------------------------|
| (1) chr12:52400748..52409671 | (34) chr10:101292690..101296281 |
| (2) chr5:3596168..3601517 | (35) chr4:4190530..4228621 |
| (3) chr13:95361876..95364389 | (36) chr12:54943404..54973023 |
| (4) chr4:81187742..81212171 | (37) chr5:176047210..176057557 |
| (5) chr19:57019212..57040270 | (38) chr12:22346325..22487648 |
| (6) chr3:33191537..33260707 | (39) chr19:56894648..56904889 |
| (7) chr15:60296421..60298142 | (40) chr20:21491648..21494664 |
| (8) chr13:28494168..28500451 | (41) chr1:50883225..50889141 |
| (9) chr7:96649702..96654143, | (42) chr7:27180996..27183287 |
| (10) chr8:140,811,770-141,537,860 | (43) chr11:2016406..2019065 |
| (11) chr5:2746279..2751769 | (44) chr14:57267425..57277184 |
| (12) chr18:55102917..55158530 | (45) chr4:126237567..126414087 |
| (13) chr20:37353101..37358016 | (46) chr8:23559964..23563922 |
| (14) chr8:2792875..4852328 | (47) chr10:131633547..131762091 |
| (15) chr16:66613351..66622178 | (48) chr4:62362839..62938168 |
| (16) chr5:37815753..37839782 | (49) chr1:47901689..47906363 |
| (17) chr1:63788730..63790797 | (50) chr17:77768176..77770890 |
| (18) chr15:37156644..37178734 | (51) chr17:93598762..93604831 |
| (19) chr7:27139973..27142394 | (52) chr1:33789224..33841194 |
| (20) chr20:21686297..21696620 | (53) chr9:124,004,679-124,030,840 |
| (21) chr16:51169886..51185183 | (54) chr4:158141736..158287227 |
| (22) chr12:85253267..85306606 | (55) chr12:9445136..9462559 |
| (23) chr8:6357172..6420784 | (56) chr12:24964278..25102308 |
| (24) chr14:85996488..86094270 | (57) chrX:21542357..21690352 |
| (25) chr2:182541194..182545381 | (58) chr20:52769988..52790516 |
| (26) chr7:30951468..30965131 | (59) chr3:172162951..172166203 |
| (27) chr8:131792547..132052835 | (60) chr13:28366780..28368089 |
| (28) chr3:128749292..128759583 | (61) chr7:50344378..50472799 |
| (29) chr10:101088856..101154087 | (62) chr7:149412148..149431664 |
| (30) chr7:27282164..27286192 | (63) chr7:24323809..24331477 |
| (31) chr10:129535538..129539450 | (64) chr4:30722037..31148421 |
| (32) chr19:49316274..49339934 | (65) chr10:47083534..47088320 |
| (33) chr6:391752..411443; o | |

(ii) la región del gen, que incluye 2kb aguas arriba de uno o más cualesquiera de:

(1) GRASP	(18) ANGPT2	(35) NKX2-6	(52) HOXA5
(2) IRX1	(19) LHX6	(36) PAX1	(53) GDNF
(3) SOX21	(20) NEUROD1	(37) FOXD2	(54) FAT4
(4) FGF5	(21) AC149644.1	(38) SLC6A15	(55) HOXA2
(5) ZNF471	(22) CCDC48	(39) PHC2	(56) LPHN3
(6) SUSD5	(23) EVX1	(40) FLRT2	(57) ADCYAP1
(7) FOXB1	(24)GHSR	(41) GATA2	(58) GRIA2
(8) PDX1	(25)HSD17B14	(42) ADCY8	(59) AQP1
(9) DLX5	(26) KRBA1	(43) CNNM1	(60) BCAT1
(10) ONECUT2	(27) OTOP1	(44) IKZF1	(61) CYP24A1
(11) DMRTA2	(28) PPYR1	(45) NKX2-3	(62) FOXI2
(12) CMTM2	(29) SRMS	(46) PCDH7	(63) GSX1
(13) OTX2	(30) ZNF582	(47) SNCB	(64) IRF4
(14) LOC145845	(31)IRX2	(48) ST8SIA1	(65) NPY
(15) EBF3	(32) CSMD1	(49) TRAPPC9	(66) PDE1B
(16) SALL1	(33) MIR675,H19	(50) NKX2-2	
(17) CBX8	(34) FOXD3	(51) SLC32A1	

en una muestra biológica de dicho individuo en donde un nivel más alto de metilación de las regiones de ADN del grupo (i) y/o (ii) con respecto a los niveles de control es indicativo de una neoplasia de intestino grueso o una predisposición a la aparición de un estado neoplásico del intestino grueso.

- 5 En otro aspecto se proporciona un método de escrutinio para determinar la aparición o predisposición a la aparición o el control de una neoplasia de intestino grueso en un individuo, comprendiendo dicho método evaluar el estado de metilación de una región de ADN seleccionada entre:

(i) la región definida por una o más cualesquiera de las coordenadas Hg19 y 2kb aguas arriba del sitio de inicio de la transcripción:

(1) chr12:52400748..52409671	(6) chr3:33191537..33260707
(2) chr5:3596168..3601517	(7) chr15:60296421..60298142
(3) chr13:95361876..95364389	(8) chr13:28494168..28500451
(4) chr4:81187742..81212171	(9) chr7:96649702..96654143
(5) chr19:57019212..57040270	

10

(ii) la región del gen, que incluye 2kb aguas arriba de uno o más cualesquiera de:

(1) GRASP	(4) FGF5	(6) SUSD5	(8) PDX1
(2) IRX1	(5) ZNF471	(7) FOXB1	(9) DLX5
(3) SOX21			

en una muestra biológica de dicho individuo en donde un nivel más alto de metilación de las regiones de ADN del grupo (i) y/o (ii) con respecto a los niveles de control es indicativo de una neoplasia de intestino grueso o una predisposición a la aparición de un estado neoplásico del intestino grueso.

15

Las subregiones que se ha determinado que exhiben una utilidad particular se enumeran a continuación con referencia al gen y la región cromosómica dentro de las cuales se encuentran:

- (1) Chr12:52400748-52409671 (GRASP) subregiones Chr12:52399672-52399922 (SEQ ID NO:15), Chr12:52400821-52401119 (SEQ ID NO:16) and Chr12:52401407-52401664 (SEQ ID NO:17).
- (2) Chr8:97505882-97624037 (SDC2) subregiones Chr8:97506813-97507045 (SEQ ID NO:18) and Chr8:97507037-97507257 (SEQ ID NO:19).
- (3) Chr13:110959094-110959330 (SEQ ID NO:20) (COL4A1).

20

- (4) Chr5:3596168-3601517 (IRX1) subregiones Chr5:3597227-3597480 (SEQ ID NO:21), Chr5:3599990-3600175 (SEQ ID NO:22), Chr5:3600160-3600352 (SEQ ID NO:23) and Chr5:3594657-3594847 (SEQ ID NO:24).
- (5) Chr13:95361879-95364389 (SOX21) subregiones Chr13:95364013-95364178 (SEQ ID NO:25) and Chr13:95364515-95364784 (SEQ ID NO:26).
- (6) Chr4:81187742-81212171 (FGF5) subregiones Chr4:81186918-81187228 (SEQ ID NO:27), Chr4:81187326-81187578 (SEQ ID NO:28) and Chr4:81187571-81187792 (SEQ ID NO:29).
- (7) Chr19:57019212-57040269 (ZNF471) subregiones Chr19:57018955-57019135 (SEQ ID NO:30) and Chr19:57019294-57019573 (SEQ ID NO:31).
- (8) Chr3:33191537-33260707 (SUSD5) subregion Chr3:33260566-33260818 (SEQ ID NO:32).
- (9) Chr2:56093097-56151298 (EFEMP1) subregion Chr2:56150356-56150606 (SEQ ID NO:33).
- (10) Chr6:134210259-134216675 (TCF21) subregiones Chr6:134210545-134210749 (SEQ ID NO:34), Chr6:134210712-134210951 (SEQ ID NO:35) and Chr6:134210994-134211274 (SEQ ID NO:36).
- (11) Chr7:94023873-94060544 (COL1A2) subregiones Chr7:94023751-94023975 (SEQ ID NO:37) and Chr7:94024141-94024345 (SEQ ID NO:38).
- (12) Chr15:60296421-60298142 (FOXB1) subregiones Chr15:60296522-60296719 (SEQ ID NO:39) and Chr15:60297024-60297305 (SEQ ID NO:40).
- (13) Chr16:86544133-86548070 (FOXF1) subregiones Chr16:86544560-86544770 (SEQ ID NO:41), Chr16:86544265-86544584 (SEQ ID NO:42) and Chr16:86544795-86545110 (SEQ ID NO:43).
- (14) Chr13:28494168-28500451 (PDX1) subregiones Chr13:28502100-28502311 (SEQ ID NO:44), Chr13:28502417-28502603 (SEQ ID NO:45) and Chr13:28503006-28503210 (SEQ ID NO:46).
- (15) Chr7:96649702-96654143 (DLX5) subregiones Chr7:96650026-96650127 (SEQ ID NO:47), Chr7:96651454-96651618 (SEQ ID NO:48) and Chr7:96653553-96653732 (SEQ ID NO:49).
- (16) Chr21:28208606-28217728 (ADAMTS1) subregiones Chr21:28217946-28218109 (SEQ ID NO:50), Chr21:28218494-28218777 (SEQ ID NO:51) and Chr21:28218859-28219017 (SEQ ID NO:52).
- (17) Chr13:110959631-111165373 (COL4A2) subregiones Chr13:110960787-110961141 (SEQ ID NO:53); Chr13:110961331-110961659 (SEQ ID NO:54) and Chr13:110959932-110960181 (SEQ ID NO:82);
- (18) Chr5:83238126-83680611 (EDIL3) subregiones Chr5:83679544-83679807 (SEQ ID NO:55), Chr5:83679784-83679988 (SEQ ID NO:56), Chr5:83679960-83680263 (SEQ ID NO:57), Chr5:83680075-83680383 (SEQ ID NO:58) and Chr5:83680356-83680630 (SEQ ID NO:59).
- (19) Chr15:48700503-48937985 (FBN1) subregion Chr15:48938136-48938384 (SEQ ID NO:60).
- (20) Chr1:47901689-47906363 (FOXD2) subregiones Chr1:47899091-47899337 (SEQ ID NO:61) and Chr1:47909944-47910172 (SEQ ID NO:62).
- (21) Chr2:66662532-66799891 (MEIS1) subregiones Chr2:66662009-66662219 (SEQ ID NO:63) and Chr2:66662177-66662430 (SEQ ID NO:64).
- (22) Chr16:55513081-55540586 (MMP2) subregiones Chr16:55512662-55512856 (SEQ ID NO:65) and Chr16:55513916-55514215 (SEQ ID NO:66).
- (23) Chr7:24323807-24331484 (NPY) subregiones Chr7:24323765-24323936 (SEQ ID NO:67), Chr7:24324150-24324342 (SEQ ID NO:68) and Chr7:24324513-24324717 (SEQ ID NO:69).
- (24) Chr19:38741877-38747172 (PPP1R14A) subregiones Chr19:38747251-38747424 (SEQ ID NO:70) and Chr19:38746653-38746912 (SEQ ID NO:71).

En otra realización más, se proporciona un método para escrutar la aparición o la predisposición a la aparición o el control de una neoplasia de intestino grueso en un individuo, comprendiendo dicho método evaluar la metilación de uno o más residuos de citosina seleccionados entre:

Chr12:52400748-52409671 (GRASP)

Chr12:52399713	Chr12:52399731	Chr12:52399749	Chr12:52399783
Chr12:52399796	Chr12:52399808	Chr12:52399823	Chr12:52399835
Chr12:52399891			

Chr12:52400847	Chr12:52400850	Chr12:52400859	Chr12:52400866
Chr12:52400869	Chr12:52400873	Chr12:52400881	Chr12:52400886
Chr12:52400893	Chr12:52400895	Chr12:52400899	Chr12:52400902
Chr12:52400907	Chr12:52400913	Chr12:52400919	Chr12:52400932
Chr12:52400938	Chr12:52400958	Chr12:52400962	Chr12:52400971
Chr12:52400973	Chr12:52400976	Chr12:52400998	Chr12:52401008
Chr12:52401010	Chr12:52401012	Chr12:52401016	Chr12:52401019
Chr12:52401025	Chr12:52401041	Chr12:52401044	Chr12:52401053
Chr12:52401060	Chr12:52401064	Chr12:52401092	Chr12:52401118

ES 2 707 341 T3

Chr12:52401438	Chr12:52401448	Chr12:52401460	Chr12:52401465
Chr12:52401474	Chr12:52401477	Chr12:52401479	Chr12:52401483
Chr12:52401504	Chr12:52401514	Chr12:52401523	Chr12:52401540
Chr12:52401553	Chr12:52401576	Chr12:52401588	Chr12:52401595
Chr12:52401599	Chr12:52401604	Chr12:52401606	Chr12:52401634
Chr12:52401640	Chr12:52401644	Chr12:52401659	
<i>Chr8:97505882-97624037 (SDC2)</i>			
Chr8:97506843	Chr8:97506845	Chr8:97506861	Chr8:97506876
Chr8:97506902	Chr8:97506909	Chr8:97506911	Chr8:97506913
Chr8:97506924	Chr8:97506932	Chr8:97506934	Chr8:97506940
Chr8:97506977	Chr8:97506993	Chr8:97507005	Chr8:97507008
Chr8:97507014			
Chr8:97507038	Chr8:97507061	Chr8:97507064	Chr8:97507078
Chr8:97507082	Chr8:97507084	Chr8:97507089	Chr8:97507119
Chr8:97507128	Chr8:97507136	Chr8:97507144	Chr8:97507153
Chr8:97507162	Chr8:97507214	Chr8:97507216	
<i>Chr13:110959094-110959330 (COL4A1).</i>			
Chr13:97507038	Chr13:97507061	Chr13:97507064	Chr13:97507078
Chr13:97507082	Chr13:97507084	Chr13:97507089	Chr13:97507119
Chr13:97507128	Chr13:97507136	Chr13:97507144	Chr13:97507153
Chr13:97507162	Chr13:97507214	Chr13:97507216	
<i>Chr5:3596168-3601517 (IRX1)</i>			
Chr5:3597229	Chr5:3597299	Chr5:3597311	Chr5:3597321
Chr5:3597330	Chr5:3597350	Chr5:3597352	Chr5:3597373
Chr5:3597413	Chr5:3597427	Chr5:3597431	Chr5:3597447
Chr5:3597450	Chr5:3597454	Chr5:3597456	
Chr5:3599998	Chr5:3600019	Chr5:3600037	Chr5:3600050
Chr5:3600058	Chr5:3600061	Chr5:3600070	Chr5:3600074
Chr5:3600076	Chr5:3600079	Chr5:3600089	Chr5:3600091
Chr5:3600104	Chr5:3600116	Chr5:3600121	Chr5:3600124
Chr5:3600131	Chr5:3600143	Chr5:3600149	Chr5:3600169
Chr5:3600173			
Chr5:3600163	Chr5:3600190	Chr5:3600201	Chr5:3600205
Chr5:3600208	Chr5:3600214	Chr5:3600250	Chr5:3600252
Chr5:3600255	Chr5:3600264	Chr5:3600270	Chr5:3600284
Chr5:3600309	Chr5:3600318	Chr5:3600345	
Chr5:3594663	Chr5:3594679	Chr5:3594684	Chr5:3594697
Chr5:3594703	Chr5:3594711	Chr5:3594725	Chr5:3594738
Chr5:3594745	Chr5:3594758	Chr5:3594768	Chr5:3594774
Chr5:3594778	Chr5:3594794	Chr5:3594799	Chr5:3594818
Chr5:3594840			

ES 2 707 341 T3

Chr13:95361879-95364389 (SOX21)

Chr13:95364016	Chr13:95364019	Chr13:95364042	Chr13:95364050
Chr13:95364054	Chr13:95364061	Chr13:95364064	Chr13:95364074
Chr13:95364080	Chr13:95364082	Chr13:95364106	Chr13:95364119
Chr13:95364123	Chr13:95364125	Chr13:95364128	Chr13:95364141
Chr13:95364163	Chr13:95364171		

Chr13:95364543	Chr13:95364545	Chr13:95364548	Chr13:95364551
Chr13:95364560	Chr13:95364571	Chr13:95364582	Chr13:95364584
Chr13:95364587	Chr13:95364602	Chr13:95364623	Chr13:95364627
Chr13:95364640	Chr13:95364649	Chr13:95364653	Chr13:95364656
Chr13:95364665	Chr13:95364684	Chr13:95364696	Chr13:95364712
Chr13:95364729	Chr13:95364732	Chr13:95364734	Chr13:95364748
Chr13:95364751			

Chr4:81187742-8121271 (FGF5)

Chr4:81186919	Chr4:81186947	Chr4:81186964	Chr4:81186968
Chr4:81186973	Chr4:81186975	Chr4:81186983	Chr4:81187001
Chr4:81187011	Chr4:81187041	Chr4:81187056	Chr4:81187062
Chr4:81187093	Chr4:81187116	Chr4:81187125	Chr4:81187161
Chr4:81187191	Chr4:81187196	Chr4:81187198	

Chr4:81187367	Chr4:81187389	Chr4:81187458	Chr4:81187467
Chr4:81187495	Chr4:81187498	Chr4:81187504	Chr4:81187512
Chr4:81187514	Chr4:81187530	Chr4:81187539	Chr4:81187547
Chr4:81187549	Chr4:81187551	Chr4:81187554	Chr4:81187556
Chr4:81187575			

Chr4:81187575	Chr4:81187592	Chr4:81187601	Chr4:81187605
Chr4:81187610	Chr4:81187648	Chr4:81187652	Chr4:81187679
Chr4:81187685	Chr4:81187691	Chr4:81187693	Chr4:81187707
Chr4:81187712	Chr4:81187733	Chr4:81187735	Chr4:81187752
Chr4:81187758	Chr4:81187764	Chr4:81187784	

Chr19:57019212-57040269 (ZNF471)

Chr19:57018990	Chr19:57018994	Chr19:57019003	Chr19:57019010
Chr19:57019018	Chr19:57019020	Chr19:57019025	Chr19:57019029
Chr19:57019044	Chr19:57019047	Chr19:57019067	Chr19:57019073
Chr19:57019084	Chr19:57019101	Chr19:57019118	

Chr19:57019315	Chr19:57019321	Chr19:57019346	Chr19:57019351
Chr19:57019355	Chr19:57019361	Chr19:57019364	Chr19:57019366
Chr19:57019371	Chr19:57019373	Chr19:57019385	Chr19:57019387
Chr19:57019405	Chr19:57019428	Chr19:57019433	Chr19:57019435
Chr19:57019437	Chr19:57019443	Chr19:57019451	Chr19:57019456
Chr19:57019463	Chr19:57019465	Chr19:57019470	Chr19:57019483
Chr19:57019487	Chr19:57019492	Chr19:57019502	Chr19:57019505

Chr3:33191537-33260707 (SUSD5)

ES 2 707 341 T3

Chr19:57019212-57040269 (ZNF471)

Chr3:33260601	Chr3:33260621	Chr3:33260631	Chr3:33260640
Chr3:33260651	Chr3:33260665	Chr3:33260676	Chr3:33260694
Chr3:33260698	Chr3:33260711	Chr3:33260715	Chr3:33260732
Chr3:33260742	Chr3:33260748	Chr3:33260755	Chr3:33260760
Chr3:33260769	Chr3:33260776	Chr3:33260778	Chr3:33260780
Chr3:33260788	Chr3:33260806		

Chr2:56093097-56151298 (EFEMP1)

Chr2:56150376	Chr2:56150389	Chr2:56150394	Chr2:56150415
Chr2:56150419	Chr2:56150423	Chr2:56150433	Chr2:56150473
Chr2:56150475	Chr2:56150478	Chr2:56150499	Chr2:56150537
Chr2:56150549	Chr2:56150580	Chr2:56150601	

Chr6:134210259-134216675 (TCF21)

Chr6:134210556	Chr6:134210598	Chr6:134210615	Chr6:134210640
Chr6:134210649	Chr6:134210667	Chr6:134210692	Chr6:134210694
Chr6:134210697	Chr6:134210720	Chr6:134210745	

Chr6:134210720	Chr6:134210745	Chr6:134210776	Chr6:134210781
Chr6:134210784	Chr6:134210790	Chr6:134210792	Chr6:134210794
Chr6:134210800	Chr6:134210806	Chr6:134210812	Chr6:134210868
Chr6:134210894	Chr6:134210906	Chr6:134210919	Chr6:134210946
Chr6:134211050	Chr6:134211061	Chr6:134211076	Chr6:134211081
Chr6:134211103	Chr6:134211110	Chr6:134211121	Chr6:134211125
Chr6:134211131	Chr6:134211153	Chr6:134211155	Chr6:134211162
Chr6:134211179	Chr6:134211182	Chr6:134211184	Chr6:134211208
Chr6:134211210	Chr6:134211212	Chr6:134211218	Chr6:134211220
Chr6:134211227	Chr6:134211233	Chr6:134211241	Chr6:134211245
Chr6:134211247	Chr6:134211270		

Chr7:94023873-94060544 (COL1A2)

Chr7:94024172	Chr7:94024191	Chr7:94024214	Chr7:94024230
Chr7:94024254	Chr7:94024266	Chr7:94024268	Chr7:94024272
Chr7:94024288	Chr7:94024291	Chr7:94024310	

Chr15:60296421-60298142 (FOXB1)

Chr15:60296555	Chr15:60296561	Chr15:60296563	Chr15:60296578
Chr15:60296585	Chr15:60296598	Chr15:60296601	Chr15:60296614
Chr15:60296616	Chr15:60296619	Chr15:60296627	Chr15:60296633
Chr15:60296639	Chr15:60296643	Chr15:60296647	Chr15:60296654
Chr15:60296665	Chr15:60296668	Chr15:60296670	Chr15:60296675
Chr15:60296679	Chr15:60296684	Chr15:60296689	Chr15:60296694

Chr15:60297035	Chr15:60297050	Chr15:60297053	Chr15:60297109
Chr15:60297118	Chr15:60297121	Chr15:60297126	Chr15:60297128
Chr15:60297130	Chr15:60297152	Chr15:60297169	Chr15:60297174
Chr15:60297178	Chr15:60297185	Chr15:60297192	Chr15:60297203
Chr15:60297212	Chr15:60297221	Chr15:60297228	Chr15:60297252
Chr15:60297266	Chr15:60297273	Chr15:60297298	

ES 2 707 341 T3

Chr16:86544133-86548070 (FOXF1)

Chr16:86544571	Chr16:86544587	Chr16:86544590	Chr16:86544593
Chr16:86544597	Chr16:86544599	Chr16:86544601	Chr16:86544608
Chr16:86544624	Chr16:86544652	Chr16:86544658	Chr16:86544675
Chr16:86544685	Chr16:86544699	Chr16:86544703	Chr16:86544706
Chr16:86544714	Chr16:86544720	Chr16:86544735	Chr16:86544745
Chr16:86544763			

Chr16:86544268	Chr16:86544273	Chr16:86544295	Chr16:86544298
Chr16:86544305	Chr16:86544308	Chr16:86544312	Chr16:86544321
Chr16:86544337	Chr16:86544339	Chr16:86544346	Chr16:86544377
Chr16:86544384	Chr16:86544391	Chr16:86544416	Chr16:86544431
Chr16:86544460	Chr16:86544464	Chr16:86544477	Chr16:86544484
Chr16:86544518	Chr16:86544523	Chr16:86544547	Chr16:86544552
Chr16:86544559	Chr16:86544571		

Chr16:86544810	Chr16:86544832	Chr16:86544835	Chr16:86544843
Chr16:86544853	Chr16:86544859	Chr16:86544862	Chr16:86544865
Chr16:86544867	Chr16:86544870	Chr16:86544874	Chr16:86544877
Chr16:86544885	Chr16:86544892	Chr16:86544900	Chr16:86544907
Chr16:86544915	Chr16:86544928	Chr16:86544931	Chr16:86544934
Chr16:86544951	Chr16:86544955	Chr16:86544958	Chr16:86544966
Chr16:86544972	Chr16:86544975	Chr16:86544978	Chr16:86544987
Chr16:86544993	Chr16:86544996	Chr16:86545000	Chr16:86545002
Chr16:86545005	Chr16:86545015	Chr16:86545018	Chr16:86545060
Chr16:86545062	Chr16:86545078	Chr16:86545092	

Chr13:28494168-28500451 (PDX1)

Chr13:28502109	Chr13:28502153	Chr13:28502161	Chr13:28502177
Chr13:28502179	Chr13:28502191	Chr13:28502198	Chr13:28502205
Chr13:28502207	Chr13:28502210	Chr13:28502245	Chr13:28502309

Chr13:28502442	Chr13:28502449	Chr13:28502461	Chr13:28502464
Chr13:28502475	Chr13:28502507	Chr13:28502512	Chr13:28502538
Chr13:28502544	Chr13:28502549	Chr13:28502559	Chr13:28502564
Chr13:28502585			

Chr13:28503045	Chr13:28503049	Chr13:28503081	Chr13:28503099
Chr13:28503114	Chr13:28503127	Chr13:28503138	Chr13:28503147
Chr13:28503155	Chr13:28503157	Chr13:28503179	

Chr7:96649702-96654143 (DLX5)

Chr7:96650062	Chr7:96650072	Chr7:96650078	Chr7:96650096
Chr7:96650099	Chr7:96650102		

Chr7:96651485	Chr7:96651488	Chr7:96651518	Chr7:96651523
Chr7:96651532	Chr7:96651535	Chr7:96651537	Chr7:96651542
Chr7:96651550	Chr7:96651586		

ES 2 707 341 T3

Chr7:96653596	Chr7:96653605	Chr7:96653607	Chr7:96653617
Chr7:96653620	Chr7:96653623	Chr7:96653644	Chr7:96653656
Chr7:96653683	Chr7:96653686	Chr7:96653692	Chr7:96653698
Chr7:96653701			
<i>Chr21:28208606-28217728 (ADAMTS1)</i>			
Chr21:28217973	Chr21:28218002	Chr21:28218015	Chr21:28218018
Chr21:28218047	Chr21:28218051	Chr21:28218057	Chr21:28218072
Chr21:28218074	Chr21:28218084	Chr21:28218105	
Chr21:28218514	Chr21:28218516	Chr21:28218550	Chr21:28218568
Chr21:28218579	Chr21:28218586	Chr21:28218596	Chr21:28218635
Chr21:28218638	Chr21:28218646	Chr21:28218671	Chr21:28218684
Chr21:28218688	Chr21:28218704	Chr21:28218729	Chr21:28218741
Chr21:28218893	Chr21:28218906	Chr21:28218914	Chr21:28218916
Chr21:28218928	Chr21:28218934	Chr21:28218938	Chr21:28218949
Chr21:28218953	Chr21:28218959	Chr21:28218974	Chr21:28218976
Chr21:28218978	Chr21:28218984	Chr21:28218986	Chr21:28218996
Chr21:28219008	Chr21:28219016		
<i>Chr13:110959631-111165373 (COL4A2)</i>			
Chr13:110960813	Chr13:110960827	Chr13:110960849	Chr13:110960875
Chr13:110960925	Chr13:110960930	Chr13:110960938	Chr13:110960978
Chr13:110961001	Chr13:110961003	Chr13:110961025	Chr13:110961045
Chr13:110961049	Chr13:110961069	Chr13:110961072	Chr13:110961088
Chr13:110961091	Chr13:110961095	Chr13:110961110	Chr13:110961116
Chr13:110961131	Chr13:110960786		
Chr13:110961358	Chr13:110961386	Chr13:110961404	Chr13:110961406
Chr13:110961445	Chr13:110961579	Chr13:110961594	Chr13:110961606
Chr13:110961631			
Chr13:110959935	Chr13:110959965	Chr13:110959968	Chr13:110959974
Chr13:110959979	Chr13:110959981	Chr13:110959986	Chr13:110959988
Chr13:110959997	Chr13:110959999	Chr13:110960004	Chr13:110960006
Chr13:110960011	Chr13:110960027	Chr13:110960035	Chr13:110960046
Chr13:110960051	Chr13:110960071	Chr13:110960099	Chr13:110960108
Chr13:110960115	Chr13:110960156	Chr13:110960180	
<i>Chr5:83238126-83680611 (EDIL3)</i>			
Chr5:83679825	Chr5:83679827	Chr5:83679836	Chr5:83679843
Chr5:83679846	Chr5:83679860	Chr5:83679864	Chr5:83679883
Chr5:83679894	Chr5:83679900	Chr5:83679906	Chr5:83679910
Chr5:83679937	Chr5:83679953	Chr5:83679957	Chr5:83679961
Chr5:83679976	Chr5:83679982	Chr5:83679987	Chr5:83680003
Chr5:83680007	Chr5:83680011	Chr5:83680026	Chr5:83680032
Chr5:83680086	Chr5:83680090	Chr5:83680103	Chr5:83680106

ES 2 707 341 T3

Chr5:83680122	Chr5:83680126		
Chr5:83679546	Chr5:83679568	Chr5:83679571	Chr5:83679585
Chr5:83679602	Chr5:83679617	Chr5:83679630	Chr5:83679640
Chr5:83679667	Chr5:83679675	Chr5:83679689	Chr5:83679693
Chr5:83679699	Chr5:83679701	Chr5:83679733	
Chr5:83679973	Chr5:83679989	Chr5:83679992	Chr5:83680001
Chr5:83680003	Chr5:83680006	Chr5:83680012	Chr5:83680015
Chr5:83680019	Chr5:83680033	Chr5:83680036	Chr5:83680045
Chr5:83680051	Chr5:83680061	Chr5:83680063	Chr5:83680066
Chr5:83680108	Chr5:83680115	Chr5:83680118	Chr5:83680132
Chr5:83680147	Chr5:83680159	Chr5:83680174	Chr5:83680181
Chr5:83680185	Chr5:83680198	Chr5:83680205	Chr5:83680209
Chr5:83680217	Chr5:83680232	Chr5:83680235	Chr5:83680237
Chr5:83680253			
Chr5:83680108	Chr5:83680115	Chr5:83680118	Chr5:83680132
Chr5:83680147	Chr5:83680159	Chr5:83680174	Chr5:83680181
Chr5:83680185	Chr5:83680198	Chr5:83680205	Chr5:83680209
Chr5:83680217	Chr5:83680232	Chr5:83680235	Chr5:83680237
Chr5:83680253	Chr5:83680264	Chr5:83680284	Chr5:83680310
Chr5:83680326	Chr5:83680355		
Chr5:83680401	Chr5:83680406	Chr5:83680409	Chr5:83680411
Chr5:83680413	Chr5:83680430	Chr5:83680438	Chr5:83680441
Chr5:83680444	Chr5:83680458	Chr5:83680463	Chr5:83680474
Chr5:83680483	Chr5:83680485	Chr5:83680488	Chr5:83680492
Chr5:83680497	Chr5:83680499	Chr5:83680507	Chr5:83680509
Chr5:83680513	Chr5:83680518	Chr5:83680529	Chr5:83680531
Chr5:83680548	Chr5:83680559	Chr5:83680564	Chr5:83680568
Chr5:83680572	Chr5:83680579	Chr5:83680589	Chr5:83680591
Chr5:83680593	Chr5:83680596	Chr5:83680602	
<i>Chr15:48700503-48937985 (FBN1)</i>			
Chr15:48938149	Chr15:48938163	Chr15:48938172	Chr15:48938181
Chr15:48938183	Chr15:48938218	Chr15:48938236	Chr15:48938238
Chr15:48938254	Chr15:48938267	Chr15:48938273	Chr15:48938280
Chr15:48938291	Chr15:48938349		
<i>Chr1:47901689-47906363 (FOXD2)</i>			
Chr1:47899102	Chr1:47899126	Chr1:47899129	Chr1:47899143
Chr1:47899152	Chr1:47899168	Chr1:47899184	Chr1:47899205
Chr1:47899212	Chr1:47899230	Chr1:47899232	Chr1:47899253
Chr1:47899286	Chr1:47899327		
Chr1:47909988	Chr1:47909995	Chr1:47910005	Chr1:47910036
Chr1:47910051	Chr1:47910056	Chr1:47910062	Chr1:47910074

ES 2 707 341 T3

Chr1:47910103	Chr1:47910122	Chr1:47910137	Chr1:47910142
Chr1:47910144	Chr1:47910146		
<i>Chr2:66662532-66799891 (MEIS1)</i>			
Chr2:66662043	Chr2:66662047	Chr2:66662049	Chr2:66662063
Chr2:66662073	Chr2:66662107	Chr2:66662111	Chr2:66662124
Chr2:66662145	Chr2:66662156	Chr2:66662161	Chr2:66662163
Chr2:66662178	Chr2:66662218		
Chr2:66662178	Chr2:66662218	Chr2:66662220	Chr2:66662246
Chr2:66662265	Chr2:66662280	Chr2:66662306	Chr2:66662310
Chr2:66662323	Chr2:66662333	Chr2:66662337	
<i>Chr16:55513081-55540586 (MMP2)</i>			
Chr16:55512695	Chr16:55512711	Chr16:55512732	Chr16:55512750
Chr16:55512753	Chr16:55512793		
Chr16:55513961	Chr16:55513997	Chr16:55514025	Chr16:55514059
Chr16:55514061	Chr16:55514092	Chr16:55514120	Chr16:55514131
Chr16:55514158	Chr16:55514205		
<i>Chr7:24323807-24331484 (NPY)</i>			
Chr7:24323767	Chr7:24323792	Chr7:24323794	Chr7:24323799
Chr7:24323817	Chr7:24323834	Chr7:24323840	Chr7:24323844
Chr7:24323848	Chr7:24323866	Chr7:24323876	Chr7:24323880
Chr7:24323882	Chr7:24323884	Chr7:24323894	Chr7:24323905
Chr7:24323910	Chr7:24323930	Chr7:24323934	
Chr7:24324180	Chr7:24324186	Chr7:24324206	Chr7:24324217
Chr7:24324222	Chr7:24324225	Chr7:24324244	Chr7:24324249
Chr7:24324251	Chr7:24324268	Chr7:24324274	Chr7:24324280
Chr7:24324311	Chr7:24324313		
Chr7:24324549	Chr7:24324570	Chr7:24324592	Chr7:24324595
Chr7:24324597	Chr7:24324599	Chr7:24324621	Chr7:24324625
Chr7:24324633	Chr7:24324635	Chr7:24324668	Chr7:24324672
Chr7:24324676	Chr7:24324679	Chr7:24324683	Chr7:24324690
<i>Chr19:38741877-38747172 (PPP1R14A)</i>			
Chr19:38747280	Chr19:38747296	Chr19:38747300	Chr19:38747313
Chr19:38747319	Chr19:38747322	Chr19:38747328	Chr19:38747334
Chr19:38747355	Chr19:38747361	Chr19:38747371	Chr19:38747382
Chr19:38747389	Chr19:38747410		
Chr19:38746654	Chr19:38746680	Chr19:38746690	Chr19:38746701
Chr19:38746715	Chr19:38746726	Chr19:38746728	Chr19:38746732
Chr19:38746749	Chr19:38746759	Chr19:38746770	Chr19:38746784
Chr19:38746786	Chr19:38746804	Chr19:38746808	Chr19:38746811
Chr19:38746826	Chr19:38746834	Chr19:38746837	Chr19:38746849
Chr19:38746852	Chr19:38746865	Chr19:38746871	Chr19:38746873

Chr19:38746875

Chr19:38746877

Chr19:38746882

Chr19:38746898

5

o una citosina correspondiente en la posición n + 1 en la hebra de ADN opuesta, en una muestra biológica de dicho individuo en donde un nivel más alto de metilación de uno o más de dichos residuos con respecto al nivel de metilación de un residuo correspondiente en una muestra de control es indicativo de una neoplasia de intestino grueso o una predisposición a la aparición de un estado neoplásico.

En otro aspecto más, la presente invención está dirigida a un método para escrutar la aparición o la predisposición a la aparición o controlar una neoplasia de intestino grueso en un individuo, comprendiendo dicho método evaluar el nivel de expresión de una región de ADN seleccionada entre:

(i) la región definida por una o más de las coordenadas Hg19 y 2kb aguas arriba del sitio de inicio de la transcripción:

- | | |
|-----------------------------------|-----------------------------------|
| (1) chr12:52400748..52409671 | (34) chr10:101292690..101296281 |
| (2) chr5:3596168..3601517 | (35) chr4:4190530..4228621 |
| (3) chr13:95361876..95364389 | (36) chr12:54943404..54973023 |
| (4) chr4:81187742..81212171 | (37) chr5:176047210..176057557 |
| (5) chr19:57019212..57040270 | (38) chr12:22346325..22487648 |
| (6) chr3:33191537..33260707 | (39) chr19:56894648..56904889 |
| (7) chr15:60296421..60298142 | (40) chr20:21491648..21494664 |
| (8) chr13:28494168..28500451 | (41) chr1:50883225..50889141 |
| (9) chr7:96649702..96654143, | (42) chr7:27180996..27183287 |
| (10) chr8:140,811,770-141,537,860 | (43) chr11:2016406..2019065 |
| (11) chr5:2746279..2751769 | (44) chr14:57267425..57277184 |
| (12) chr18:55102917..55158530 | (45) chr4:126237567..126414087 |
| (13) chr20:37353101..37358016 | (46) chr8:23559964..23563922 |
| (14) chr8:2792875..4852328 | (47) chr10:131633547..131762091 |
| (15) chr16:66613351..66622178 | (48) chr4:62362839..62938168 |
| (16) chr5:37815753..37839782 | (49) chr1:47901689..47906363 |
| (17) chr1:63788730..63790797 | (50) chr17:77768176..77770890 |
| (18) chr15:37156644..37178734 | (51) chr17:93598762..93604831 |
| (19) chr7:27139973..27142394 | (52) chr1:33789224..33841194 |
| (20) chr20:21686297..21696620 | (53) chr9:124,004,679-124,030,840 |
| (21) chr16:51169886..51185183 | (54) chr4:158141736..158287227 |
| (22) chr12:85253267..85306606 | (55) chr12:9445136..9462559 |
| (23) chr8:6357172..6420784 | (56) chr12:24964278..25102308 |
| (24) chr14:85996488..86094270 | (57) chrX:21542357..21690352 |
| (25) chr2:182541194..182545381 | (58) chr20:52769988..52790516 |
| (26) chr7:30951468..30965131 | (59) chr3:172162951..172166203 |
| (27) chr8:131792547..132052835 | (60) chr13:28366780..28368089 |
| (28) chr3:128749292..128759583 | (61) chr7:50344378..50472799 |
| (29) chr10:101088856..101154087 | (62) chr7:149412148..149431664 |
| (30) chr7:27282164..27286192 | (63) chr7:24323809..24331477 |
| (31) chr10:129535538..129539450 | (64) chr4:30722037..31148421 |
| (32) chr19:49316274..49339934 | (65) chr10:47083534..47088320 |
| (33) chr6:391752..411443 | |

10

(ii) la región del gen, que incluye 2kb aguas arriba de uno o más cualesquiera de:

- | | | | |
|-----------|-------------|-------------|------------|
| (1) GRASP | (18) ANGPT2 | (35) NKX2-6 | (52) HOXA5 |
|-----------|-------------|-------------|------------|

(2) IRX1	(19) LHX6	(36) PAX1	(53) GDNF
(3) SOX21	(20) NEUROD1	(37) FOXD2	(54) FAT4
(4) FGF5	(21) AC149644.1	(38) SLC6A15	(55) HOXA2
(5) ZNF471	(22) CCDC48	(39) PHC2	(56) LPHN3
(6) SUSD5	(23) EVX1	(40) FLRT2	(57) ADCYAP1
(7) FOXB1	(24)GHSR	(41) GATA2	(58) GRIA2
(8) PDX1	(25)HSD17B14	(42) ADCY8	(59) AQP1
(9) DLX5	(26) KRBA1	(43) CNNM1	(60) BCAT1
(10) ONECUT2	(27) OTOP1	(44) IKZF1	(61)CYP24A1
(11) DMRTA2	(28) PPYR1	(45) NKX2-3	(62) FOXI2
(12) CMTM2	(29) SRMS	(46) PCDH7	(63) GSX1
(13) OTX2	(30) ZNF582	(47) SNCB	(64) IRF4
(14) LOC145845	(31)IRX2	(48) ST8SIA1	(65) NPY
(15) EBF3	(32) CSMD1	(49) TRAPPC9	(66) PDE1B
(16) SALL1	(33) MIR675,H19	(50) NKX2-2	
(17) CBX8	(34) FOXD3	(51) SLC32A1	

en una muestra biológica de dicho individuo en donde un nivel inferior de expresión de las regiones de ADN del grupo (i) y/o (ii) con respecto a los niveles de control es indicativo de una neoplasia de intestino grueso o una predisposición a la aparición de un estado neoplásico. Un aspecto relacionado de la presente invención proporciona una matriz molecular, cuya matriz comprende una pluralidad de:

- (i) moléculas de ácido nucleico que comprenden una secuencia de nucleótidos correspondiente a uno o más cualesquiera de los ADN marcadores neoplásicos descritos anteriormente o una secuencia que muestra al menos 80% de identidad o un derivado, fragmento, variante u homólogo funcionales de dicha molécula de ácido nucleico; o
- (ii) moléculas de ácido nucleico que comprenden una secuencia de nucleótidos capaz de hibridar con una o más de las secuencias de (i) en condiciones de rigurosidad media o un derivado, fragmento, variante u homólogo funcionales de dicha molécula de ácido nucleico; o
- (iii) sondas de ácido nucleico u oligonucleótidos que comprenden una secuencia de nucleótidos capaz de hibridar con una o más de las secuencias de (i) en condiciones de rigurosidad media o un derivado, fragmento, variante u homólogo funcionales de dicha molécula de ácido nucleico; o
- (iv) sondas capaces de unirse a una o más de las proteínas codificadas por las moléculas de ácido nucleico de (i) o un derivado, fragmento o homólogo de las mismas,

en donde el nivel de expresión de dichos genes marcadores de (i) o proteínas de (iv) es indicativo del estado neoplásico de una célula o subpoblación celular obtenida a partir del intestino grueso.

Breve descripción de los dibujos

Las Figuras 1 y 2 representan los gráficos de metilación diferencial para los genes que se muestran en la Tabla 3 y 4, respectivamente. Las coordenadas cromosómicas de las regiones en mosaico se muestran en el eje X. Las posiciones de los sitios de restricción TaqI y MspI se indican mediante líneas verticales discontinuas. En el eje Y se muestran (escala log2) las intensidades de hibridación. En una columna sobre cada posición de la sonda se representan las señales de las fracciones metiladas de los ADN normales y cancerosos (GN y GT, respectivamente) y sus fracciones desmetiladas (AN y AT, respectivamente). Las "diferencias dobles" (GT-GN) - (AT-AN), que representan la metilación diferencial entre cáncer y normal, se muestran como DD en color negro para sondas la puntuación de calidad más alta del 17%, como DD en color gris para las que están en el 43% superior y como puntos de color gris para aquellas sondas con puntuaciones de calidad más bajas o que se encuentran más allá de los 300 pb desde un sitio de restricción TaqI o MspI. Todos los puntos de la sonda DD están circundados para mayor claridad.

Las Figuras 3-27 muestran los perfiles de metilación del ADN obtenidos a partir del análisis de secuencia de bisulfito de uno o más amplicones de 24 genes. En cada figura, el recuadro superior muestra las coordenadas cromosómicas del gen (secuencia Hg19) y de los amplicones individuales. Los gráficos de metilación del ADN muestran la fracción de citosina metilada (eje Y) en cada sitio CpG según se determina mediante análisis de secuencia. Las posiciones

de cada sitio CpG dentro de los amplicones se muestran en el eje X. Los puntos de color gris individuales representan fracciones de metilación en cada sitio CpG para los 10 ADN del cáncer; la metilación media de las diez muestras se presenta mediante la línea continua de color gris y el rango intercuartil mediante el área sombreada. De manera similar, la fracción de metilación de las muestras de ADN normales se muestra mediante puntos negros, la metilación media y el rango intercuartil por la línea negra y el área negra sombreada respectivamente. La fracción de metilación en el ADN de la sangre se muestra mediante una línea discontinua de color gris claro (que a menudo se ve oscurecida por los datos de metilación para el ADN de tejido normal). Las figuras también incluyen la región de secuencia para cada amplicón de PCR, antes de la modificación con bisulfito. En algunos casos, se han diseñado para la cadena inferior con respecto a la dirección de la transcripción del gen y estos están etiquetados como BS. Los pictogramas en la parte inferior de las figuras muestran las posiciones cromosómicas de los genes y mapas que muestran la localización y la estructura del exón de los transcritos de genes, la localización de los conjuntos de sondas Affymetrix U133 Plus y la localización de las islas CpG, así como la localización de las diferentes regiones amplificadas.

Descripción detallada de la invención

La presente invención se basa, en parte, en la elucidación del estado de metilación del ADN que caracteriza las neoplasias del intestino grueso. Este hallazgo ahora ha facilitado el desarrollo de medios rutinarios de escrutinio de la aparición o predisposición a la aparición o el seguimiento de una neoplasia de intestino grueso basado en el aumento de la metilación de ciertos genes con respecto a los niveles de control.

De acuerdo con la presente invención, se ha determinado que ciertos genes están modulados, en términos de cambios diferenciales en sus niveles de metilación, dependiendo de si la célula en cuestión es neoplásica o no. Se debe entender que los genes en cuestión se describen en la presente memoria tanto por referencia a su nombre como por sus coordenadas cromosómicas. Las coordenadas cromosómicas de las regiones en mosaico de las matrices en mosaico del promotor de Nimblegen son compatibles con la versión Hg18 de la base de datos del genoma humano (referidas en la presente memoria como "coordenadas Hg18" y se detallan en las Tablas 3 y 4). En la medida en que se enumeran las coordenadas cromosómicas correspondientes a los nombres de los genes, estas son coherentes con la versión de la base de datos del genoma humano Hg19, que se publicó en febrero de 2009 (en la presente memoria referidas como "coordenadas Hg19").

Por consiguiente, un aspecto de la presente invención se refiere a un método para escrutar la aparición o la predisposición a la aparición o el seguimiento de una neoplasia de intestino grueso en un individuo, comprendiendo dicho método evaluar el estado de metilación de una región de ADN seleccionada entre:

(i) la región definida por una o más de las coordenadas Hg19 y 2kb aguas arriba del sitio de inicio de la transcripción:

- | | |
|-----------------------------------|-----------------------------------|
| (1) chr12:52400748..52409671 | (34) chr10:101292690..101296281 |
| (2) chr5:3596168..3601517 | (35) chr4:4190530..4228621 |
| (3) chr13:95361876..95364389 | (36) chr12:54943404..54973023 |
| (4) chr4:81187742..81212171 | (37) chr5:176047210..176057557 |
| (5) chr19:57019212..57040270 | (38) chr12:22346325..22487648 |
| (6) chr3:33191537..33260707 | (39) chr19:56894648..56904889 |
| (7) chr15:60296421..60298142 | (40) chr20:21491648..21494664 |
| (8) chr13:28494168..28500451 | (41) chr1:50883225..50889141 |
| (9) chr7:96649702..96654143, | (42) chr7:27180996..27183287 |
| (10) chr8:140,811,770-141,537,860 | (43) chr11:2016406..2019065 |
| (11) chr5:2746279..2751769 | (44) chr14:57267425..57277184 |
| (12) chr18:55102917..55158530 | (45) chr4:126237567..126414087 |
| (13) chr20:37353101..37358016 | (46) chr8:23559964..23563922 |
| (14) chr8:2792875..4852328 | (47) chr10:131633547..131762091 |
| (15) chr16:66613351..66622178 | (48) chr4:62362839..62938168 |
| (16) chr5:37815753..37839782 | (49) chr1:47901689..47906363 |
| (17) chr1:63788730..63790797 | (50) chr17:77768176..77770890 |
| (18) chr15:37156644..37178734 | (51) chr17:93598762..93604831 |
| (19) chr7:27139973..27142394 | (52) chr1:33789224..33841194 |
| (20) chr20:21686297..21696620 | (53) chr9:124,004,679-124,030,840 |
| (21) chr16:51169886..51185183 | (54) chr4:158141736..158287227 |

(22) chr12:85253267..85306606	(55) chr12:9445136..9462559
(23) chr8:6357172..6420784	(56) chr12:24964278..25102308
(24) chr14:85996488..86094270	(57) chrX:21542357..21690352
(25) chr2:182541194..182545381	(58) chr20:52769988..52790516
(26) chr7:30951468..30965131	(59) chr3:172162951..172166203
(27) chr8:131792547..132052835	(60) chr13:28366780..28368089
(28) chr3:128749292..128759583	(61) chr7:50344378..50472799
(29) chr10:101088856..101154087	(62) chr7:149412148..149431664
(30) chr7:27282164..27286192	(63) chr7:24323809..24331477
(31) chr10:129535538..129539450	(64) chr4:30722037..31148421
(32) chr19:49316274..49339934	(65) chr10:47083534..47088320
(33) chr6:391752..411443; o	

(ii) la región del gen, que incluye 2kb aguas arriba de uno o más cualesquiera de:

(1) GRASP	(18) ANGPT2	(35) NKX2-6	(52) HOXA5
(2) IRX1	(19) LHX6	(36) PAX1	(53) GDNF
(3) SOX21	(20) NEUROD1	(37) FOXD2	(54) FAT4
(4) FGF5	(21) AC149644.1	(38) SLC6A15	(55) HOXA2
(5) ZNF471	(22) CCDC48	(39) PHC2	(56) LPHN3
(6) SUSP5	(23) EVX1	(40) FLRT2	(57) ADCYAP1
(7) FOXB1	(24) GHSR	(41) GATA2	(58) GRIA2
(8) PDX1	(25) HSD17B14	(42) ADCY8	(59) AQP1
(9) DLX5	(26) KRBA1	(43) CNNM1	(60) BCAT1
(10) ONECUT2	(27) OTOP1	(44) IKZF1	(61) CYP24A1
(11) DMRTA2	(28) PPYR1	(45) NKX2-3	(62) FOXI2
(12) CMTM2	(29) SRMS	(46) PCDH7	(63) GSX1
(13) OTX2	(30) ZNF582	(47) SNCB	(64) IRF4
(14) LOC145845	(31) IRX2	(48) ST8SIA1	(65) NPY
(15) EBF3	(32) CSMD1	(49) TRAPPC9	(66) PDE1B
(16) SALL1	(33) MIR675,H19	(50) NKX2-2	
(17) CBX8	(34) FOXD3	(51) SLC32A1	

5 en una muestra biológica de dicho individuo en donde un nivel más alto de metilación de las regiones de ADN del grupo (i) y/o (ii) con respecto a los niveles de control es indicativo de una gran neoplasia del intestino o una predisposición a la aparición de un estado neoplásico del intestino grueso.

La referencia a "intestino grueso" debe entenderse como una referencia a una célula derivada de una de las ocho regiones anatómicas del intestino grueso, regiones que comienzan después de la región terminal del íleon, que son:

- | | | |
|----|-------|-------------------------|
| | (i) | el ciego; |
| 10 | (ii) | el colon ascendente; |
| | (iii) | el colon transversal; |
| | (iv) | el colon descendente; |
| | (v) | el colon sigmoide; |
| | (vi) | el recto; |
| 15 | (vii) | la flexión esplénica; y |

(viii) la flexión hepática.

La referencia a "neoplasia" debe entenderse como una referencia a una lesión, tumor u otra masa encapsulada o no encapsulada u otra forma de crecimiento que comprende células neoplásicas. Una "célula neoplásica" debe entenderse como una referencia a una célula que muestra un crecimiento anormal. El término "crecimiento" debe entenderse en su sentido más amplio e incluye referencias a la proliferación. En este sentido, un ejemplo de crecimiento celular anormal es la proliferación descontrolada de una célula. Otro ejemplo es la apoptosis fallida en una célula, prolongando así su vida útil habitual. La célula neoplásica puede ser una célula benigna o una célula maligna. En una realización preferida, la neoplasia del sujeto es un adenoma o un adenocarcinoma. Sin limitar la presente invención a ninguna teoría o modo de acción, un adenoma es generalmente un tumor benigno de origen epitelial que deriva del tejido epitelial o muestra estructuras epiteliales claramente definidas. Estas estructuras pueden adquirir una apariencia glandular. Puede comprender una población de células malignas dentro del adenoma, como ocurre con la progresión de un adenoma benigno o lesión neoplásica benigna a un adenocarcinoma maligno.

Preferiblemente, dicha célula neoplásica es un adenoma o adenocarcinoma e incluso más preferiblemente un adenoma o adenocarcinoma colorrectal.

La referencia a "región de ADN" debe entenderse como una referencia a una sección específica del ADN genómico. Estas regiones de ADN se especifican mediante la referencia a un nombre de gen o un conjunto de coordenadas cromosómicas. Tanto los nombres de los genes como las coordenadas cromosómicas serían bien conocidos y comprendidos por el experto en la técnica. Tal como se detalla aquí anteriormente, las coordenadas cromosómicas para las regiones analizadas en matrices de colocación en mosaico del promotor de Nimblegen corresponden a la versión Hg18 del genoma, mientras que las que describen el símbolo del gen asociado corresponden a la versión Hg19 del genoma. En general, un gen puede identificarse rutinariamente mediante la referencia a su nombre, a través del cual se pueden obtener sus secuencias como su localización cromosómica, o mediante la referencia a sus coordenadas cromosómicas, a través de las cuales se pueden obtener de forma rutinaria tanto el nombre del gen como su secuencia.

La referencia a cada uno de los genes/regiones de ADN detallados anteriormente se debe considerar como una referencia a todas las formas de estas moléculas y a los fragmentos o variantes de las mismas. Como apreciaría el experto en la técnica, se sabe que algunos genes exhiben variación alélica entre individuos o polimorfismos de un solo nucleótido. Los SNP abarcan inserciones y deleciones de tamaño variable y repeticiones de secuencias simples, tales como las repeticiones de dinucleótidos y trinucleótidos. Las variantes incluyen secuencias de ácido nucleico de la misma región que comparten al menos 90%, 95%, 98%, 99% de identidad de secuencia, es decir, que tienen una o más deleciones, adiciones, sustituciones, secuencias invertidas, etc. con respecto a las regiones de ADN descritas en la presente memoria. Por consiguiente, se debe entender que la presente invención se extiende a tales variantes que, en términos de las presentes aplicaciones de diagnóstico, logran el mismo resultado a pesar del hecho de que pueden existir pequeñas variaciones genéticas entre las secuencias reales de ácido nucleico entre individuos. Por lo tanto, se debe entender que la presente invención se extiende a todas las formas de ADN que surgen de cualquier otra mutación, variación polimórfica o alélica.

Se debe entender que el "individuo" que es el sujeto de la prueba puede ser cualquier mamífero humano o no humano. Los ejemplos de mamíferos no humanos incluyen primates, ganado (p. ej., caballos, vacas, ovejas, cerdos, burros), animales de laboratorio (p. ej., ratones, ratas, conejos, cobayas), animales de compañía (p. ej., perros, gatos) y animales en cautiverio (ej. ciervos, zorros).

Preferiblemente el mamífero es un ser humano.

El panel de genes que se ha identificado demuestra un aumento de la metilación en las células neoplásicas del intestino grueso con respecto a las células no neoplásicas correspondientes. Este aumento de la metilación, en algunos casos, se localiza en unos pocos sitios CpG específicos dentro de la región del ADN, mientras que en otros casos se observa en una amplia gama de sitios CpG. Sin embargo, aunque las regiones específicas de todos los genes muestran un aumento en la metilación y, por lo tanto, son marcadores de diagnóstico útiles, varios de estos genes proporcionan una sensibilidad y especificidad particularmente buenas, ya sea porque se observa una metilación elevada en una mayor proporción de neoplasias o debido a su mayor diferencia en el nivel de metilación del ADN entre el tejido neoplásico y el tejido de colon normal o los leucocitos de sangre periférica.

Según esta realización, se proporciona un método para escrutar la aparición o la predisposición a la aparición o el seguimiento de una neoplasia de intestino grueso en un individuo, comprendiendo dicho método evaluar el estado de metilación de una región de ADN seleccionada entre:

(i) la región definida por una o más de las coordenadas Hg19 y 2kb aguas arriba del sitio de inicio de la transcripción:

(1) chr12:52400748..52409671

(6) chr3:33191537..33260707

(2) chr5:3596168..3601517

(7) chr15:60296421..60298142

(3) chr13:95361876..95364389

(8) chr13:28494168..28500451

(4) chr4:81187742..81212171

(9) chr7:96649702..96654143

(5) chr19:57019212..57040270

(ii) la región del gen, que incluye 2kb aguas arriba de uno o más cualesquiera de:

(1) GRASP

(4) FGF5

(6) SUSD5

(8) PDX1

(2) IRX1

(5) ZNF471

(7) FOXB1

(9) DLX5

(3) SOX21

5 en una muestra biológica de dicho individuo en donde un nivel más alto de metilación de las regiones de ADN del grupo (i) y/o (ii) con respecto a los niveles de control es indicativo de una neoplasia de intestino grueso o una predisposición a la aparición de un estados neoplásico en el intestino grueso.

De acuerdo con estos aspectos, en otra realización más, dicho nivel de control es un nivel no neoplásico.

Según estos aspectos de la presente invención, dicho tejido de intestino grueso es preferiblemente tejido colorrectal.

En otra realización más, la neoplasia es maligna, tal como un carcinoma.

10 En una realización adicional, la neoplasia no es maligna, tal como un adenoma. Sin limitar la presente invención a ninguna teoría o modo de acción, aunque la medición de los niveles de metilación en estas regiones de ADN es diagnóstica de una afección neoplásica del intestino grueso, se ha determinado que las subregiones discretas son particularmente útiles a este respecto, ya que estas subregiones contienen una alta densidad de dinucleótidos CpG que con frecuencia están hipermetilados en neoplasias del intestino grueso, tales como los cánceres colorrectales.

15 Para este fin, también se ha determinado que en el contexto de otras 15 regiones de ADN que se sabía anteriormente estaban reguladas a la baja en términos de su nivel de expresión en el contexto de las neoplasias del intestino grueso, de hecho, existen subregiones discretas que exhiben una densidad particularmente alta de dinucleótidos CpG hipermetilados. Este hallazgo convierte estas subregiones en un objetivo particularmente útil para el análisis, ya que simplifica el proceso de escrutinio debido a una región más corta y claramente definida del ADN

20 que requiere análisis y, adicionalmente, al hecho de que los resultados de estas regiones proporcionarán un resultado significativamente más definitivo con respecto a la presencia, o no, de hipermetilación del que se obtendría si el análisis se realizara en la región del ADN en su conjunto. Por lo tanto, este hallazgo simplifica el proceso de escrutinio y aumenta la sensibilidad y especificidad del diagnóstico de neoplasia de intestino grueso.

25 Las subregiones que se ha determinado que muestran una utilidad particular se enumeran a continuación con referencia al gen y la región cromosómica dentro de las cuales se encuentran:

- (1) Chr12:52400748-52409671 (GRASP) subregiones Chr12:52399672-52399922 (SEQ ID NO:15), Chr12:52400821-52401119 (SEQ ID NO:16) y Chr12:52401407-52401664 (SEQ ID NO:17).
- (2) Chr8:97505882-97624037 (SDC2) subregiones Chr8:97506813-97507045 (SEQ ID NO:18) y Chr8:97507037-97507257 (SEQ ID NO:19).
- 30 (3) Chr13:110959094-110959330 (SEQ ID NO:20) (COL4A1).
- (4) Chr5:3596168-3601517 (IRX1) subregiones Chr5:3597227-3597480 (SEQ ID NO:21), Chr5:3599990-3600175 (SEQ ID NO:22), Chr5:3600160-3600352 (SEQ ID NO:23) y Chr5:3594657-3594847 (SEQ ID NO:24).
- 35 (5) Chr13:95361879-95364389 (SOX21) subregiones Chr13:95364013-95364178 (SEQ ID NO:25) y Chr13:95364515-95364784 (SEQ ID NO:26).
- (6) Chr4:81187742-81212171 (FGF5) subregiones Chr4:81186918-81187228 (SEQ ID NO:27), Chr4:81187326-81187578 (SEQ ID NO:28) y Chr4:81187571-81187792 (SEQ ID NO:29).
- (7) Chr19:57019212-57040269 (ZNF471) subregiones Chr19:57018955-57019135 (SEQ ID NO:30) y Chr19:57019294-57019573 (SEQ ID NO:31).
- 40 (8) Chr3:33191537-33260707 (SUSD5) subregion Chr3:33260566-33260818 (SEQ ID NO:32).
- (9) Chr2:56093097-56151298 (EFEMP1) subregion Chr2:56150356-56150606 (SEQ ID NO:33).
- (10) Chr6:134210259-134216675 (TCF21) subregiones Chr6:134210545-134210749 (SEQ ID NO:34), Chr6:134210712-134210951 (SEQ ID NO:35) y Chr6:134210994-134211274 (SEQ ID NO:36).
- 45 (11) Chr7:94023873-94060544 (COL1A2) subregiones Chr7:94023751-94023975 (SEQ ID NO:37) y Chr7:94024141-94024345 (SEQ ID NO:38).
- (12) Chr15:60296421-60298142 (FOXB1) subregiones Chr15:60296522-60296719 (SEQ ID NO:39) y Chr15:60297024-60297305 (SEQ ID NO:40).
- (13) Chr16:86544133-86548070 (FOXF1) subregiones Chr16:86544560-86544770 (SEQ ID NO:41), Chr16:86544265-86544584 (SEQ ID NO:42) y Chr16:86544795-86545110 (SEQ ID NO:43).

- (14) Chr13:28494168-28500451 (PDX1) subregiones Chr13:28502100-28502311 (SEQ ID NO:44), Chr13:28502417-28502603 (SEQ ID NO:45) y Chr13:28503006-28503210 (SEQ ID NO:46).
- (15) Chr7:96649702-96654143 (DLX5) subregiones Chr7:96650026-96650127 (SEQ ID NO:47), Chr7:96651454-96651618 (SEQ ID NO:48) y Chr7:96653553-96653732 (SEQ ID NO:49).
- 5 (16) Chr21:28208606-28217728 (ADAMTS1) subregiones Chr21:28217946-28218109 (SEQ ID NO:50), Chr21:28218494-28218777 (SEQ ID NO:51) and Chr21:28218859-28219017 (SEQ ID NO:52).
- (17) Chr13:110959631-111165373 (COL4A2) subregiones Chr13:110960787-110961141 (SEQ ID NO:53); Chr13:110961331-110961659 (SEQ ID NO:54) y Chr13:110959932-110960181 (SEQ ID NO:82);
- 10 (18) Chr5:83238126-83680611 (EDIL3) subregiones Chr5:83679544-83679807 (SEQ ID NO:55), Chr5:83679784-83679988 (SEQ ID NO:56), Chr5:83679960-83680263 (SEQ ID NO:57), Chr5:83680075-83680383 (SEQ ID NO:58) y Chr5:83680356-83680630 (SEQ ID NO:59).
- (19) Chr15:48700503-48937985 (FBN1) subregion Chr15:48938136-48938384 (SEQ ID NO:60).
- (20) Chr1:47901689-47906363 (FOXD2) subregiones Chr1:47899091-47899337 (SEQ ID NO:61) y Chr1:47909944-47910172 (SEQ ID NO:62).
- 15 (21) Chr2:66662532-66799891 (MEIS1) subregiones Chr2:66662009-66662219 (SEQ ID NO:63) y Chr2:66662177-66662430 (SEQ ID NO:64).
- (22) Chr16:55513081-55540586 (MMP2) subregiones Chr16:55512662-55512856 (SEQ ID NO:65) y Chr16:55513916-55514215 (SEQ ID NO:66).
- 20 (23) Chr7:24323807-24331484 (NPY) subregiones Chr7:24323765-24323936 (SEQ ID NO:67), Chr7:24324150-24324342 (SEQ ID NO:68) y Chr7:24324513-24324717 (SEQ ID NO:69).
- (24) Chr19:38741877-38747172 (PPP1R14A) subregiones Chr19:38747251-38747424 (SEQ ID NO:70) y Chr19:38746653-38746912 (SEQ ID NO:71).

25 Según esta realización, por lo tanto, se proporciona un método para escrutar la aparición o la predisposición a la aparición o el seguimiento de una neoplasia de intestino grueso en un individuo, comprendiendo dicho método evaluar el estado de metilación de una o más regiones de ADN seleccionadas entre las regiones definidas por las coordenadas Hg19:

- | | |
|-------------------------------|--------------------------------|
| (1) Chr12:52399672-52399922 | (30) Chr13:28502100-28502311 |
| (2) Chr12:52400821-52401119 | (31) Chr13:28502417-28502603 |
| (3) Chr12:52401407-52401664 | (32) Chr13:28503006-28503210 |
| (4) Chr8:97506813-97507045 | (33) Chr7:96650026-96650127 |
| (5) Chr8:97507037-97507257 | (34) Chr7:96651454-96651618 |
| (6) Chr13:110959094-110959330 | (35) Chr7:96653553-96653732 |
| (7) Chr5:3597227-3597480 | (36) Chr21:28217946-28218109 |
| (8) Chr5:3599990-3600175 | (37) Chr21:28218494-28218777 |
| (9) Chr5:3600160-3600352 | (38) Chr21:28218859-28219017 |
| (10) Chr5:3594657-3594847 | (39) Chr13:110960787-110961141 |
| (11) Chr13:95364013-95364178 | (40) Chr13:110961331-110961659 |
| (12) Chr13:95364515-95364784 | (41) Chr5:83679544-83679807 |
| (13) Chr4:81186918-81187228 | (42) Chr5:83679784-83679988 |
| (14) Chr4:81187326-81187578 | (43) Chr5:83679960-83680263 |
| (15) Chr4:81187571-81187792 | (44) Chr5:83680075-83680383 |
| (16) Chr19:57018955-57019135 | (45) Chr5:83680356-83680630 |
| (17) Chr19:57019294-57019573 | (46) Chr15:48938136-48938384 |
| (18) Chr3:33260566-33260818 | (47) Chr1:47899091-47899337 |
| (19) Chr2:56150356-56150606 | (48) Chr1:47909944-47910172 |
| (20) Chr6:134210545-134210749 | (49) Chr2:66662009-66662219 |
| (21) Chr6:134210712-134210951 | (50) Chr2:66662177-66662430 |
| (22) Chr6:134210994-134211274 | (51) Chr16:55512662-55512856 |
| (23) Chr7:94023751-94023975 | (52) Chr16:55513916-55514215 |
| (24) Chr7:94024141-94024345 | (53) Chr7:24323765-24323936 |
| (25) Chr15:60296522-60296719 | (54) Chr7:24324150-24324342 |
| (26) Chr15:60297024-60297305 | (55) Chr7:24324513-24324717 |

(27)	Chr16:86544560-86544770	(56)	Chr19:38747251-38747424
(28)	Chr16:86544265-86544584	(57)	Chr19:38746653-38746912
(29)	Chr16:86544795-86545110	(58)	Chr13:110959932-110960181

en una muestra biológica de dicho individuo cuando un nivel más alto de metilación de dicha región de ADN con respecto a los niveles de control es indicativo de una neoplasia de intestino grueso o una predisposición a la aparición de un estado neoplásico del intestino grueso.

5 En otra realización, dicha célula neoplásica es un adenoma o adenocarcinoma e incluso más preferiblemente un adenoma o adenocarcinoma colorrectal.

10 En una realización concreta, por lo tanto, se proporciona un método para escrutar la aparición o la predisposición a la aparición o el seguimiento o el seguimiento de una neoplasia de intestino grueso en un individuo, comprendiendo dicho método evaluar el estado de metilación de una o más regiones de ADN seleccionadas entre las regiones definidas por coordenadas Hg19:

(1)	Chr12:52399672-52399922	(19)	Chr2:56150356-56150606
(2)	Chr12:52400821-52401119	(20)	Chr6:134210545-134210749
(3)	Chr12:52401407-52401664	(21)	Chr6:134210712-134210951
(4)	Chr8:97506813-97507045	(22)	Chr6:134210994-134211274
(5)	Chr8:97507037-97507257	(23)	Chr7:94023751-94023975
(6)	Chr13:110959094-110959330	(24)	Chr7:94024141-94024345
(7)	Chr5:3597227-3597480	(25)	Chr15:60296522-60296719
(8)	Chr5:3599990-3600175	(26)	Chr15:60297024-60297305
(9)	Chr5:3600160-3600352	(27)	Chr16:86544560-86544770
(10)	Chr5:3594657-3594847	(28)	Chr16:86544265-86544584
(11)	Chr13:95364013-95364178	(29)	Chr16:86544795-86545110
(12)	Chr13:95364515-95364784	(30)	Chr13:28502100-28502311
(13)	Chr4:81186918-81187228	(31)	Chr13:28502417-28502603
(14)	Chr4:81187326-81187578	(32)	Chr13:28503006-28503210
(15)	Chr4:81187571-81187792	(33)	Chr7:96650026-96650127
(16)	Chr19:57018955-57019135	(34)	Chr7:96651454-96651618
(17)	Chr19:57019294-57019573	(35)	Chr7:96653553-96653732
(18)	Chr3:33260566-33260818		

en una muestra biológica de dicho individuo cuando un nivel más alto de metilación de dicha región de ADN con respecto a los niveles de control es indicativo de una neoplasia de intestino grueso o una predisposición a la aparición de un estado neoplásico del intestino grueso.

15 En otra realización más, dichas regiones de ADN se seleccionan entre las regiones definidas por coordenadas Hg19:

(1)	Chr12:52399672-52399922	(18)	Chr3:33260566-33260818
(2)	Chr12:52400821-52401119	(19)	Chr2:56150356-56150606
(4)	Chr8:97506813-97507045	(20)	Chr6:134210545-134210749
(5)	Chr8:97507037-97507257	(21)	Chr6:134210712-134210951
(6)	Chr13:110959094-110959330	(24)	Chr7:94024141-94024345
(10)	Chr5:3594657-3594847	(25)	Chr15:60296522-60296719
(11)	Chr13:95364013-95364178	(26)	Chr15:60297024-60297305
(12)	Chr13:95364515-95364784	(28)	Chr16:86544265-86544584
(13)	Chr4:81186918-81187228	(30)	Chr13:28502100-28502311
(16)	Chr19:57018955-57019135	(31)	Chr13:28502417-28502603

(17) Chr19:57019294-57019573

(35) Chr7:96653553-96653732

En otra realización, dicha célula neoplásica es un adenoma o adenocarcinoma e incluso más preferiblemente un adenoma o adenocarcinoma colorrectal.

Sin limitar la presente invención a ninguna teoría o modo de acción, la metilación del ADN es universal en bacterias, plantas y animales. La metilación del ADN es un tipo de modificación química del ADN que es estable a lo largo de las rondas de división celular, pero no implica cambios en la secuencia de ADN subyacente del organismo. Las modificaciones de la cromatina y el ADN son dos características importantes de la epigenética y desempeñan un papel en el proceso de diferenciación celular, lo que permite que las células mantengan de forma estable diferentes características a pesar de contener el mismo material genómico. En los organismos eucarióticos, la metilación del ADN solo se produce en el carbono número 5 del anillo de pirimidina de la citosina. En los mamíferos, la metilación del ADN se produce principalmente en el carbono número 5 de la citosina de un dinucleótido CpG. Los dinucleótidos CpG comprenden aproximadamente 1% del genoma humano.

De 70 a 80% de todos los CpG están metilados. Los CpG pueden agruparse en agrupaciones denominadas "islas de CpG" que están presentes en las regiones reguladoras 5' de muchos genes y con frecuencia están desmetiladas. En muchos procesos patológicos tales como el cáncer, los promotores de genes y/o las islas CpG adquieren una hipermetilación anormal, que se asocia con un silenciamiento transcripcional hereditario. La metilación del ADN puede afectar a la transcripción de los genes de dos maneras. En primer lugar, la metilación del ADN puede impedir físicamente la unión de las proteínas transcripcionales al gen, bloqueando así la transcripción. En segundo lugar, el ADN metilado puede estar unido por proteínas conocidas como proteínas de dominio de unión a metil-CpG (MBD). Las proteínas MBD reclutan a continuación proteínas adicionales hacia el locus, tales como las histonas desacetilasas y otras proteínas remodeladoras de la cromatina que pueden modificar las histonas, formando así cromatina inactiva compacta denominada cromatina silenciosa. Este vínculo entre la metilación del ADN y la estructura de la cromatina es muy importante. En particular, la pérdida de la proteína 2 de unión a metil-CpG (MeCP2) se ha relacionado con el síndrome de Rett y la proteína 2 del dominio de unión a metil-CpG (MBD2) media el silenciamiento transcripcional de los genes hipermetilados en el cáncer.

En los seres humanos, el proceso de metilación del ADN es llevado a cabo mediante tres enzimas, la ADN metiltransferasa 1, 3a y 3b (DNMT1, DNMT3a, DNMT3b). Se cree que DNMT3a y DNMT3b son las metiltransferasas de novo que establecen los patrones de metilación del ADN en una etapa temprana del desarrollo. DNMT1 es la metiltransferasa de mantenimiento propuesta que es responsable de copiar los patrones de metilación del ADN a las hebras hijas durante la replicación del ADN. La DNMT3L es una proteína que es homóloga a las otras DNMT3 pero que no tiene actividad catalítica. En su lugar, DNMT3L ayuda a las metiltransferasas de novo al aumentar su capacidad de unirse al ADN y estimular su actividad. Finalmente, la DNMT2 se ha identificado como un homólogo de la ADN metiltransferasa "enigmático", que contiene los 10 motivos de secuencia comunes a todas las ADN metiltransferasas; sin embargo, DNMT2 puede no metilar el ADN, pero en cambio se ha demostrado que metila un ARN pequeño.

Por lo tanto, "estado de metilación" debe entenderse como una referencia a la presencia, ausencia y/o cantidad de metilación en un nucleótido, o nucleótidos concretos, dentro de una región de ADN. El estado de metilación de una secuencia de ADN concreta (p. ej., la región de ADN como se describe en la presente memoria) puede indicar el estado de metilación de cada base en la secuencia o puede indicar el estado de metilación de un subconjunto de los pares de bases (p. ej., de citosinas o el estado de metilación de una o más secuencias de reconocimiento de enzimas de restricción específicas) dentro de la secuencia, o puede indicar información sobre la densidad de metilación regional dentro de la secuencia sin proporcionar información precisa de dónde se produce la metilación en la secuencia. El estado de metilación se puede representar o indicar opcionalmente mediante un "valor de metilación". Se puede generar un valor de metilación, por ejemplo, cuantificando la cantidad de ADN intacto presente después de la digestión de restricción con una enzima de restricción dependiente de la metilación. En este ejemplo, si una secuencia concreta en el ADN se cuantifica utilizando una PCR cuantitativa, una cantidad de ADN molde aproximadamente igual a un control tratado de forma simulada indica que la secuencia no está altamente metilada mientras que una cantidad de molde sustancialmente menor a la que aparece en la muestra tratada de forma simulada indica la presencia de ADN metilado en la secuencia. Por consiguiente, un valor, es decir, un valor de metilación, por ejemplo, del ejemplo descrito anteriormente, representa el estado de metilación y, por lo tanto, puede utilizarse como un indicador cuantitativo del estado de metilación. Esto tiene un uso concreto cuando es deseable comparar el estado de metilación de una secuencia en una muestra con un valor umbral.

El método de la presente invención se basa en la comparación de los niveles de metilación de regiones de ADN específicas de una muestra biológica con los niveles de metilación de control de estas regiones de ADN. El "nivel de control" es el "nivel normal" que es el nivel de metilación de la región de ADN de una célula o de una población celular del intestino grueso correspondiente que no es neoplásica o en otra muestra biológica de la cual se puede aislar el ADN para su análisis.

El nivel de metilación normal (o "no neoplásico") se puede determinar utilizando tejidos no neoplásicos obtenidos del mismo individuo que es objeto de la prueba. Sin embargo, se apreciará que esto puede ser bastante invasivo para el

individuo en cuestión y, por lo tanto, es probable que sea más conveniente analizar los resultados de las pruebas con respecto a un resultado patrón que refleje los resultados individuales o colectivos obtenidos de individuos distintos del paciente en cuestión. Esta última forma de análisis es, de hecho, el método de análisis preferido, ya que permite el diseño de kits que requieren la recolección y análisis de una sola muestra biológica, que es una muestra de prueba de interés. Los resultados patrón que proporcionan el nivel de metilación normal se pueden calcular mediante cualquier medio adecuado que sea bien conocido por el experto en la técnica. Por ejemplo, una población de tejidos normales puede evaluarse en términos del nivel de metilación de los genes de la presente invención, proporcionando así un valor o un intervalo de valores patrón contra los cuales se analizan todas las muestras de prueba futuras. También se debe entender que el nivel normal se puede determinar a partir de los sujetos de una cohorte específica y para su uso con respecto a las muestras de prueba derivadas de esa cohorte. En consecuencia, se puede determinar una serie de valores o intervalos patrón que correspondan a cohortes que difieran con respecto a características tales como la edad, el género, la etnia o el estado de salud. Dicho "nivel normal" puede ser un nivel discreto o un intervalo de niveles. Un incremento en el nivel de metilación en los genes del sujeto con respecto a los niveles normales es indicativo de que el tejido es neoplásico.

El término "metilación" debe entenderse como la presencia de un grupo metilo añadido por la acción de una enzima ADN metiltransferasa a una o varias bases de citosina en una región de ácido nucleico, p. ej., ADN genómico. Como se describe en la presente memoria, existen varios métodos conocidos por los expertos en la técnica para determinar el nivel o grado de metilación del ácido nucleico.

Por "nivel más alto" se entiende que hay un número mayor de dinucleótidos CpG metilados en el sujeto diagnosticado que en una muestra de control, es decir, o bien la proporción de moléculas de ADN metiladas en un sitio CpG concreto es más alto o hay un mayor número de sitios CpG separados metilados en el sujeto. Se debe entender que los términos "mejorado" y "aumentado" se utilizan indistintamente con el término "más alto". La presente invención no está limitada por un número preciso de residuos metilados que se consideran diagnósticos de neoplasia en un sujeto, porque se producirá alguna variación entre las muestras de pacientes. La presente invención tampoco está limitada por la colocación del residuo metilado.

No obstante, también se han identificado varios residuos de citosina específicos que se someten a hipermetilación en estas subregiones. En otra realización, por lo tanto, se puede emplear un método de escrutinio que se dirige específicamente a evaluar el estado de metilación de uno o más de estos residuos o la citosina correspondiente en la posición $n + 1$ en la hebra de ADN opuesta.

Con este fin, a continuación se enumeran los residuos de citosina que se han identificado a este respecto. El experto en la técnica debe apreciar que estos residuos individuales están numerados mediante la referencia a Hg19, que también corresponde a la numeración de las subregiones específicas enumeradas aquí anteriormente y que pueden identificarse adicionalmente cuando se aplica la numeración de coordenadas para cada subregión a las secuencias de la subregión correspondientes que se proporcionan en la lista de secuencias. Se debe entender que estos residuos se han identificado en el contexto del ADN de la subregión. Sin embargo, aquí hay otros residuos que están hipermetilados fuera de las subregiones, pero dentro de la región de ADN más grande de la que se obtienen las subregiones. En consecuencia, estos residuos específicos representan un subconjunto particularmente útil de residuos de citosina individuales que sufren hipermetilación en el contexto de las regiones y subregiones de ADN descritas en la presente memoria. Estos residuos individuales se agrupan a continuación según la región de ADN en la que se producen. Estas regiones de ADN se identifican mediante la referencia tanto a las coordenadas cromosómicas Hg19 como al nombre de la región del gen.

Según esta realización, por lo tanto, se proporciona un método para escrutar la aparición o la predisposición a la aparición o el seguimiento de una neoplasia de intestino grueso en un individuo, comprendiendo dicho método evaluar la metilación de uno o más residuos de citosina seleccionados entre:

Chr12:52400748-52409671 (GRASP)

Chr12:52399713	Chr12:52399731	Chr12:52399749	Chr12:52399783
Chr12:52399796	Chr12:52399808	Chr12:52399823	Chr12:52399835
Chr12:52399891			

Chr12:52400847	Chr12:52400850	Chr12:52400859	Chr12:52400866
Chr12:52400869	Chr12:52400873	Chr12:52400881	Chr12:52400886
Chr12:52400893	Chr12:52400895	Chr12:52400899	Chr12:52400902
Chr12:52400907	Chr12:52400913	Chr12:52400919	Chr12:52400932
Chr12:52400938	Chr12:52400958	Chr12:52400962	Chr12:52400971
Chr12:52400973	Chr12:52400976	Chr12:52400998	Chr12:52401008
Chr12:52401010	Chr12:52401012	Chr12:52401016	Chr12:52401019

ES 2 707 341 T3

Chr12:52400748-52409671 (GRASP)

Chr12:52401025	Chr12:52401041	Chr12:52401044	Chr12:52401053
Chr12:52401060	Chr12:52401064	Chr12:52401092	Chr12:52401118

Chr12:52401438	Chr12:52401448	Chr12:52401460	Chr12:52401465
Chr12:52401474	Chr12:52401477	Chr12:52401479	Chr12:52401483
Chr12:52401504	Chr12:52401514	Chr12:52401523	Chr12:52401540
Chr12:52401553	Chr12:52401576	Chr12:52401588	Chr12:52401595
Chr12:52401599	Chr12:52401604	Chr12:52401606	Chr12:52401634
Chr12:52401640	Chr12:52401644	Chr12:52401659	

Chr8:97505882-97624037 (SDC2)

Chr8:97506843	Chr8:97506845	Chr8:97506861	Chr8:97506876
Chr8:97506902	Chr8:97506909	Chr8:97506911	Chr8:97506913
Chr8:97506924	Chr8:97506932	Chr8:97506934	Chr8:97506940
Chr8:97506977	Chr8:97506993	Chr8:97507005	Chr8:97507008
Chr8:97507014			

Chr8:97507038	Chr8:97507061	Chr8:97507064	Chr8:97507078
Chr8:97507082	Chr8:97507084	Chr8:97507089	Chr8:97507119
Chr8:97507128	Chr8:97507136	Chr8:97507144	Chr8:97507153
Chr8:97507162	Chr8:97507214	Chr8:97507216	

Chr13:110959094-110959330 (COL4A1).

Chr13:97507038	Chr13:97507061	Chr13:97507064	Chr13:97507078
Chr13:97507082	Chr13:97507084	Chr13:97507089	Chr13:97507119
Chr13:97507128	Chr13:97507136	Chr13:97507144	Chr13:97507153
Chr13:97507162	Chr13:97507214	Chr13:97507216	

Chr5:3596168-3601517 (IRX1)

Chr5:3597229	Chr5:3597299	Chr5:3597311	Chr5:3597321
Chr5:3597330	Chr5:3597350	Chr5:3597352	Chr5:3597373
Chr5:3597413	Chr5:3597427	Chr5:3597431	Chr5:3597447
Chr5:3597450	Chr5:3597454	Chr5:3597456	

Chr5:3599998	Chr5:3600019	Chr5:3600037	Chr5:3600050
Chr5:3600058	Chr5:3600061	Chr5:3600070	Chr5:3600074
Chr5:3600076	Chr5:3600079	Chr5:3600089	Chr5:3600091
Chr5:3600104	Chr5:3600116	Chr5:3600121	Chr5:3600124
Chr5:3600131	Chr5:3600143	Chr5:3600149	Chr5:3600169
Chr5:3600173			

Chr5:3600163	Chr5:3600190	Chr5:3600201	Chr5:3600205
Chr5:3600208	Chr5:3600214	Chr5:3600250	Chr5:3600252
Chr5:3600255	Chr5:3600264	Chr5:3600270	Chr5:3600284
Chr5:3600309	Chr5:3600318	Chr5:3600345	

Chr5:3594663	Chr5:3594679	Chr5:3594684	Chr5:3594697
Chr5:3594703	Chr5:3594711	Chr5:3594725	Chr5:3594738

ES 2 707 341 T3

Chr5:3594745	Chr5:3594758	Chr5:3594768	Chr5:3594774
Chr5:3594778	Chr5:3594794	Chr5:3594799	Chr5:3594818
Chr5:3594840			
<i>Chr13:95361879-95364389 (SOX21)</i>			
Chr13:95364016	Chr13:95364019	Chr13:95364042	Chr13:95364050
Chr13:95364054	Chr13:95364061	Chr13:95364064	Chr13:95364074
Chr13:95364080	Chr13:95364082	Chr13:95364106	Chr13:95364119
Chr13:95364123	Chr13:95364125	Chr13:95364128	Chr13:95364141
Chr13:95364163	Chr13:95364171		
Chr13:95364543	Chr13:95364545	Chr13:95364548	Chr13:95364551
Chr13:95364560	Chr13:95364571	Chr13:95364582	Chr13:95364584
Chr13:95364587	Chr13:95364602	Chr13:95364623	Chr13:95364627
Chr13:95364640	Chr13:95364649	Chr13:95364653	Chr13:95364656
Chr13:95364665	Chr13:95364684	Chr13:95364696	Chr13:95364712
Chr13:95364729	Chr13:95364732	Chr13:95364734	Chr13:95364748
Chr13:95364751			
<i>Chr4:81187742-81212171 (FGF5)</i>			
Chr4:81186919	Chr4:81186947	Chr4:81186964	Chr4:81186968
Chr4:81186973	Chr4:81186975	Chr4:81186983	Chr4:81187001
Chr4:81187011	Chr4:81187041	Chr4:81187056	Chr4:81187062
Chr4:81187093	Chr4:81187116	Chr4:81187125	Chr4:81187161
Chr4:81187191	Chr4:81187196	Chr4:81187198	
Chr4:81187367	Chr4:81187389	Chr4:81187458	Chr4:81187467
Chr4:81187495	Chr4:81187498	Chr4:81187504	Chr4:81187512
Chr4:81187514	Chr4:81187530	Chr4:81187539	Chr4:81187547
Chr4:81187549	Chr4:81187551	Chr4:81187554	Chr4:81187556
Chr4:81187575			
Chr4:81187575	Chr4:81187592	Chr4:81187601	Chr4:81187605
Chr4:81187610	Chr4:81187648	Chr4:81187652	Chr4:81187679
Chr4:81187685	Chr4:81187691	Chr4:81187693	Chr4:81187707
Chr4:81187712	Chr4:81187733	Chr4:81187735	Chr4:81187752
Chr4:81187758	Chr4:81187764	Chr4:81187784	
<i>Chr19:57019212-57040269 (ZNF471)</i>			
Chr19:57018990	Chr19:57018994	Chr19:57019003	Chr19:57019010
Chr19:57019018	Chr19:57019020	Chr19:57019025	Chr19:57019029
Chr19:57019044	Chr19:57019047	Chr19:57019067	Chr19:57019073
Chr19:57019084	Chr19:57019101	Chr19:57019118	
Chr19:57019315	Chr19:57019321	Chr19:57019346	Chr19:57019351
Chr19:57019355	Chr19:57019361	Chr19:57019364	Chr19:57019366
Chr19:57019371	Chr19:57019373	Chr19:57019385	Chr19:57019387
Chr19:57019405	Chr19:57019428	Chr19:57019433	Chr19:57019435
Chr19:57019437	Chr19:57019443	Chr19:57019451	Chr19:57019456

ES 2 707 341 T3

Chr19:57019212-57040269 (ZNF471)

Chr19:57019463	Chr19:57019465	Chr19:57019470	Chr19:57019483
Chr19:57019487	Chr19:57019492	Chr19:57019502	Chr19:57019505

Chr3:33191537-33260707 (SUSD5)

Chr3:33260601	Chr3:33260621	Chr3:33260631	Chr3:33260640
Chr3:33260651	Chr3:33260665	Chr3:33260676	Chr3:33260694
Chr3:33260698	Chr3:33260711	Chr3:33260715	Chr3:33260732
Chr3:33260742	Chr3:33260748	Chr3:33260755	Chr3:33260760
Chr3:33260769	Chr3:33260776	Chr3:33260778	Chr3:33260780
Chr3:33260788	Chr3:33260806		

Chr2:56093097-56151298 (EFEMP1)

Chr2:56150376	Chr2:56150389	Chr2:56150394	Chr2:56150415
Chr2:56150419	Chr2:56150423	Chr2:56150433	Chr2:56150473
Chr2:56150475	Chr2:56150478	Chr2:56150499	Chr2:56150537
Chr2:56150549	Chr2:56150580	Chr2:56150601	

Chr6:134210259-134216675 (TCF21)

Chr6:134210556	Chr6:134210598	Chr6:134210615	Chr6:134210640
Chr6:134210649	Chr6:134210667	Chr6:134210692	Chr6:134210694
Chr6:134210697	Chr6:134210720	Chr6:134210745	

Chr6:134210720	Chr6:134210745	Chr6:134210776	Chr6:134210781
Chr6:134210784	Chr6:134210790	Chr6:134210792	Chr6:134210794
Chr6:134210800	Chr6:134210806	Chr6:134210812	Chr6:134210868
Chr6:134210894	Chr6:134210906	Chr6:134210919	Chr6:134210946

Chr6:134211050	Chr6:134211061	Chr6:134211076	Chr6:134211081
Chr6:134211103	Chr6:134211110	Chr6:134211121	Chr6:134211125
Chr6:134211131	Chr6:134211153	Chr6:134211155	Chr6:134211162
Chr6:134211179	Chr6:134211182	Chr6:134211184	Chr6:134211208
Chr6:134211210	Chr6:134211212	Chr6:134211218	Chr6:134211220
Chr6:134211227	Chr6:134211233	Chr6:134211241	Chr6:134211245
Chr6:134211247	Chr6:134211270		

Chr7:94023873-94060544 (COL1A2)

Chr7:94024172	Chr7:94024191	Chr7:94024214	Chr7:94024230
Chr7:94024254	Chr7:94024266	Chr7:94024268	Chr7:94024272
Chr7:94024288	Chr7:94024291	Chr7:94024310	

Chr15:60296421-60298142 (FOXB1)

Chr15:60296555	Chr15:60296561	Chr15:60296563	Chr15:60296578
Chr15:60296585	Chr15:60296598	Chr15:60296601	Chr15:60296614
Chr15:60296616	Chr15:60296619	Chr15:60296627	Chr15:60296633
Chr15:60296639	Chr15:60296643	Chr15:60296647	Chr15:60296654
Chr15:60296665	Chr15:60296668	Chr15:60296670	Chr15:60296675
Chr15:60296679	Chr15:60296684	Chr15:60296689	Chr15:60296694

Chr15:60297035	Chr15:60297050	Chr15:60297053	Chr15:60297109
Chr15:60297118	Chr15:60297121	Chr15:60297126	Chr15:60297128

ES 2 707 341 T3

Chr7:94023873-94060544 (COL1A2)

Chr15:60297130	Chr15:60297152	Chr15:60297169	Chr15:60297174
Chr15:60297178	Chr15:60297185	Chr15:60297192	Chr15:60297203
Chr15:60297212	Chr15:60297221	Chr15:60297228	Chr15:60297252
Chr15:60297266	Chr15:60297273	Chr15:60297298	

Chr16:86544133-86548070 (FOXF1)

Chr16:86544571	Chr16:86544587	Chr16:86544590	Chr16:86544593
Chr16:86544597	Chr16:86544599	Chr16:86544601	Chr16:86544608
Chr16:86544624	Chr16:86544652	Chr16:86544658	Chr16:86544675
Chr16:86544685	Chr16:86544699	Chr16:86544703	Chr16:86544706
Chr16:86544714	Chr16:86544720	Chr16:86544735	Chr16:86544745
Chr16:86544763			

Chr16:86544268	Chr16:86544273	Chr16:86544295	Chr16:86544298
Chr16:86544305	Chr16:86544308	Chr16:86544312	Chr16:86544321
Chr16:86544337	Chr16:86544339	Chr16:86544346	Chr16:86544377
Chr16:86544384	Chr16:86544391	Chr16:86544416	Chr16:86544431
Chr16:86544460	Chr16:86544464	Chr16:86544477	Chr16:86544484
Chr16:86544518	Chr16:86544523	Chr16:86544547	Chr16:86544552
Chr16:86544559	Chr16:86544571		

Chr16:86544810	Chr16:86544832	Chr16:86544835	Chr16:86544843
Chr16:86544853	Chr16:86544859	Chr16:86544862	Chr16:86544865
Chr16:86544867	Chr16:86544870	Chr16:86544874	Chr16:86544877
Chr16:86544885	Chr16:86544892	Chr16:86544900	Chr16:86544907
Chr16:86544915	Chr16:86544928	Chr16:86544931	Chr16:86544934
Chr16:86544951	Chr16:86544955	Chr16:86544958	Chr16:86544966
Chr16:86544972	Chr16:86544975	Chr16:86544978	Chr16:86544987
Chr16:86544993	Chr16:86544996	Chr16:86545000	Chr16:86545002
Chr16:86545005	Chr16:86545015	Chr16:86545018	Chr16:86545060
Chr16:86545062	Chr16:86545078	Chr16:86545092	

Chr13:28494168-28500451 (PDX1)

Chr13:28502109	Chr13:28502153	Chr13:28502161	Chr13:28502177
Chr13:28502179	Chr13:28502191	Chr13:28502198	Chr13:28502205
Chr13:28502207	Chr13:28502210	Chr13:28502245	Chr13:28502309

Chr13:28502442	Chr13:28502449	Chr13:28502461	Chr13:28502464
Chr13:28502475	Chr13:28502507	Chr13:28502512	Chr13:28502538
Chr13:28502544	Chr13:28502549	Chr13:28502559	Chr13:28502564
Chr13:28502585			

Chr13:28503045	Chr13:28503049	Chr13:28503081	Chr13:28503099
Chr13:28503114	Chr13:28503127	Chr13:28503138	Chr13:28503147
Chr13:28503155	Chr13:28503157	Chr13:28503179	

Chr7:96649702-96654143 (DLX5)

Chr7:96650062	Chr7:96650072	Chr7:96650078	Chr7:96650096
---------------	---------------	---------------	---------------

ES 2 707 341 T3

Chr7:96650099	Chr7:96650102		
Chr7:96651485	Chr7:96651488	Chr7:96651518	Chr7:96651523
Chr7:96651532	Chr7:96651535	Chr7:96651537	Chr7:96651542
Chr7:96651550	Chr7:96651586		
Chr7:96653596	Chr7:96653605	Chr7:96653607	Chr7:96653617
Chr7:96653620	Chr7:96653623	Chr7:96653644	Chr7:96653656
Chr7:96653683	Chr7:96653686	Chr7:96653692	Chr7:96653698
Chr7:96653701			
<i>Chr21:28208606-28217728 (ADAMTS1)</i>			
Chr21:28217973	Chr21:28218002	Chr21:28218015	Chr21:28218018
Chr21:28218047	Chr21:28218051	Chr21:28218057	Chr21:28218072
Chr21:28218074	Chr21:28218084	Chr21:28218105	
Chr21:28218514	Chr21:28218516	Chr21:28218550	Chr21:28218568
Chr21:28218579	Chr21:28218586	Chr21:28218596	Chr21:28218635
Chr21:28218638	Chr21:28218646	Chr21:28218671	Chr21:28218684
Chr21:28218688	Chr21:28218704	Chr21:28218729	Chr21:28218741
Chr21:28218893	Chr21:28218906	Chr21:28218914	Chr21:28218916
Chr21:28218928	Chr21:28218934	Chr21:28218938	Chr21:28218949
Chr21:28218953	Chr21:28218959	Chr21:28218974	Chr21:28218976
Chr21:28218978	Chr21:28218984	Chr21:28218986	Chr21:28218996
Chr21:28219008	Chr21:28219016		
<i>Chr13:110959631-111165373 (COL4A2)</i>			
Chr13:110960813	Chr13:110960827	Chr13:110960849	Chr13:110960875
Chr13:110960925	Chr13:110960930	Chr13:110960938	Chr13:110960978
Chr13:110961001	Chr13:110961003	Chr13:110961025	Chr13:110961045
Chr13:110961049	Chr13:110961069	Chr13:110961072	Chr13:110961088
Chr13:110961091	Chr13:110961095	Chr13:110961110	Chr13:110961116
Chr13:110961131	Chr13:110960786		
Chr13:110961358	Chr13:110961386	Chr13:110961404	Chr13:110961406
Chr13:110961445	Chr13:110961579	Chr13:110961594	Chr13:110961606
Chr13:110961631			
Chr13:110959935	Chr13:110959965	Chr13:110959968	Chr13:110959974
Chr13:110959979	Chr13:110959981	Chr13:110959986	Chr13:110959988
Chr13:110959997	Chr13:110959999	Chr13:110960004	Chr13:110960006
Chr13:110960011	Chr13:110960027	Chr13:110960035	Chr13:110960046
Chr13:110960051	Chr13:110960071	Chr13:110960099	Chr13:110960108
Chr13:110960115	Chr13:110960156	Chr13:110960180	
<i>Chr5:83238126-83680611 (EDIL3)</i>			
Chr5:83679825	Chr5:83679827	Chr5:83679836	Chr5:83679843
Chr5:83679846	Chr5:83679860	Chr5:83679864	Chr5:83679883

ES 2 707 341 T3

Chr5:83679894	Chr5:83679900	Chr5:83679906	Chr5:83679910
Chr5:83679937	Chr5:83679953	Chr5:83679957	Chr5:83679961
Chr5:83679976	Chr5:83679982	Chr5:83679987	Chr5:83680003
Chr5:83680007	Chr5:83680011	Chr5:83680026	Chr5:83680032
Chr5:83680086	Chr5:83680090	Chr5:83680103	Chr5:83680106
Chr5:83680122	Chr5:83680126		
Chr5:83679546	Chr5:83679568	Chr5:83679571	Chr5:83679585
Chr5:83679602	Chr5:83679617	Chr5:83679630	Chr5:83679640
Chr5:83679667	Chr5:83679675	Chr5:83679689	Chr5:83679693
Chr5:83679699	Chr5:83679701	Chr5:83679733	
Chr5:83679973	Chr5:83679989	Chr5:83679992	Chr5:83680001
Chr5:83680003	Chr5:83680006	Chr5:83680012	Chr5:83680015
Chr5:83680019	Chr5:83680033	Chr5:83680036	Chr5:83680045
Chr5:83680051	Chr5:83680061	Chr5:83680063	Chr5:83680066
Chr5:83680108	Chr5:83680115	Chr5:83680118	Chr5:83680132
Chr5:83680147	Chr5:83680159	Chr5:83680174	Chr5:83680181
Chr5:83680185	Chr5:83680198	Chr5:83680205	Chr5:83680209
Chr5:83680217	Chr5:83680232	Chr5:83680235	Chr5:83680237
Chr5:83680253			
Chr5:83680108	Chr5:83680115	Chr5:83680118	Chr5:83680132
Chr5:83680147	Chr5:83680159	Chr5:83680174	Chr5:83680181
Chr5:83680185	Chr5:83680198	Chr5:83680205	Chr5:83680209
Chr5:83680217	Chr5:83680232	Chr5:83680235	Chr5:83680237
Chr5:83680253	Chr5:83680264	Chr5:83680284	Chr5:83680310
Chr5:83680326	Chr5:83680355		
Chr5:83680401	Chr5:83680406	Chr5:83680409	Chr5:83680411
Chr5:83680413	Chr5:83680430	Chr5:83680438	Chr5:83680441
Chr5:83680444	Chr5:83680458	Chr5:83680463	Chr5:83680474
Chr5:83680483	Chr5:83680485	Chr5:83680488	Chr5:83680492
Chr5:83680497	Chr5:83680499	Chr5:83680507	Chr5:83680509
Chr5:83680513	Chr5:83680518	Chr5:83680529	Chr5:83680531
Chr5:83680548	Chr5:83680559	Chr5:83680564	Chr5:83680568
Chr5:83680572	Chr5:83680579	Chr5:83680589	Chr5:83680591
Chr5:83680593	Chr5:83680596	Chr5:83680602	
<i>Chr15:48700503-48937985 (FBN1)</i>			
Chr15:48938149	Chr15:48938163	Chr15:48938172	Chr15:48938181
Chr15:48938183	Chr15:48938218	Chr15:48938236	Chr15:48938238
Chr15:48938254	Chr15:48938267	Chr15:48938273	Chr15:48938280
Chr15:48938291	Chr15:48938349		
<i>Chr1:47901689-47906363 (FOXD2)</i>			
Chr1:47899102	Chr1:47899126	Chr1:47899129	Chr1:47899143
Chr1:47899152	Chr1:47899168	Chr1:47899184	Chr1:47899205

ES 2 707 341 T3

Chr1:47899212	Chr1:47899230	Chr1:47899232	Chr1:47899253
Chr1:47899286	Chr1:47899327		
Chr1:47909988	Chr1:47909995	Chr1:47910005	Chr1:47910036
Chr1:47910051	Chr1:47910056	Chr1:47910062	Chr1:47910074
Chr1:47910103	Chr1:47910122	Chr1:47910137	Chr1:47910142
Chr1:47910144	Chr1:47910146		
<i>Chr2:66662532-66799891 (MEIS1)</i>			
Chr2:66662043	Chr2:66662047	Chr2:66662049	Chr2:66662063
Chr2:66662073	Chr2:66662107	Chr2:66662111	Chr2:66662124
Chr2:66662145	Chr2:66662156	Chr2:66662161	Chr2:66662163
Chr2:66662178	Chr2:66662218		
Chr2:66662178	Chr2:66662218	Chr2:66662220	Chr2:66662246
Chr2:66662265	Chr2:66662280	Chr2:66662306	Chr2:66662310
Chr2:66662323	Chr2:66662333	Chr2:66662337	
<i>Chr16:55513081-55540586 (MMP2)</i>			
Chr16:55512695	Chr16:55512711	Chr16:55512732	Chr16:55512750
Chr16:55512753	Chr16:55512793		
Chr16:55513961	Chr16:55513997	Chr16:55514025	Chr16:55514059
Chr16:55514061	Chr16:55514092	Chr16:55514120	Chr16:55514131
Chr16:55514158	Chr16:55514205		
<i>Chr7:24323807-24331484 (NPY)</i>			
Chr7:24323767	Chr7:24323792	Chr7:24323794	Chr7:24323799
Chr7:24323817	Chr7:24323834	Chr7:24323840	Chr7:24323844
Chr7:24323848	Chr7:24323866	Chr7:24323876	Chr7:24323880
Chr7:24323882	Chr7:24323884	Chr7:24323894	Chr7:24323905
Chr7:24323910	Chr7:24323930	Chr7:24323934	
Chr7:24324180	Chr7:24324186	Chr7:24324206	Chr7:24324217
Chr7:24324222	Chr7:24324225	Chr7:24324244	Chr7:24324249
Chr7:24324251	Chr7:24324268	Chr7:24324274	Chr7:24324280
Chr7:24324311	Chr7:24324313		
Chr7:24324549	Chr7:24324570	Chr7:24324592	Chr7:24324595
Chr7:24324597	Chr7:24324599	Chr7:24324621	Chr7:24324625
Chr7:24324633	Chr7:24324635	Chr7:24324668	Chr7:24324672
Chr7:24324676	Chr7:24324679	Chr7:24324683	Chr7:24324690
<i>Chr19:38741877-38747172 (PPP1R14A)</i>			
Chr19:38747280	Chr19:38747296	Chr19:38747300	Chr19:38747313
Chr19:38747319	Chr19:38747322	Chr19:38747328	Chr19:38747334
Chr19:38747355	Chr19:38747361	Chr19:38747371	Chr19:38747382
Chr19:38747389	Chr19:38747410		
Chr19:38746654	Chr19:38746680	Chr19:38746690	Chr19:38746701

Chr19:38741877-38747172 (PPP1R14A)

Chr19:38746715	Chr19:38746726	Chr19:38746728	Chr19:38746732
Chr19:38746749	Chr19:38746759	Chr19:38746770	Chr19:38746784
Chr19:38746786	Chr19:38746804	Chr19:38746808	Chr19:38746811
Chr19:38746826	Chr19:38746834	Chr19:38746837	Chr19:38746849
Chr19:38746852	Chr19:38746865	Chr19:38746871	Chr19:38746873
Chr19:38746875	Chr19:38746877	Chr19:38746882	Chr19:38746898

o una citosina correspondiente en la posición n + 1 en la hebra de ADN opuesta, en una muestra biológica de dicho individuo en donde un mayor nivel de metilación de uno o más de dichos residuos con respecto al nivel de metilación de un residuo correspondiente en una muestra de control es indicativo de una neoplasia de intestino grueso o una predisposición a la aparición de un estado neoplásico.

En otra realización, dicho uno o más residuos de citosina se seleccionan entre GRASP, SDC2, COL4A1, IRX1, SOX21, FGF5, ZNF471, SUSP5, EFEMP1, TCF21, COL1A2, FOXB1, FOXF1, PDX1 y DLX5.

En una realización concreta, dichos uno o más residuos de citosina se seleccionan entre:

Chr12:52400748-52409671 (GRASP)

Chr12:52399713	Chr12:52399731	Chr12:52399749	Chr12:52399783
Chr12:52399796	Chr12:52399808	Chr12:52399823	Chr12:52399835
Chr12:52399891			

Chr12:52400847	Chr12:52400850	Chr12:52400859	Chr12:52400866
Chr12:52400869	Chr12:52400873	Chr12:52400881	Chr12:52400886
Chr12:52400893	Chr12:52400895	Chr12:52400899	Chr12:52400902
Chr12:52400907	Chr12:52400913	Chr12:52400919	Chr12:52400932
Chr12:52400938	Chr12:52400958	Chr12:52400962	Chr12:52400971
Chr12:52400973	Chr12:52400976	Chr12:52400998	Chr12:52401008
Chr12:52401010	Chr12:52401012	Chr12:52401016	Chr12:52401019
Chr12:52401025	Chr12:52401041	Chr12:52401044	Chr12:52401053
Chr12:52401060	Chr12:52401064	Chr12:52401092	Chr12:52401118

Chr8:97505882-97624037 (SDC2)

Chr8:97506843	Chr8:97506845	Chr8:97506861	Chr8:97506876
Chr8:97506902	Chr8:97506909	Chr8:97506911	Chr8:97506913
Chr8:97506924	Chr8:97506932	Chr8:97506934	Chr8:97506940
Chr8:97506977	Chr8:97506993	Chr8:97507005	Chr8:97507008
Chr8:97507014			

Chr8:97507038	Chr8:97507061	Chr8:97507064	Chr8:97507078
Chr8:97507082	Chr8:97507084	Chr8:97507089	Chr8:97507119
Chr8:97507128	Chr8:97507136	Chr8:97507144	Chr8:97507153
Chr8:97507162	Chr8:97507214	Chr8:97507216	

Chr13:110959094-110959330 (COL4A1).

Chr13:97507038	Chr13:97507061	Chr13:97507064	Chr13:97507078
Chr13:97507082	Chr13:97507084	Chr13:97507089	Chr13:97507119
Chr13:97507128	Chr13:97507136	Chr13:97507144	Chr13:97507153
Chr13:97507162	Chr13:97507214	Chr13:97507216	

ES 2 707 341 T3

Chr13:110959094-110959330 (COL4A1).

Chr5:3594663	Chr5:3594679	Chr5:3594684	Chr5:3594697
Chr5:3594703	Chr5:3594711	Chr5:3594725	Chr5:3594738
Chr5:3594745	Chr5:3594758	Chr5:3594768	Chr5:3594774
Chr5:3594778	Chr5:3594794	Chr5:3594799	Chr5:3594818
Chr5:3594840			

Chr13:95361879-95364389 (SOX21)

Chr13:95364016	Chr13:95364019	Chr13:95364042	Chr13:95364050
Chr13:95364054	Chr13:95364061	Chr13:95364064	Chr13:95364074
Chr13:95364080	Chr13:95364082	Chr13:95364106	Chr13:95364119
Chr13:95364123	Chr13:95364125	Chr13:95364128	Chr13:95364141
Chr13:95364163	Chr13:95364171		

Chr13:95364543	Chr13:95364545	Chr13:95364548	Chr13:95364551
Chr13:95364560	Chr13:95364571	Chr13:95364582	Chr13:95364584
Chr13:95364587	Chr13:95364602	Chr13:95364623	Chr13:95364627
Chr13:95364640	Chr13:95364649	Chr13:95364653	Chr13:95364656
Chr13:95364665	Chr13:95364684	Chr13:95364696	Chr13:95364712
Chr13:95364729	Chr13:95364732	Chr13:95364734	Chr13:95364748
Chr13:95364751			

Chr4:81187742-81212171 (FGF5)

Chr4:81186919	Chr4:81186947	Chr4:81186964	Chr4:81186968
Chr4:81186973	Chr4:81186975	Chr4:81186983	Chr4:81187001
Chr4:81187011	Chr4:81187041	Chr4:81187056	Chr4:81187062
Chr4:81187093	Chr4:81187116	Chr4:81187125	Chr4:81187161
Chr4:81187191	Chr4:81187196	Chr4:81187198	

Chr19:57019212-57040269 (ZNF471)

Chr19:57018990	Chr19:57018994	Chr19:57019003	Chr19:57019010
Chr19:57019018	Chr19:57019020	Chr19:57019025	Chr19:57019029
Chr19:57019044	Chr19:57019047	Chr19:57019067	Chr19:57019073
Chr19:57019084	Chr19:57019101	Chr19:57019118	

Chr19:57019315	Chr19:57019321	Chr19:57019346	Chr19:57019351
Chr19:57019355	Chr19:57019361	Chr19:57019364	Chr19:57019366
Chr19:57019371	Chr19:57019373	Chr19:57019385	Chr19:57019387
Chr19:57019405	Chr19:57019428	Chr19:57019433	Chr19:57019435
Chr19:57019437	Chr19:57019443	Chr19:57019451	Chr19:57019456
Chr19:57019463	Chr19:57019465	Chr19:57019470	Chr19:57019483
Chr19:57019487	Chr19:57019492	Chr19:57019502	Chr19:57019505

Chr3:33191537-33260707 (SUSD5)

Chr3:33260601	Chr3:33260621	Chr3:33260631	Chr3:33260640
Chr3:33260651	Chr3:33260665	Chr3:33260676	Chr3:33260694
Chr3:33260698	Chr3:33260711	Chr3:33260715	Chr3:33260732
Chr3:33260742	Chr3:33260748	Chr3:33260755	Chr3:33260760
Chr3:33260769	Chr3:33260776	Chr3:33260778	Chr3:33260780
Chr3:33260788	Chr3:33260806		

ES 2 707 341 T3

Chr3:33191537-33260707 (SUSD5)

Chr2:56093097-56151298 (EFEMP1)

Chr2:56150376	Chr2:56150389	Chr2:56150394	Chr2:56150415
Chr2:56150419	Chr2:56150423	Chr2:56150433	Chr2:56150473
Chr2:56150475	Chr2:56150478	Chr2:56150499	Chr2:56150537
Chr2:56150549	Chr2:56150580	Chr2:56150601	

Chr6:134210259-134216675 (TCF21)

Chr6:134210556	Chr6:134210598	Chr6:134210615	Chr6:134210640
Chr6:134210649	Chr6:134210667	Chr6:134210692	Chr6:134210694
Chr6:134210697	Chr6:134210720	Chr6:134210745	

Chr6:134210720	Chr6:134210745	Chr6:134210776	Chr6:134210781
Chr6:134210784	Chr6:134210790	Chr6:134210792	Chr6:134210794
Chr6:134210800	Chr6:134210806	Chr6:134210812	Chr6:134210868
Chr6:134210894	Chr6:134210906	Chr6:134210919	Chr6:134210946

Chr7:94023873-94060544 (COL1A2)

Chr7:94024172	Chr7:94024191	Chr7:94024214	Chr7:94024230
Chr7:94024254	Chr7:94024266	Chr7:94024268	Chr7:94024272
Chr7:94024288	Chr7:94024291	Chr7:94024310	

Chr15:60296421-60298142 (FOXB1)

Chr15:60296555	Chr15:60296561	Chr15:60296563	Chr15:60296578
Chr15:60296585	Chr15:60296598	Chr15:60296601	Chr15:60296614
Chr15:60296616	Chr15:60296619	Chr15:60296627	Chr15:60296633
Chr15:60296639	Chr15:60296643	Chr15:60296647	Chr15:60296654
Chr15:60296665	Chr15:60296668	Chr15:60296670	Chr15:60296675
Chr15:60296679	Chr15:60296684	Chr15:60296689	Chr15:60296694

Chr15:60297035	Chr15:60297050	Chr15:60297053	Chr15:60297109
Chr15:60297118	Chr15:60297121	Chr15:60297126	Chr15:60297128
Chr15:60297130	Chr15:60297152	Chr15:60297169	Chr15:60297174
Chr15:60297178	Chr15:60297185	Chr15:60297192	Chr15:60297203
Chr15:60297212	Chr15:60297221	Chr15:60297228	Chr15:60297252
Chr15:60297266	Chr15:60297273	Chr15:60297298	

Chr16:86544133-86548070 (FOXF1)

Chr16:86544268	Chr16:86544273	Chr16:86544295	Chr16:86544298
Chr16:86544305	Chr16:86544308	Chr16:86544312	Chr16:86544321
Chr16:86544337	Chr16:86544339	Chr16:86544346	Chr16:86544377
Chr16:86544384	Chr16:86544391	Chr16:86544416	Chr16:86544431
Chr16:86544460	Chr16:86544464	Chr16:86544477	Chr16:86544484
Chr16:86544518	Chr16:86544523	Chr16:86544547	Chr16:86544552
Chr16:86544559	Chr16:86544571		

Chr13:28494168-28500451 (PDX1)

Chr13:28502109	Chr13:28502153	Chr13:28502161	Chr13:28502177
Chr13:28502179	Chr13:28502191	Chr13:28502198	Chr13:28502205
Chr13:28502207	Chr13:28502210	Chr13:28502245	Chr13:28502309

Chr13:28494168-28500451 (PDX1)

Chr13:28502442	Chr13:28502449	Chr13:28502461	Chr13:28502464
Chr13:28502475	Chr13:28502507	Chr13:28502512	Chr13:28502538
Chr13:28502544	Chr13:28502549	Chr13:28502559	Chr13:28502564
Chr13:28502585			

Chr7:96649702-96654143 (DLX5)

Chr7:96653596	Chr7:96653605	Chr7:96653607	Chr7:96653617
Chr7:96653620	Chr7:96653623	Chr7:96653644	Chr7:96653656
Chr7:96653683	Chr7:96653686	Chr7:96653692	Chr7:96653698
Chr7:96653701			

El método de detección de la presente invención se puede realizar en cualquier muestra biológica adecuada. Con este fin, la referencia a una "muestra biológica" se debe entender como una referencia a cualquier muestra de material biológico derivado de un animal tal como, pero no limitado a, material celular, biofluidos (p. ej., sangre), heces, especímenes de biopsia de tejidos, especímenes quirúrgicos o fluido que se ha introducido en el cuerpo de un animal y posteriormente retirado (tal como, por ejemplo, la solución extraída de un lavado de enema). La muestra biológica que se analiza de acuerdo con el método de la presente invención se puede analizar directamente o puede requerir algún tipo de tratamiento antes de la prueba. Por ejemplo, una biopsia o muestra quirúrgica puede requerir homogeneización antes de la prueba o puede requerir un corte para la prueba in situ de los niveles de expresión cualitativos de los genes individuales. Alternativamente, una muestra de células puede requerir la permeabilización antes de la prueba. Adicionalmente, en la medida en que la muestra biológica no esté en forma líquida (si se requiere tal forma para el análisis), puede requerir la adición de un reactivo, tal como un tampón, para movilizar la muestra.

En la medida en que la región de ADN de interés esté presente en una muestra biológica, la muestra biológica se puede analizar directamente o, de lo contrario, se puede aislar todo o parte del ácido nucleico presente en la muestra biológica antes de la prueba. En otro ejemplo más, la muestra se puede purificar parcialmente o enriquecer de otra manera antes del análisis. Por ejemplo, en la medida en que una muestra biológica comprenda una población celular muy diversa, puede ser conveniente enriquecerla para una subpoblación de particular interés. Está dentro del alcance de la presente invención que la población de células diana o las moléculas derivadas de la misma se traten antes de la prueba, por ejemplo, inactivación de virus vivos. También se debe entender que la muestra biológica puede ser recién recolectada o puede haber sido almacenada (por ejemplo, mediante congelación) antes de la prueba o tratada de otra manera antes de la prueba (tal como por ejemplo al someterse a cultivo).

La elección de qué tipo de muestra es más adecuada para el análisis de acuerdo con el método descrito en la presente memoria dependerá de la naturaleza de la situación. Preferiblemente, dicha muestra es una muestra fecal (heces), lavado de enema, resección quirúrgica, biopsia de tejido o muestra de sangre (p. ej., sangre total, suero o plasma).

Más preferiblemente, dicha muestra biológica es una muestra de sangre, muestra de biopsia o muestra de heces.

Como se detalla aquí anteriormente, la presente invención está diseñada para escrutar una célula o población de células neoplásicas, que se encuentran en el intestino grueso. Por consiguiente, la referencia a "célula o población celular" se debe entender como una referencia a una célula individual o un grupo de células. Dicho grupo de células puede ser una población difusa de células, una suspensión celular, una población encapsulada de células o una población de células que adoptan la forma de tejido.

La referencia a la "aparición" de una neoplasia, tal como adenoma o adenocarcinoma, se debe entender como una referencia a una o más células de ese individuo que presentan displasia. En este sentido, el adenoma o adenocarcinoma pueden estar bien desarrollados ya que se ha desarrollado una masa de células displásicas. Alternativamente, el adenoma o el adenocarcinoma pueden estar en un estadio muy temprano, ya que solo se han producido relativamente pocas divisiones celulares anormales en el momento del diagnóstico. La presente invención también se extiende a la evaluación de la predisposición de un individuo al desarrollo de una neoplasia, tal como un adenoma o adenocarcinoma. Sin limitar la presente invención de ninguna manera, los niveles de metilación cambiados pueden ser indicativos de la predisposición de ese individuo a desarrollar una neoplasia, tal como el desarrollo futuro de un adenoma o adenocarcinoma u otro adenoma o adenocarcinoma.

Aunque el método preferido es evaluar los niveles de metilación con el fin de diagnosticar el desarrollo de neoplasia o predisposición a la misma, la detección de cambios inversos en los niveles de dicha metilación puede ser deseable bajo ciertas circunstancias, por ejemplo, para controlar la eficacia del tratamiento terapéutico o profiláctico dirigido a la modulación de una afección neoplásica, tal como el desarrollo de un adenoma o adenocarcinoma. Por ejemplo, cuando los niveles elevados de metilación indican que un individuo ha desarrollado una afección caracterizada por el

desarrollo de adenoma o adenocarcinoma, se puede utilizar el escrutinio de una disminución en los niveles de metilación subsecuentemente a la aparición de un régimen de tratamiento terapéutico para indicar un aclaramiento satisfactorio de las células neoplásicas. En otro ejemplo, se puede utilizar este método para someter a prueba el tejido en los márgenes de una resección de tumor con el fin de determinar si se ha eliminado el margen completo del tumor.

Por lo tanto, el presente método se puede en el diagnóstico, pronóstico, clasificación, predicción del riesgo de enfermedad, detección de recurrencia de la enfermedad, selección del tratamiento de varios tipos de neoplasias y seguimiento de las neoplasias. Se puede detectar un cáncer en cualquier estadio de progresión, tal como cánceres primarios, metastásicos y recurrentes.

La presente invención proporciona métodos para determinar si un mamífero (p. ej., un ser humano) tiene una neoplasia de intestino grueso, si una muestra biológica tomada de un mamífero contiene células neoplásicas o ADN derivado de células neoplásicas, estimando el riesgo o la probabilidad de que un mamífero desarrolle una neoplasia, controlando la eficacia del tratamiento contra el cáncer o seleccionando el tratamiento adecuado contra el cáncer en un mamífero con cáncer. Tales métodos se basan en la determinación de que las células neoplásicas tienen un estado de metilación diferente al de las células normales en las regiones de ADN descritas en la presente memoria. Por consiguiente, al determinar si una célula contiene o no secuencias metiladas diferencialmente en las regiones de ADN como se describe en la presente memoria, es posible determinar que una célula es neoplásica.

El método de la invención se puede utilizar para evaluar individuos que se sabe o se sospecha que tienen una neoplasia o como una prueba clínica de rutina, es decir, en un individuo que no se sospecha necesariamente que tenga una neoplasia. Se pueden realizar ensayos de diagnóstico adicionales para confirmar el estado de la neoplasia en el individuo.

Adicionalmente, los presentes métodos se pueden utilizar para evaluar la eficacia de un curso de tratamiento. Por ejemplo, la eficacia de un tratamiento contra el cáncer se puede evaluar al controlar la metilación del ADN de las secuencias descritas en la presente memoria a lo largo del tiempo en un mamífero que tiene cáncer. Por ejemplo, una reducción o ausencia de metilación en cualquiera de las secuencias diagnósticas de la invención en una muestra biológica tomada de un mamífero después de un tratamiento, en comparación con un nivel en una muestra tomada del mamífero previamente, o con anterioridad, en el tratamiento, indica un tratamiento eficaz.

El método de la presente invención es, por lo tanto, útil como una prueba de una sola vez o como un seguimiento continuo de aquellos individuos que se cree que están en riesgo de desarrollar neoplasia o como un seguimiento de la eficacia de los regímenes de tratamiento terapéutico o profiláctico dirigidos a inhibir o, ralentizar de otro modo el desarrollo de neoplasias. En estas situaciones, el mapeo de la modulación de los niveles de metilación en una o más clases de muestras biológicas es un indicador valioso del estado de un individuo o la eficacia de un régimen terapéutico o profiláctico actualmente en uso. Por consiguiente, se debe entender que el método de la presente invención se extiende al control de los aumentos o disminuciones en los niveles de metilación en un individuo con respecto a su nivel normal (como se definió anteriormente en la presente memoria), o con respecto a uno o más niveles de metilación previos determinados a partir de una muestra biológica de dicho individuo.

Los métodos para detectar neoplasias pueden comprender la detección de una o más secuencias de polinucleótidos o polipéptidos asociadas con el cáncer diferentes. En consecuencia, la detección de la metilación mediante el método de la invención se puede utilizar sola o combinada con otros métodos de escrutinio para el diagnóstico o pronóstico de la neoplasia.

Se puede utilizar cualquier método para detectar la metilación del ADN en los métodos de la presente invención. Existen varios métodos disponibles para la detección de ADN metilado de manera diferencial en lugares específicos en muestras de tejido primario o en muestras de pacientes tales como sangre, orina, heces o saliva (revisado en Kristensen y Hansen *Clin Chem.* 55:1471-83, 2009; Ammerpohl et al., *Biochim Biophys Acta.* 1790:847-62, 2009; Shames et al., *Cancer Lett.* 251:187-98, 2007; Clark et al., *Nat Protoc.* 1:2353-64, 2006). Para el análisis de la proporción o el grado de metilación del ADN en un gen diana, el ADN se trata normalmente con bisulfito de sodio y las regiones de interés se amplifican utilizando cebadores y condiciones de PCR que amplificarán independientemente del estado de metilación del ADN. La metilación del amplicón general o de los sitios CpG individuales se puede evaluar a continuación mediante secuenciación, incluyendo pirosecuenciación, digestión con enzimas de restricción (COBRA) o mediante el análisis de la curva de fusión. Alternativamente, se pueden utilizar métodos basados en la ligación para el análisis de la metilación en sitios CpG específicos. La detección del ADN aberrantemente metilado liberado de tumores y en fluidos corporales se está desarrollando como un medio para el diagnóstico de cáncer. Aquí, en el caso de secuencias hipermetiladas, es necesario utilizar métodos sensibles que permitan la amplificación selectiva de la secuencia de ADN metilada a partir de un fondo de ADN celular normal que no está metilado. Tales métodos basados en ADN tratado con bisulfito, por ejemplo; incluyen PCR selectiva de metilación (MSP), Heavymethyl PCR, Headloop PCR y reacción en cadena dependiente de Coadyuvantes (documento PCT/AU2008/001475).

Brevemente, en algunas realizaciones, los métodos para detectar metilación incluyen someter a cizallamiento aleatoriamente o fragmentar aleatoriamente el ADN genómico, cortar el ADN con una enzima de restricción

dependiente de la metilación o sensible a la metilación y posteriormente identificar y/o analizar selectivamente el ADN cortado o no cortado. La identificación selectiva puede incluir, por ejemplo, separar el ADN cortado y no cortado (p. ej., por tamaño) y cuantificar una secuencia de interés que se cortó o, alternativamente, que no se cortó. Véase, p. ej., la patente de Estados Unidos Núm. 7.186.512. Alternativamente, el método puede abarcar la amplificación de ADN intacto después de la digestión con enzimas de restricción, amplificando de ese modo solamente el ADN que no había sido escindido por la enzima de restricción en la zona amplificada. Véase, p. ej., las solicitudes de patente de Estados Unidos Núm. de Ser. 10/971.986; 11/071.013; y 10/971.339. En algunas realizaciones, la amplificación se puede realizar utilizando cebadores que son específicos del gen. Alternativamente, se pueden añadir adaptadores a los extremos del ADN fragmentado aleatoriamente, se puede digerir el ADN con una enzima de restricción dependiente de la metilación o sensible a la metilación, el ADN intacto se puede amplificar utilizando cebadores que hibridan con las secuencias adaptadoras. En este caso, se puede realizar una segunda etapa para determinar la presencia, ausencia o cantidad de un gen concreto en una reserva de ADN amplificado. En algunas realizaciones, el ADN se amplifica utilizando PCR cuantitativa en tiempo real.

En algunas realizaciones, los métodos comprenden la cuantificación de la densidad de metilación media en una secuencia diana dentro de una población de ADN genómico. En algunas realizaciones, el método comprende poner en contacto en ADN genómico con una enzima de restricción dependiente de la metilación o una enzima de restricción sensible a la metilación en concisiones que permitan que al menos algunas copias de los sitios de escisión potenciales con enzimas de restricción del locus permanezcan sin escindir; cuantificar las copias intactas de locus; y comparar la cantidad de producto amplificado con un valor de control que represente la cantidad de metilación del ADN de control, cuantificando de ese modo la densidad de metilación media en el locus en comparación con la densidad de metilación del ADN de control.

La cantidad de metilación de un locus de ADN se puede determinar proporcionando una muestra de ADN genómico que comprende el locus, escindiendo el ADN con una enzima de restricción que es sensible a la metilación o dependiente de la metilación, y a continuación cuantificando la cantidad de ADN intacto o cuantificando la cantidad de ADN cortado en el locus de interés del ADN. La cantidad de ADN intacto o cortado dependerá de la cantidad inicial de ADN genómico que contenga el locus, la cantidad de metilación en el locus y el número (es decir, la fracción) de nucleótidos en el locus que están metilados en el ADN genómico. La cantidad de metilación en un locus de ADN se puede determinar comparando la cantidad de ADN intacto o el ADN cortado con un valor de control que representa la cantidad de ADN intacto o ADN cortado en una muestra de ADN tratada de manera similar. El valor de control puede representar un número conocido o pronosticado de nucleótidos metilados. Alternativamente, el valor de control puede representar la cantidad de ADN intacto o cortado del mismo locus en otra célula (p. ej., normal, no enferma) o en un segundo locus.

Al utilizar al menos una enzima de restricción sensible a la metilación o dependiente de la metilación en condiciones que permitan que al menos algunas copias de los sitios potenciales de escisión de la enzima de restricción en el locus permanezcan sin escindir y posteriormente cuantificar las copias intactas restantes y comparar la cantidad con un control, se puede determinar la densidad de metilación media de un locus. Una enzima sensible a la metilación es aquella que corta el ADN si su secuencia de reconocimiento no está metilada, mientras que una enzima dependiente de la metilación corta el ADN si su secuencia de reconocimiento está metilada. Si la enzima de restricción sensible a la metilación se pone en contacto con copias de un locus de ADN en condiciones que permiten que al menos algunas copias de los posibles sitios de escisión de enzimas de restricción en el locus permanezcan sin escindirse, el ADN intacto restante será directamente proporcional a la densidad de metilación y, por lo tanto, se puede comparar con un control para determinar la densidad de metilación relativa del locus en la muestra. De manera similar, si una enzima de restricción dependiente de la metilación se pone en contacto con copias de un locus de ADN en condiciones que permiten que al menos algunas copias de los sitios de escisión de enzimas de restricción potenciales en el locus permanezcan sin escindirse, el ADN intacto restante será inversamente proporcional al densidad de metilación y, por lo tanto, se puede comparar con un control para determinar la densidad de metilación relativa del locus en la muestra. Tales ensayos se describen, p. ej., en la Solicitud de Patente de Estados Unidos Núm. 10/971.986.

Los kits para los métodos anteriores pueden incluir, p. ej., una o más de las enzimas de restricción dependientes de la metilación, enzimas de restricción sensibles a la metilación, reactivos de amplificación (p. ej., PCR), sondas y/o cebadores.

Se pueden utilizar métodos de amplificación cuantitativa (p. ej., PCR cuantitativa o amplificación lineal cuantitativa) para cuantificar la cantidad de ADN intacto dentro de un locus flanqueado por cebadores de amplificación después de la digestión de restricción. Los métodos de amplificación cuantitativa se describen, p. ej., en las Patentes de Estados Unidos Núm. 6.180.349; 6.033.854; y 5.972.602, así como, p. ej., en Gibson et al., *Genome Research* 6:995-1001 (1996); DeGraves, et al., *Biotechniques*. 34(1):106-10, 112-5 (2003); Deiman B, et al., *Mol. Biotechnol.* 20(2):163-79 (2002).

Se puede realizar un seguimiento de las amplificaciones en "tiempo real".

Los métodos adicionales para detectar la metilación del ADN pueden implicar la secuenciación genómica antes y después del tratamiento del ADN con bisulfito. Véase, p. ej., Frommer et al., *Proc. Natl Acad Sci. USA* 89:1827-1831

(1992). Cuando el bisulfito de sodio se pone en contacto con el ADN, la citosina desmetilada se convierte en uracilo, mientras que la citosina metilada no se modifica.

En algunas realizaciones, la digestión con enzimas de restricción de productos de PCR amplificados a partir de ADN convertido con bisulfito se utiliza para detectar la metilación del ADN. Véanse, p. ej., Sadri y Hornsby, *Nucl. Acids Res.* 24:5058-5059 (1996); Xiong & Laird, *Nucleic Acids Res.* 25:2532-2534 (1997).

En algunas realizaciones, una reacción de PCR específica de metilación ("MSP") se usa sola o combinada con otros métodos para detectar la metilación del ADN. Un ensayo de MSP implica la modificación inicial del ADN por bisulfito de sodio, que convierte todas las citosinas desmetiladas, pero no metiladas, en uracilo, y su posterior amplificación con cebadores específicos para los ADN metilados frente a no metilados. Véanse, Herman et al. *Proc. Natl Acad Sci. USA* 93:9821-9826 (1996); Patente de Estados Unidos Núm. 5.786.146.

En algunas realizaciones, se utiliza un ensayo MethyLight solo o combinado con otros métodos para detectar la metilación del ADN (véase, Eads et al., *Cancer Res.* 59:2302-2306 (1999)). En resumen, en el procedimiento MethyLight, el ADN genómico se convierte en una reacción de bisulfito de sodio (el procedimiento con bisulfito convierte los residuos de citosina no metilados en uracilo). La amplificación de una secuencia de ADN de interés se realiza a continuación utilizando cebadores de PCR que hibridan con dinucleótidos CpG. Al utilizar cebadores que hibridan solo con secuencias resultantes de la conversión con bisulfito de ADN metilado (o, alternativamente, con secuencias desmetiladas), la amplificación puede indicar el estado de metilación de las secuencias en las que se hibridan los cebadores. Además, el producto de amplificación se puede detectar con una sonda que se une específicamente a una secuencia que resulta del tratamiento con bisulfito de un ADN desmetilado. Si se desea, se pueden utilizar cebadores y sondas para detectar el estado de metilación. Por lo tanto, los kits para su uso con MethyLight pueden incluir bisulfito de sodio así como cebadores o sondas marcadas de manera detectable (incluyendo, pero sin limitarse a, las sondas Taqman o de baliza molecular) que distinguen entre el ADN metilado y desmetilado que se ha tratado con bisulfito. Otros componentes del kit pueden incluir, p. ej., los reactivos necesarios para la amplificación del ADN, incluyendo, pero sin limitarse a, tampones de PCR, desoxinucleótidos; y una polimerasa termoestable.

En algunas realizaciones, se utiliza una reacción Ms-SnuPE (Extensión del cebador de un solo nucleótido sensible a la metilación) sola o combinada con otros métodos para detectar la metilación del ADN (véase, Gonzalgo y Jones, *Nucleic Acids Res.* 25:2529-2531 (1997)). La técnica Ms-SnuPE es un método cuantitativo para evaluar las diferencias de metilación en sitios CpG específicos basado en el tratamiento con bisulfito del ADN, seguido de la extensión del cebador de un solo nucleótido (Gonzalgo y Jones, más arriba). Brevemente, el ADN genómico se hace reaccionar con bisulfito de sodio para convertir la citosina desmetilada en uracilo, mientras que la 5-metilcitosina permanece sin cambios. La amplificación de la secuencia diana deseada se realiza a continuación utilizando cebadores de PCR específicos para el ADN convertido con bisulfito, y el producto resultante se aísla y se utiliza como molde para el análisis de metilación en el sitio o los sitios CpG de interés.

Los reactivos típicos (p. ej., como los que se podrían encontrar en un kit típico basado en Ms-SnuPE) para el análisis de Ms-SnuPE pueden incluir, pero sin limitarse a: cebadores de PCR para un gen específico (o secuencia de ADN alterada por metilación o isla CpG); tampones y desoxinucleótidos de PCR optimizados; kit de extracción en gel; cebadores de control positivo; cebadores Ms-SnuPE para un gen específico; tampón de reacción (para la reacción Ms-SnuPE); y nucleótidos marcados de forma detectable. Además, los reactivos de conversión de bisulfito pueden incluir: tampón de desnaturalización de ADN; tampón de sulfonación; Reactivos o kit de recuperación de ADN (p. ej., precipitación, ultrafiltración, columna de afinidad); tampón de desulfonación; y componentes de recuperación de ADN.

Los métodos de detección de metilación adicionales incluyen, pero no se limitan a, amplificación de islas CpG metiladas (véase, Toyota et al., *Cancer Res.* 59:2307-12 (1999)) y los descritos, p. ej., en la Publicación de Patente de Estados Unidos 2005/0069879; Rein, et al. *Nucleic Acids Res.* 26(10):2255-64 (1998); Olek, et al. *Nat. Genet.* 17(3): 275-6 (1997); y la publicación PCT Núm. WO 00/70090.

A continuación se proporciona información más detallada con respecto a varios de estos métodos generalmente descritos:

(a) Diseño y/o producción de sondas o cebadores

Varios métodos descritos en la presente memoria para el diagnóstico de una neoplasia utilizan una o más sondas y/o cebadores. Los métodos para diseñar sondas y/o cebadores para su uso, p. ej., en PCR o hibridación son conocidos en la técnica y son descritos, por ejemplo, por Dieffenbach y Dveksler (Eds) (en: *PCR Primer: A Laboratory Manual*, Cold Spring Harbor Laboratories, NY, 1995). Además, existen varios paquetes de soporte lógico disponibles públicamente que diseñan sondas y cebadores óptimos para una variedad de ensayos, p. ej., Primer 3 disponible en el Center for Genome Research, Cambridge, Massachusetts, EE. UU.

Claramente, el uso potencial de la sonda o cebador debe considerarse durante su diseño. Por ejemplo, si la sonda o el cebador se producen para su uso en una PCR específica de metilación o ensayo de reacción en cadena de la ligasa (LCR), el nucleótido en el extremo 3' (o el extremo 5' en el caso de la LCR) debe corresponder

preferiblemente a un nucleótido metilado en un ácido nucleico.

Las sondas y/o cebadores útiles para la detección de una secuencia asociada con una neoplasia se evalúan, por ejemplo, para determinar aquellos que no forman horquillas, auto-ceban o forman dímeros de cebadores (p. ej., con otra sonda o cebador utilizado en un ensayo de detección). Además, a menudo se evalúa una sonda o cebador (o su secuencia) para determinar la temperatura a la que se desnaturaliza a partir de un ácido nucleico diana (es decir, la temperatura de fusión de la sonda o cebador, o T_m). Los métodos para estimar la T_m se conocen en la técnica y son descritos, por ejemplo, por Santa Lucia, *Proc. Natl Acad Sci. USA*, 95: 1460-1465, 1995 o Bresslauer et al., *Proc. Natl Acad Sci. USA*, 83: 3746-3750, 1986.

Los métodos para producir/sintetizar una sonda o cebador de la presente invención son conocidos en la técnica. Por ejemplo, la síntesis de oligonucleótidos es descrita por Gait (Ed) (En: *Oligonucleotide Synthesis: A Practical Approach* IRL Press Oxford, 1984). Por ejemplo, se puede obtener una sonda o cebador mediante síntesis biológica (p. ej., mediante digestión de un ácido nucleico con una endonucleasa de restricción) o mediante síntesis química. Para secuencias cortas (hasta aproximadamente 100 nucleótidos) es preferible la síntesis química.

Para secuencias más largas, son útiles los métodos de replicación convencionales empleados en biología molecular, tal como, por ejemplo, el uso de M13 para el ADN de hebra sencilla como describe Messing, *Methods Enzymol*, 101, 20-78, 1983. Otros métodos para la síntesis de oligonucleótidos incluyen, por ejemplo, métodos de fosfotriéster y fosfodiéster (Narang, et al. *Meth. Enzymol* 68: 90, 1979) y síntesis sobre un soporte (Beaucage, et al. *Tetrahedron Letters* 22: 1859-1862, 1981), así como la técnica de fosforamidato, Caruthers, M. H., et al., *Methods in Enzymology*, vol. 154, pág. 287-314 (1988), y otras descritas en "Synthesis and Applications of DNA and RNA", S. A. Narang, editor, Academic Press, Nueva York, 1987, y las referencias allí citadas. Las sondas que comprenden ácido nucleico bloqueado (LNA) se sintetizan como describen, por ejemplo, Nielsen et al. *J. Chem. Soc. Perkin Trans.*, 1:3423, 1997; Singh y Wengel, *Chem. Comun.* 1247, 1998. Mientras, las sondas que comprenden ácido péptidonucleico (PNA) se sintetizan como describen, por ejemplo, Egholm et al., *Am. Chem. Soc.*, 114:1895, 1992; Egholm et al., *Nature*, 365:566, 1993; y Orum et al., *Nucl. Acids Res.*, 21:5332, 1993.

(b) Digestión de ADN con Endonucleasa Sensible a la Metilación

En un ejemplo, se determina el aumento de metilación en una muestra utilizando un procedimiento que comprende el tratamiento del ácido nucleico con una cantidad de una enzima endonucleasa de restricción sensible a la metilación en condiciones suficientes para digerir el ácido nucleico y a continuación detectar los fragmentos producidos. Las endonucleasas sensibles a la metilación ilustrativas incluyen, por ejemplo, HhaI o HpaII. Preferiblemente, los ensayos incluyen controles internos que se digieren con una enzima insensible a la metilación que tiene la misma especificidad que la enzima sensible a la metilación empleada. Por ejemplo, la enzima MspI insensible a la metilación es un isoesquízómero de la enzima HpaII sensible a la metilación.

Formatos de ensayo de hibridación

En un ejemplo, la digestión del ácido nucleico se detecta mediante hibridación selectiva de una sonda o cebador al ácido nucleico no digerido. Alternativamente, la sonda hibrida selectivamente con el ácido nucleico tanto digerido como no digerido, pero facilita la diferenciación entre ambas formas, p. ej., mediante electroforesis. Los métodos de detección adecuados para lograr la hibridación selectiva a una sonda de hibridación incluyen, por ejemplo, la hibridación de Southern u otra hibridación de ácido nucleico (Kawai et al., *Mol. Cell. Biol.* 14:7421-7427, 1994; Gonzalo et al., *Cancer Res* 57:594-599, 1997).

Las condiciones de hibridación adecuadas se determinan en función de la temperatura de fusión (T_m) de un dúplex de ácido nucleico que comprende la sonda. El experto en la técnica sabrá que las condiciones óptimas de reacción de hibridación deben determinarse empíricamente para cada sonda, aunque se pueden aplicar algunas generalidades. Preferiblemente, las hibridaciones que emplean sondas de oligonucleótidos cortas se realizan con una rigurosidad baja a media. En el caso de una sonda o cebador rico en GC o una sonda o cebador más largo, se prefiere una hibridación y/o lavado de alta rigurosidad. Una rigurosidad alta se define en la presente memoria como una hibridación y/o lavado realizados en aproximadamente 0,1 x tampón SSC y/o SDS a aproximadamente 0,1% (p/v), o una menor concentración de sal, y/o a una temperatura de al menos 65°C, o condiciones equivalentes. La referencia en la presente memoria a un nivel de rigurosidad concreto abarca condiciones equivalentes utilizando soluciones de lavado/hibridación distintas de SSC conocidas por los expertos en la técnica.

De acuerdo con el presente ejemplo, una diferencia en los fragmentos producidos para la muestra de prueba y una muestra de control negativo es indicativa de que el sujeto tiene una neoplasia. De manera similar, en los casos en los que la muestra de control comprende datos de un tumor, tejido canceroso o una célula cancerosa o una célula precancerosa, la similitud, aunque no necesariamente una identidad absoluta, entre la muestra de prueba y la muestra de control es indicativa de un diagnóstico positivo (es decir, cáncer).

Formatos de ensayo de amplificación

En un ejemplo alternativo, los fragmentos producidos por la enzima de restricción se detectan utilizando un sistema de amplificación, tal como, por ejemplo, reacción en cadena de la polimerasa (PCR), amplificación por círculo

rodante (RCA), reacción en cadena de la polimerasa inversa (iPCR), PCR in situ (Singer-Sam et al., *Nucl. Acids Res.* 18:687, 1990), amplificación por desplazamiento de la hebra (SDA) o tecnología de reciclado de hibridación de sondas "Cycling Probe Technology".

Los métodos de PCR son conocidos en la técnica y son descritos, p. ej., por McPherson et al. PCR: A Practical Approach, (Series eds., D. Rickwood y BD Hames), IRL Press Limited, Oxford, pág 1-253, 1991 y por Dieffenbach (ed) y Dveksler (ed) (En: PCR Primer: A Laboratory Manual, Cold Spring Harbor Laboratories, NY, 1995). En general, para la PCR, dos moléculas cebadoras de ácido nucleico no complementarias que comprenden al menos aproximadamente 18 nucleótidos de longitud, y más preferiblemente al menos 20-30 nucleótidos de longitud, se hibridan con diferentes hebras de una molécula molde de ácido nucleico en sus respectivos sitios de reasociación, y las copias de las moléculas de ácido nucleico específicas del molde que intervienen en los sitios de reasociación se amplifican enzimáticamente. Los productos de amplificación pueden ser detectados, por ejemplo, utilizando electroforesis y detección con un marcador detectable que se une a los ácidos nucleicos. Alternativamente, uno o más de los oligonucleótidos están marcados con un marcador detectable (p. ej., un fluoróforo) y el producto de amplificación se detecta utilizando, por ejemplo, un Lightcycler (Perkin Elmer, Wellesley, Mass., EE.UU., Roche Applied Science, Indianápolis, IN, EE.UU.).

La amplificación por desplazamiento de hebra (SDA) utiliza cebadores oligonucleotídicos, una ADN polimerasa y una endonucleasa de restricción para amplificar una secuencia diana. Los oligonucleótidos se hibridan con un ácido nucleico diana y la polimerasa se utiliza para producir una copia de la región que intervienen en los sitios de reasociación del cebador. Los dúplex de ácido nucleico copiado y ácido nucleico diana se mellan a continuación con una endonucleasa que reconoce específicamente una secuencia al comienzo del ácido nucleico copiado. La ADN polimerasa reconoce el ADN mellado y produce otra copia de la región diana al mismo tiempo que desplaza el ácido nucleico generado previamente. La ventaja de la SDA es que se produce en un formato isotérmico, lo que facilita el análisis automatizado de alto rendimiento.

La tecnología de reciclado de hibridación de sondas utiliza un cebador sintético químico que comprende ADN-ARN-ADN que es capaz de hibridar con una secuencia diana. Tras la hibridación con una secuencia diana, el dúplex de ARN-ADN formado es una diana para ARNasaH, que escinde de ese modo el cebador. El cebador escindido se detecta a continuación, por ejemplo, utilizando espectrometría de masas o electroforesis.

Para los cebadores que flanquean o son adyacentes a un sitio de reconocimiento de endonucleasas sensibles a la metilación, se prefiere que tales cebadores flanqueen solo aquellos sitios que están hipermetilados en la neoplasia para asegurar que se produzca un producto de amplificación de diagnóstico. A este respecto, solo se producirá un producto de amplificación cuando el sitio de restricción no esté escindido, es decir, cuando esté metilado. Por consiguiente, la detección de un producto de amplificación indica que los dinucleótidos CpG de interés están metilados.

Como sabrá el experto en la técnica, la longitud precisa del producto amplificado variará dependiendo de la distancia entre los cebadores. Claramente, esta forma de análisis puede utilizarse para determinar el estado de metilación de una pluralidad de dinucleótidos CpG siempre que cada dinucleótido esté dentro de un sitio de endonucleasas de restricción sensible a la metilación. En estos métodos, uno o más de los cebadores se pueden marcar con un marcador detectable para facilitar la detección rápida de ácido nucleico amplificado, p. ej., un marcador fluorescente (p. ej., Cy5 o Cy3) o un radioisótopo (p. ej., ³²P).

Los ácidos nucleicos amplificados generalmente se analizan utilizando, por ejemplo, electroforesis en gel de agarosa no desnaturante, electroforesis en gel de poliácridamida no desnaturante, espectrometría de masas, cromatografía líquida (p. ej., HPLC o dHPLC) o electroforesis capilar (p. ej., MALDI-TOF). Los métodos de detección de alto rendimiento, tales como, por ejemplo, desorción/ionización láser asistida por matriz-tiempo de vuelo (MALDI-TOF), ionización por electropulverización (ESI), espectrometría de masas (incluida la espectrometría de masas en tándem, p. ej., LC MS/MS), tecnología de biosensor, tecnología de fibra óptica evanescente o tecnología de chip de ADN (p. ej., documento WO98/49557; WO96/17958; Fodor et al., *Science* 767-773, 1991; Patente de Estados Unidos Núm. 5.143.854; y Patente de Estados Unidos Núm. 5.837.832. Alternativamente, la amplificación de un ácido nucleico se puede controlar continuamente utilizando un método de análisis de curva de fusión como se describe en la presente memoria y/o, por ejemplo, en la Patente de Estados Unidos Núm. 6.174.670.

(c) Otros formatos de ensayo

En un ejemplo alternativo, el aumento de la metilación en una muestra se determina realizando un procedimiento que comprende tratar la cromatina que contiene el ácido nucleico con una cantidad de ADNasa I en condiciones suficientes para digerir el ácido nucleico y a continuación detectar los fragmentos producidos. Este formato de ensayo se basa en el entendimiento de que la cromatina que contiene ADN metilado, p. ej., ADN hipermetilado, tiene una conformación más cerrada que el ADN no hipermetilado y, como consecuencia, es menos susceptible a la digestión con endonucleasa por la ADNasa I.

De acuerdo con este método, se producen fragmentos de ADN de diferentes longitudes mediante digestión con ADNasa I de ADN metilado en comparación con el ADN no metilado. Tales fragmentos de ADN diferentes se

detectan, por ejemplo, utilizando un ensayo descrito anteriormente. Alternativamente, los fragmentos de ADN se detectan utilizando PCR-SSCP esencialmente como describen, por ejemplo, en Gregory y Feil *Nucleic Acids Res.*, 27, e32i-e32iv, 1999. Al adaptar la PCR-SSCP a la presente invención, se utilizan cebadores de amplificación que flanquean o comprenden uno o más dinucleótidos CpG en un ácido nucleico que son resistentes a la digestión con ADNasa I en una muestra de neoplasia pero no resistentes a la digestión con ADNasa I en una muestra de control sana/normal o una muestra de prueba sano/normal para amplificar los fragmentos generados por la ADNasa I. En este caso, la producción de un fragmento de ácido nucleico específico utilizando ADNasa I es diagnóstica de neoplasia, ya que el ADN no se degrada eficazmente. En contraste, el ADN molde de una muestra de un sujeto sano/normal se degrada por la acción de la ADNasa I y, como consecuencia, la amplificación no produce un producto de amplificación discreto. También se conocen en la técnica métodos alternativos a la PCR-SSCP, tales como por ejemplo, PCR-dHPLC y se contemplan en la presente invención.

(d) Mutagénesis selectiva de ADN no metilado

En un método alternativo, el aumento de metilación aumentada en una muestra se determina utilizando un procedimiento que comprende tratar el ácido nucleico con una cantidad de un compuesto que muta selectivamente un residuo de citosina no metilado dentro de un dinucleótido CpG en condiciones suficientes para inducir mutagénesis.

Los compuestos preferidos mutan la citosina a uracilo o timidina, tal como, por ejemplo, una sal bisulfito, p. ej., bisulfito de sodio o bisulfito de potasio (Frommer et al., *Proc. Natl. Acad. Sci. USA* 89, 1827-1831, 1992). Se sabe que el tratamiento con bisulfito del ADN distingue los residuos de citosina metilados de los no metilados, al mutar los residuos de citosina que no están protegidos por la metilación, incluyendo los residuos de citosina que no están dentro de un dinucleótido CpG o que están colocados dentro de un dinucleótido CpG que no está sujeto a metilación.

Detección basada en la secuencia

En un ejemplo, la presencia de uno o más nucleótidos mutados o el número de secuencias mutadas se determina secuenciando el ADN mutado. Una forma de análisis comprende amplificar el ácido nucleico mutado utilizando una reacción de amplificación descrita en la presente memoria, por ejemplo, PCR. A continuación, el producto amplificado se secuencia o clona directamente y el producto clonado se secuencia. Los métodos para secuenciar el ADN son conocidos en la técnica e incluyen, por ejemplo, el método de terminación de la cadena didesoxi o el método de Maxam-Gilbert (véanse Sambrook et al., *Molecular Cloning, A Laboratory Manual* (2ª Ed., CSHP, New York 1989) o Zyskind et al., *Recombinant DNA Laboratory Manual*, (Acad. Press, 1988)).

Puesto que el tratamiento del ácido nucleico con un compuesto, tal como, por ejemplo, el bisulfito da como resultado citosinas no metiladas que mutan a uracilo (y por lo tanto timidina después de un proceso de amplificación), el análisis de la secuencia determina la presencia o ausencia de un nucleótido metilado. Por ejemplo, al comparar la secuencia obtenida utilizando una muestra de control o una muestra que no ha sido tratada con bisulfito, o la secuencia de nucleótidos conocida de la región de interés con una muestra tratada facilita la detección de diferencias en la secuencia de nucleótidos. Se puede considerar que cualquier residuo de timina detectado en el sitio de una citosina en la muestra tratada en comparación con una muestra de control o no tratada está causado por una mutación como resultado del tratamiento con bisulfito. Los métodos adecuados para la detección de metilación utilizando la secuenciación de ácido nucleico tratado con bisulfito son descritos, por ejemplo, por Frommer et al., *Proc. Natl Acad Sci. USA* 89: 1827-1831, 1992 o Clark et al., *Nucl. Acids Res.* 22: 2990-2997, 1994.

En otro método, la presencia de un nucleótido mutado o no mutado en una muestra tratada con bisulfito se detecta mediante pirosecuenciación, tal como, por ejemplo, como describen Uhlmann et al., *Electrophoresis*, 23: 4072-4079, 2002. Esencialmente este método es una forma de secuenciación en tiempo real que utiliza un cebador que se hibrida con un sitio adyacente o cercano al sitio de una citosina que está metilada. Después de la hibridación del cebador y el molde en presencia de una ADN polimerasa, cada uno de los cuatro desoxinucleótidos trifosfato modificados se añade por separado de acuerdo con un orden de dispensación predeterminado. Solo se incorpora un nucleótido añadido que es complementario a la muestra tratada con bisulfito y se libera pirofosfato inorgánico (PPi). El PPi a continuación provoca una reacción que da como resultado la producción de niveles detectables de luz. Tal método, permite la determinación de la identidad de un nucleótido específico adyacente al sitio de hibridación del cebador.

Los métodos de pirosecuenciación en fase sólida se conocen en la técnica y han sido revisados, por ejemplo, por Landegren et al., *Genome Res.*, 8(8): 769-776, 1998. Tales métodos permiten la detección de alto rendimiento de la metilación de numerosos dinucleótidos CpG.

Un método relacionado para determinar la secuencia de un nucleótido tratado con bisulfito es la extensión del cebador de un solo nucleótido sensible a la metilación (Me-SnuPE) o SNaPmeth. Los métodos adecuados son descritos, por ejemplo, por Gonzalgo y Jones, *Nucl. Acids Res.*, 25:2529-2531 o Uhlmann et al., *Electrophoresis*, 23:4072-4079, 2002. Se utiliza un oligonucleótido que hibrida con la región de un ácido nucleico adyacente al sitio de una citosina que está metilada. Este oligonucleótido se utiliza a continuación en un protocolo de extensión de

cebadores con una polimerasa y un nucleotidodifosfato o un didesoxinucleotidotrifosfato libres que corresponde a cualquiera de las bases posibles que aparecen en este sitio después del tratamiento con bisulfito (es decir, timina o citosina). Preferiblemente, el nucleótido-difosfato está marcado con un marcador detectable (p. ej., un fluoróforo). Después de la extensión del cebador, los nucleotidosdifosfato marcados no unidos se separan, p.ej. utilizando cromatografía de exclusión por tamaño o electroforesis, o se hidrolizan, utilizando por ejemplo, fosfatasa alcalina, y se detecta la incorporación del nucleótido marcado al oligonucleótido, indicando la base que está presente en el sitio.

Claramente, otros métodos de secuenciación de alto rendimiento están abarcados por la presente invención. Tales métodos incluyen, por ejemplo, la minisequenciación en fase sólida (como describen, por ejemplo, Southern et al., *Genomics*, 13:1008-1017, 1992), o la minisequenciación con FRET (como describen, por ejemplo, Chen y Kwok, *Nucleic Acids Res.* 25:347-353, 1997).

Formato de ensayo basado en la endonucleasa de restricción

En un método, la presencia de una secuencia no mutada se detecta utilizando el análisis de restricción con bisulfito combinado (COBRA) esencialmente como describen Xiong y Laird, *Nucl. Acids Res.*, 25:2532-2534, 2001. Este método explota las diferencias en los sitios de reconocimiento de enzimas de restricción entre el ácido nucleico metilado y desmetilado después del tratamiento con un compuesto que muta selectivamente un residuo de citosina no metilado, p. ej., bisulfito.

Después del tratamiento con bisulfito, una región de interés que comprende uno o más dinucleótidos CpG que están metilados y están incluidos en una secuencia de reconocimiento de endonucleasas de restricción se amplifica utilizando una reacción de amplificación descrita en la presente memoria, p.ej., PCR. El producto amplificado se pone en contacto a continuación con la enzima de restricción que escinde en el sitio del dinucleótido CpG durante un tiempo y en condiciones suficientes para que se produzca la escisión. Se puede seleccionar un sitio de restricción para indicar la presencia o ausencia de metilación. Por ejemplo, la endonucleasa de restricción TaqI escinde la secuencia TCGA, después del tratamiento con bisulfito de un ácido nucleico no metilado, la secuencia será TTGA y, como consecuencia, no se escindirán. El ácido nucleico digerido y/o no digerido se detecta a continuación utilizando un medio de detección conocido en la técnica, tal como, por ejemplo, electroforesis y/o espectrometría de masas. La escisión o no escisión del ácido nucleico es indicativa de cáncer en un sujeto. Claramente, este método puede emplearse en un sistema de lectura positiva o lectura negativa para el diagnóstico de un cáncer.

Formato de ensayo de lectura positiva

En una realización, el formato de ensayo de la invención comprende un sistema de lectura positiva en el que el ADN de una muestra que se ha tratado, por ejemplo, con bisulfito se detecta como una señal positiva. Preferiblemente, el ADN no hipermetilado de un sujeto de control sano o normal no se detecta o solo se detecta débilmente.

En una realización preferida, el aumento de metilación en una muestra sujeto se determina utilizando un procedimiento que comprende:

- (i) tratar el ácido nucleico con una cantidad de un compuesto que muta selectivamente un residuo de citosina no metilado en condiciones suficientes para inducir mutagénesis produciendo así un ácido nucleico mutado;
- (ii) hibridar un ácido nucleico con una sonda o cebador que comprende una secuencia de nucleótidos que es complementaria a una secuencia que comprende un residuo de citosina metilado en condiciones tales que se produce una hibridación selectiva con el ácido nucleico no mutado; y
- (iii) detectar la hibridación selectiva.

En este contexto, el término "hibridación selectiva" significa que la hibridación de una sonda o cebador al ácido nucleico no mutado ocurre a una frecuencia o tasa más alta, o tiene una velocidad de reacción máxima más alta, que la hibridación de la misma sonda o cebador a la secuencia mutada correspondiente. Preferiblemente, la sonda o cebador no hibrida con la secuencia no metilada que porta la mutación o mutaciones en las condiciones de reacción utilizadas.

Formato de ensayo basado en hibridación

En una realización, la hibridación se detecta utilizando hibridación de Southern, transferencia puntual, transferencia en ranura u otros medios de hibridación de ácido nucleico (Kawai et al., *Mol. Cell. Biol.* 14:7421 - 7427, 1994; Gonzalgo et al., *Cancer Res.* 57:594-599, 1997). Sujeto a la selección apropiada de la sonda, tales formatos de ensayo se describen generalmente en la presente memoria anteriormente y se aplican mutatis mutandis al enfoque de mutagénesis selectiva actualmente descrito.

Preferiblemente, se emplea un formato de reacción en cadena de la ligasa para distinguir entre un ácido nucleico mutado y no mutado. La reacción en cadena de la ligasa (descrita en el documento EP 320.308 y en la Patente de Estados Unidos Núm. 4.883.750) utiliza al menos dos sondas de oligonucleótidos que se reasocian con un ácido

nucleico diana de tal manera que se yuxtaponen sobre el ácido nucleico diana. En un ensayo de reacción en cadena de la ligasa, el ácido nucleico diana se hibrida a una primera sonda que es complementaria a una porción diagnóstica de la secuencia diana (la sonda diagnóstica), p. ej., un ácido nucleico que comprende uno o más dinucleótidos CpG metilados, y con una segunda sonda que es complementaria a una secuencia de nucleótidos contigua a la porción diagnóstica (la sonda contigua), en condiciones en las que la sonda diagnóstica permanece unida sustancialmente solo al ácido nucleico diana. Las sondas diagnósticas y contiguas pueden ser de diferentes longitudes y/o tener diferentes temperaturas de fusión, de modo que la rigurosidad de la hibridación se puede ajustar para permitir su hibridación selectiva con la diana, en donde la sonda que tiene la mayor temperatura de fusión se hibrida con mayor rigurosidad y después del lavado para eliminar la sonda no unida y/o la sonda unida no selectivamente, la otra sonda que tiene la temperatura de fusión más baja se hibrida a una menor rigurosidad. La sonda diagnóstica y la sonda contigua se ligan a continuación covalentemente, tal como, por ejemplo, utilizando la ADN ligasa T4, para producir así una sonda diana más grande que es complementaria a la secuencia diana, y las sondas que no están ligadas se eliminan modificando la rigurosidad de hibridación. A este respecto, las sondas que no se han ligado se hibridarán selectivamente en condiciones de hibridación de menor rigurosidad que las sondas que se han ligado. Por consiguiente, la rigurosidad de la hibridación se puede aumentar hasta una rigurosidad que es al menos tan alta como la rigurosidad utilizada para hibridar la sonda más larga, y preferiblemente a una rigurosidad mayor debido al aumento de la longitud al que contribuye la sonda más corta después de la ligación.

En otro ejemplo, una o ambas sondas se marcan de tal manera que se pueda someter a prueba la presencia o ausencia de la secuencia diana fundiendo el dúplex sonda-diana, eluyendo la sonda disociada y sometiendo a prueba la marca o las marcas. Cuando ambas sondas se marcan, se utilizan diferentes ligandos para permitir la distinción entre las sondas ligadas y no ligadas, en cuyo caso la presencia de ambas marcas en la misma fracción del eluato confirma el evento de ligación. Si el ácido nucleico diana está unido a una matriz sólida, p. ej., en un formato de ensayo de hibridación de Southern, transferencia en ranura, transferencia puntual o microchip, la presencia de las sondas tanto diagnósticas como contiguas se puede determinar directamente.

Las micromatrices específicas de metilación (MSO) también son útiles para diferenciar entre una secuencia mutada y una no mutada. Un método adecuado es descrito, por ejemplo, por Adorjan et al. *Nucl. Acids Res.*, 30: e21, 2002. La MSO utiliza ácido nucleico que ha sido tratado con un compuesto que muta selectivamente un residuo de citosina no metilado (p. ej., bisulfito) como molde para una reacción de amplificación que amplifica el ácido nucleico tanto mutante como no mutado. La amplificación se lleva a cabo con al menos un cebador que comprende una marca detectable, tal como, por ejemplo, un fluoróforo, por ejemplo, Cy3 o Cy5.

Para producir una micromatriz para la detección de ácido nucleico mutado, los oligonucleótidos se aplica, por ejemplo, sobre un portaobjetos de vidrio, preferiblemente, con un grado de redundancia (por ejemplo, como describen Golub et al., *Science*, 286:531-537, 1999). Preferiblemente, para cada dinucleótido CpG analizado se utilizan dos oligonucleótidos diferentes. Cada oligonucleótido comprende una secuencia N2-16CGN2-16 o N2-16TGN2-16 (en donde N es el número de nucleótidos adyacentes o yuxtapuestos al dinucleótido CpG de interés) que refleja el estado metilado o no metilado de los dinucleótidos CpG.

Los productos de amplificación marcados se hibridan a continuación con los oligonucleótidos en la micromatriz en condiciones que permiten la detección de diferencias de un solo nucleótido. Después del lavado para eliminar el producto de amplificación no unido, la hibridación se detecta utilizando, por ejemplo, un escáner de micromatrices. Este método no solo permite determinar el estado de metilación de un gran número de dinucleótidos CpG, sino que también es semicuantitativo, lo que permite la determinación del grado de metilación en cada dinucleótido CpG analizado. Como puede haber cierto grado de heterogeneidad de la metilación en una sola muestra, tal cuantificación puede ayudar en el diagnóstico de cáncer.

Formato de ensayo basado en amplificación

En un ejemplo alternativo, la hibridación se detecta utilizando un sistema de amplificación. En formatos de PCR específicos de metilación (MSP; Herman et al. *Proc. Natl. Acad. Sci. USA* 93:9821-9826, 1992), la hibridación se detecta utilizando un procedimiento que comprende amplificar el ADN tratado con bisulfito. Por consiguiente, al utilizar una o más sondas o cebadores que se reasocian específicamente con la secuencia no mutada en condiciones de rigurosidad moderada y/o alta, solo se produce un producto de amplificación utilizando una muestra que comprende un nucleótido metilado. Cottrell et al., *Nucl. Acids Res.* 32: e10, 2003 (HeavyMethyl PCR), Rand et al. *Nucl. Acids Res.* 33: e127, 2005 (Headloop PCR), Rand et al. *Epigenetics* 1: 94-100, 2006 (Bisulfite Differential Denaturation PCR) y documento PCT/AU07/000389 (End-specific PCR) proporcionan ensayos alternativos para proporcionar una amplificación selectiva del componente metilado o desmetilado a partir de una mezcla de ADN tratado con bisulfito.

Se puede utilizar cualquier formato de ensayo de amplificación descrito en la presente memoria, tal como, por ejemplo, reacción en cadena de la polimerasa (PCR), amplificación por círculo rodante (RCA), reacción en cadena de la polimerasa inversa (iPCR), PCR in situ (Singer-Sam et al., *Nucl Acids Res.* 18, 687, 1990), amplificación por desplazamiento de cadena o tecnología de reciclado de hibridación de sondas. Se han desarrollado técnicas de PCR para la detección de mutaciones génicas (Kuppuswamy et al., *Proc. Natl. Acad. Sci. USA* 88:1143-1147, 1991) y la cuantificación de la expresión específica alélica (Szabo y Mann, *Genes Dev.* 9: 3097-3108, 1995; y Singer-Sam et

al., *PCR Methods Appl.* 1: 160-163, 1992). Dichas técnicas utilizan cebadores internos, que se reasocian con un molde generada por PCR y terminan inmediatamente 5' del único nucleótido que se vaya a someter a ensayo. Tal formato se combina fácilmente con la reacción en cadena de la ligasa como se describe en la presente memoria anteriormente. El uso de un formato de ensayo cuantitativo en tiempo real también es útil. Sujeto a la selección de cebadores apropiados, tales formatos de ensayo se describen generalmente en la presente memoria anteriormente y se aplican mutatis mutandis al enfoque de mutagénesis selectiva actualmente descrito.

También se contempla en la presente invención el análisis de la curva de fusión específico de la metilación (esencialmente como describe en Worm et al., *Clin. Chem.*, 47:1183-1189, 2001). Este procedimiento explota la diferencia en la temperatura de fusión en los productos de amplificación producidos utilizando ácido nucleico metilado o desmetilado tratado con bisulfito. En esencia, la amplificación no discriminatoria de una muestra tratada con bisulfito se realiza en presencia de un colorante fluorescente que se une específicamente al ADN de doble hebra (p. ej., SYBR Green I). Al aumentar la temperatura del producto de amplificación mientras se controla la fluorescencia, se determinan las propiedades de fusión y, por lo tanto, la secuencia del producto de amplificación. Una disminución de la fluorescencia refleja la fusión de al menos un dominio en el producto de amplificación. La temperatura a la que disminuye la fluorescencia es indicativa de la secuencia de nucleótidos del ácido nucleico amplificado, lo que permite determinar el nucleótido en el sitio de uno o más dinucleótidos CpG. Como la secuencia de los ácidos nucleicos se amplifica utilizando la presente invención

La presente invención también abarca el uso de formas cuantitativas en tiempo real de PCR, tales como, por ejemplo, TaqMan (Holland et al., *Proc. Natl. Acad. Sci. USA*, 88:7276-7280, 1991; Lee et al., *Nucleic Acid Res.* 21:3761-3766, 1993) para realizar esta realización. Por ejemplo, el método MethylLight de Eads et al., *Nucl. Acids Res.* 28: E32, 2000 utiliza un ensayo TaqMan modificado para detectar la metilación de un dinucleótido CpG. Esencialmente, este método comprende tratar una muestra de ácido nucleico con bisulfito y amplificar ácido nucleico que comprende uno o más dinucleótidos CpG que están metilados en una célula neoplásica y no en una muestra de control utilizando una reacción de amplificación, p. ej., PCR. La reacción de amplificación se realiza en presencia de tres oligonucleótidos, un cebador directo e inverso que flanquea la región de interés y una sonda que hibrida entre los dos cebadores con el sitio de uno o más dinucleótidos CpG metilados. La sonda está doblemente marcada con un indicador fluorescente 5' y un extintor 3' (o viceversa). Cuando la sonda está intacta, el colorante extintor absorbe la fluorescencia del indicador debido a su proximidad. Tras la reasociación del producto de la PCR, la sonda se escinde por la actividad exonucleasa 5' a 3' de, por ejemplo, de una ADN polimerasa Taq. Esta escisión libera el indicador del extintor, lo que da como resultado un aumento de la señal de fluorescencia que se puede utilizar para estimar el nivel inicial de metilación del molde. Al utilizar una sonda o cebador que hibrida selectivamente con ácido nucleico no mutado (es decir, ácido nucleico metilado), se determina el nivel de metilación, p. ej., utilizando una curva patrón.

Alternativamente, en lugar de utilizar una sonda marcada que requiere escisión, se utiliza una sonda tal como, por ejemplo, una Baliza Molecular (véase, por ejemplo, Mhlanga y Malmberg, *Methods* 25: 463-471, 2001). Las balizas moleculares son moléculas de ácido nucleico de hebra sencilla con una estructura de tallo y bucle. La estructura del bucle es complementaria a la región que rodea los uno o más dinucleótidos CpG que están metilados en una muestra neoplásica y no en una muestra de control. La estructura del tallo se forma al reasociar dos "brazos" complementarios entre sí, que están a cada lado de la sonda (bucle). Un radical fluorescente está unido a un brazo y un radical de extinción que suprime cualquier fluorescencia detectable cuando la baliza molecular no está unida a una secuencia diana está unida al otro brazo. Tras la unión de la región bucle a su ácido nucleico diana, los brazos se separan y la fluorescencia es detectable. Sin embargo, incluso un emparejamiento erróneo de una sola base altera significativamente el nivel de fluorescencia detectado en una muestra. En consecuencia, La presencia o ausencia de una base concreta se determina por el nivel de fluorescencia detectado. Dicho ensayo facilita la detección de uno o más sitios no mutados (es decir, nucleótidos metilados) en un ácido nucleico.

Las moléculas de ácido nucleico bloqueado (LNA) marcadas con fluorescencia o las moléculas de ácido péptidonucleico (PNA) marcadas con fluorescencia son útiles para la detección de diferencias de nucleótidos (p. ej., como describen Simeonov y Nikiforov, *Nucleic Acids Research*, 30(17):1-5, 2002). Las moléculas de LNA y PNA se unen, con alta afinidad, al ácido nucleico, en particular, al ADN.

Los fluoróforos (en particular, rodamina o hexaclorofluoresceína) conjugados con la sonda de LNA o PNA presentan fluorescencia a un nivel significativamente mayor al hibridar la sonda con el ácido nucleico diana. Sin embargo, el nivel de aumento de la fluorescencia no se potencia al mismo nivel cuando se produce incluso un emparejamiento erróneo de un solo nucleótido. Por consiguiente, el grado de fluorescencia detectada en una muestra es indicativo de la presencia de un emparejamiento erróneo entre la sonda de LNA o PNA y el ácido nucleico diana, tal como, en presencia de una citosina mutada en un dinucleótido CpG metilado. Preferiblemente, la tecnología de LNA o PNA marcados con fluorescencia se utiliza para detectar al menos un cambio de una sola base en un ácido nucleico que se ha amplificado previamente utilizando, por ejemplo, un método de amplificación conocido en la técnica y/o descrito en la presente memoria.

Como será evidente para el experto en la técnica, la tecnología de detección de LNA o PNA es susceptible de una detección de alto rendimiento de uno o más marcadores al inmovilizar una sonda de LNA o PNA sobre un soporte sólido, como describen Orum et al., *Clin. Chem.* 45:1898-1905, 1999.

Alternativamente, se utiliza un ensayo en tiempo real, tal como, por ejemplo, el denominado ensayo HeavyMethyl (Cottrell et al., *Nucl. Acids Res.* 32: e10, 2003) para determinar la presencia o el nivel de metilación del ácido nucleico en una muestra de prueba. Esencialmente, este método utiliza uno o más bloqueadores de ácido nucleico no extensibles (p. ej., oligonucleótidos) que se unen al ácido nucleico tratado con bisulfito de una manera específica de la metilación (es decir, el bloqueador o los bloqueadores se unen específicamente al ADN no mutado en condiciones de severidad de moderada a alta). Se realiza una reacción de amplificación utilizando uno o más cebadores que pueden ser opcionalmente específicos de metilación pero que flanquean los uno o más bloqueadores. En presencia de ácido nucleico desmetilado (es decir, ADN no mutado), el bloqueador o los bloqueadores se unen y no se produce ningún producto de PCR. Utilizando un ensayo TaqMan esencialmente como se describe anteriormente, se determina el nivel de metilación del ácido nucleico en una muestra.

Otros métodos basados en la amplificación para detectar ácido nucleico metilado después del tratamiento con un compuesto que muta selectivamente un residuo de citosina no metilado incluyen, por ejemplo, el análisis de conformación de hebra sencilla específica de metilación (MS-SSCA) (Bianco et al., *Hum. Mutat.*, 14:289-293, 1999), electroforesis en gel de gradiente desnaturizante específico de metilación (MS-DGGE) (Abrams y Stanton, *Methods Enzymol.* 212:71-74, 1992) y cromatografía líquida de alto rendimiento para desnaturalización específica de metilación (MS-DHPLC) (Deng et al. *Chin. J. Cancer Res.*, 12:171-191, 2000). Cada uno de estos métodos utiliza diferentes técnicas para detectar diferencias de ácidos nucleicos en un producto de amplificación basado en diferencias en la secuencia de nucleótidos y/o la estructura secundaria. Tales métodos están claramente contemplados por la presente invención.

Al igual que con otros formatos de ensayo basados en la amplificación, el producto de la amplificación se analiza mediante una gama de procedimientos, que incluyen electroforesis en gel, filtración en gel, espectrometría de masas y, en el caso de cebadores marcados, identificando la marca en el producto de amplificación. En una realización alternativa, la digestión con enzimas de restricción de productos de PCR amplificados a partir de ADN convertido con bisulfito se realiza esencialmente como describen Sadri y Hornsby, *Nucl. Acids Res.* 24:5058-5059, 1996; y Xiong y Laird, *Nucl. Acids Res.* 25:2532-2534, 1997), para analizar el producto formado.

También se pueden emplear métodos de detección de alto rendimiento, tales como, por ejemplo, desorción/ionización láser asistida por matriz-tiempo de vuelo (MALDI-TOF), ionización por electropulverización (ESI), espectrometría de masas (incluida la espectrometría de masas en tándem, por ejemplo, LC MS/MS), tecnología de biosensores, tecnología de fibra óptica evanescente o tecnología de chip de ADN.

Al igual que con los otros formatos de ensayo descritos en la presente memoria que utilizan sistemas de detección de hibridación y/o amplificación, las combinaciones de tales procedimientos descritos en la presente memoria más arriba se contemplan particularmente mediante los formatos de ensayo basados en mutagénesis selectiva de la presente invención. En un ejemplo, el aumento de la metilación se detecta al realizar un procedimiento que comprende:

- (i) tratar el ácido nucleico con una cantidad de un compuesto que muta selectivamente un residuo de citosina no metilado dentro de un dinucleótido CpG en condiciones suficientes para inducir mutagénesis produciendo así un ácido nucleico mutado;
- (ii) hibridar el ácido nucleico con dos cebadores no solapantes y no complementarios, cada uno de los cuales comprende una secuencia de nucleótidos que es complementaria a una secuencia en el ADN que comprende un residuo de citosina metilada en condiciones tales que se produce la hibridación con el ácido nucleico no mutado;
- (iii) amplificar el ácido nucleico que interviene en los cebadores hibridados, produciendo de ese modo un fragmento de ADN que consiste en una secuencia que comprende una secuencia cebadora;
- (iv) hibridar el fragmento de ADN amplificado con una sonda que comprende una secuencia de nucleótidos que corresponde o es complementaria a una secuencia que comprende un residuo de citosina metilado en condiciones tales que se produce la hibridación con el ácido nucleico no mutado; y detectar la hibridación.

Ensayos de lectura negativa

En otro ejemplo, el formato del ensayo comprende un sistema de lectura negativa en el que la reducción de la metilación del ADN de una muestra de control sana/normal se detecta como una señal positiva y, preferiblemente, el ADN metilado de una muestra neoplásica no se detecta o solo se detecta débilmente.

En una realización preferida, la reducción de la metilación se determina utilizando un procedimiento que comprende:

- (i) tratar el ácido nucleico con una cantidad de un compuesto que muta selectivamente un residuo de citosina no metilado dentro de una isla CpG en condiciones suficientes para inducir mutagénesis produciendo así un ácido nucleico mutado;

- (ii) hibridar el ácido nucleico con una sonda o cebador que comprende una secuencia de nucleótidos que es complementaria a una secuencia que comprende el residuo de citosina mutado en condiciones tales que se produce una hibridación selectiva con el ácido nucleico mutado; y
- (iii) detectar la hibridación selectiva.

5 En este contexto, el término "hibridación selectiva" significa que la hibridación de una sonda o cebador con el ácido nucleico mutado se produce a una frecuencia o tasa más alta, o tiene una velocidad de reacción máxima más alta, que la hibridación de la misma sonda o cebador con la secuencia no mutada correspondiente. Preferiblemente, la sonda o cebador no se hibrida con la secuencia metilada (o secuencia no mutada) en las condiciones de reacción utilizadas.

10 Formato de ensayo basado en hibridación

En una realización, la hibridación se detecta utilizando medios de hibridación de Southern, transferencia puntual, transferencia en ranura u otros medios de hibridación de ácido nucleico (Kawai et al., *Mol Cell. Biol.* 14:7421-7427, 1994; Gonzalgo et al., *Cancer Res.* 57:594-599, 1997). Sujetos a la selección apropiada de la sonda, tales formatos de ensayo se describen generalmente en la presente memoria anteriormente y se aplican mutatis mutandis al enfoque de mutagénesis selectiva actualmente descrito. Preferiblemente, se emplea un formato de reacción en cadena de la ligasa para distinguir entre un ácido nucleico no mutado y mutado. A este respecto, los requisitos y condiciones del ensayo son los descritos anteriormente en la presente memoria para ensayos de lectura positiva y se aplican mutatis mutandis al formato actual. Sin embargo, la selección de las sondas será diferente. Para ensayos de lectura negativa, se seleccionan una o más sondas que hibridan selectivamente con la secuencia mutada en lugar de con la secuencia no mutada.

Preferiblemente, la sonda o las sondas de reacción en cadena de la ligasa que tienen secuencias 3'-terminales y/o 5'-terminales que comprenden un dinucleótido CpG que no está metilado en una muestra de control sana, pero está hipermetilada en el cáncer, de modo que la sonda diagnóstica y la sonda contigua se pueden ligar solo cuando la citosina del dinucleótido CpG se muta a timidina, p. ej., en el caso de un residuo de citosina no metilado.

25 Como resultará evidente para el experto en la técnica, el método MSO descrito anteriormente es susceptible de uno o ambos ensayos de lectura positiva y/o negativa. Esto se debe a que el ensayo descrito detecta tanto las secuencias mutadas como las no mutadas, lo que facilita la determinación del nivel de metilación. Sin embargo, la invención contempla un ensayo que detecta únicamente secuencias metiladas o no metiladas.

Formato de ensayo basado en amplificación

30 En un ejemplo alternativo, la hibridación se detecta utilizando un sistema de amplificación que utiliza cualquier formato de ensayo de amplificación como se describe en la presente memoria para el análisis de lectura positiva, aunque utilizando cebadores (y sondas, cuando corresponda), que hibridan selectivamente con un ácido nucleico mutado.

35 Al adaptar el ensayo HeavyMethyl descrito anteriormente a un formato de lectura negativa, los bloqueadores que se unen al ácido nucleico tratado con bisulfito de una manera específica de la metilación se unen específicamente al ADN mutado en condiciones de rigurosidad de moderada a alta. Se realiza una reacción de amplificación utilizando uno o más cebadores que pueden ser opcionalmente específicos de la metilación (es decir, solo se unen al ácido nucleico mutado) pero que flanquean los uno o más bloqueadores. En presencia de ácido nucleico metilado (es decir, ADN mutado), el bloqueador o los bloqueadores se unen y no se produce ningún producto de PCR.

40 En un ejemplo, la reducción de la metilación en el sujeto de control normal/sano se detecta al realizar un procedimiento que comprende:

- (i) tratar el ácido nucleico con una cantidad de un compuesto que muta selectivamente los residuos de citosina no metilados en condiciones suficientes para inducir la mutagénesis, produciendo así un ácido nucleico mutado;
- 45 (ii) hibridar el ácido nucleico con dos cebadores no solapantes y no complementarios, cada uno de los cuales comprende una secuencia de nucleótidos que es complementaria a una secuencia en el ADN que comprende un residuo de citosina mutado en condiciones tales que se produce la hibridación con el ácido nucleico mutado;
- (iii) 50 amplificar el ácido nucleico que interviene en los cebadores hibridados, produciendo así un fragmento de ADN que consiste en una secuencia que comprende una secuencia cebadora;
- (iv) hibridar el fragmento de ADN amplificado con una sonda que comprende una secuencia de nucleótidos que corresponde o es complementaria a una secuencia que comprende un residuo de citosina mutado en condiciones tales que se produce la hibridación con el ácido nucleico mutado; y
- (v) Detectar la hibridación.

Como resultará evidente para el experto en la técnica, un ensayo de lectura negativa incluye preferiblemente una muestra de control adecuada para asegurar que el resultado negativo sea causado por el ácido nucleico metilado en lugar de por un fallo en la reacción.

5 Esta invención también proporciona kits para la detección y/o cuantificación de las secuencias diagnósticas de la invención, o la expresión o metilación de las mismas utilizando los métodos descritos en la presente memoria.

Para los kits para la detección de la metilación, los kits de la invención pueden comprender al menos un polinucleótido que hibrida con al menos una de las secuencias diagnósticas de la invención y al menos un reactivo para la detección de la metilación del gen. Los reactivos para la detección de la metilación incluyen, p. ej., bisulfito de sodio, polinucleótidos diseñados para hibridar con una secuencia que es el producto de una secuencia biomarcadora de la invención si la secuencia biomarcadora no está metilada (p. ej., que contiene al menos una conversión C→U), y/o una enzima de restricción sensible a la metilación o dependiente de la metilación. Los kits también pueden incluir secuencias de ADN natural o sintético de control que representan formas metiladas o desmetiladas de la secuencia. Los kits pueden proporcionar soportes sólidos en forma de un aparato de ensayo que está adaptado para su uso en el ensayo. Los kits pueden comprender adicionalmente marcas detectables, opcionalmente conectadas a un polinucleótido, p. ej., una sonda, en el kit. También se pueden incluir en los kits otros materiales útiles en el funcionamiento de los ensayos, incluyendo tubos de ensayo, pipetas de transferencia y similares. Los kits también pueden incluir instrucciones escritas para el uso de uno o más de estos reactivos en cualquiera de los ensayos descritos en la presente memoria.

20 Como se detalla aquí anteriormente, la hipermetilación está asociada con el silenciamiento transcripcional. En consecuencia, además del aumento del nivel de metilación de estos genes que proporciona una base sobre la cual se puede detectar la predisposición o el inicio de una neoplasia de intestino grueso, la regulación a la baja en el nivel de expresión de estos genes también es valiosa para el diagnóstico. De acuerdo con este aspecto de la presente invención, la referencia a un gen "producto de expresión" o "expresión de un gen" es una referencia a un producto de transcripción (tal como ARN primario o ARNm) o un producto de traducción tal como proteína. En este sentido, se pueden evaluar los cambios en el nivel de expresión de un gen, ya sea mediante el escrutinio de los cambios en el nivel del producto de expresión que se produce (es decir, ARN o proteína), los cambios en las proteínas de la cromatina con las que está asociado el gen, por ejemplo, la presencia de histona H3 metilada en la lisina en la posición del aminoácido número 9 o 27 (modificaciones represivas) o los cambios en el propio ADN que actúa para regular a la baja la expresión, tales como cambios en la metilación del ADN. Estos genes y sus productos de expresión génica, ya sean transcritos de ARN, cambios en el ADN que actúan regulando a la baja la expresión o proteínas codificadas, se denominan colectivamente "marcadores neoplásicos".

Por consiguiente, otro aspecto de la presente invención se refiere a un método para escrutar la aparición o la predisposición a la aparición o el seguimiento de una neoplasia de intestino grueso en un individuo, comprendiendo dicho método evaluar el nivel de expresión de una región de ADN seleccionada entre:

35 (i) la región definida por una o más cualesquiera de las coordenadas Hg19 y 2kb aguas arriba del sitio de inicio de la transcripción:

- | | |
|-----------------------------------|---------------------------------|
| (1) chr12:52400748..52409671 | (34) chr10:101292690..101296281 |
| (2) chr5:3596168..3601517 | (35) chr4:4190530..4228621 |
| (3) chr13:95361876..95364389 | (36) chr12:54943404..54973023 |
| (4) chr4:81187742..81212171 | (37) chr5:176047210..176057557 |
| (5) chr19:57019212..57040270 | (38) chr12:22346325..22487648 |
| (6) chr3:33191537..33260707 | (39) chr19:56894648..56904889 |
| (7) chr15:60296421..60298142 | (40) chr20:21491648..21494664 |
| (8) chr13:28494168..28500451 | (41) chr1:50883225..50889141 |
| (9) chr7:96649702..96654143, | (42) chr7:27180996..27183287 |
| (10) chr8:140,811,770-141,537,860 | (43) chr11:2016406..2019065 |
| (11) chr5:2746279..2751769 | (44) chr14:57267425..57277184 |
| (12) chr18:55102917..55158530 | (45) chr4:126237567..126414087 |
| (13) chr20:37353101..37358016 | (46) chr8:23559964..23563922 |
| (14) chr8:2792875..4852328 | (47) chr10:131633547..131762091 |
| (15) chr16:66613351..66622178 | (48) chr4:62362839..62938168 |
| (16) chr5:37815753..37839782 | (49) chr1:47901689..47906363 |
| (17) chr1:63788730..63790797 | (50) chr17:77768176..77770890 |

- | | |
|---------------------------------|-----------------------------------|
| (18) chr15:37156644..37178734 | (51) chr17:93598762..93604831 |
| (19) chr7:27139973..27142394 | (52) chr1:33789224..33841194 |
| (20) chr20:21686297..21696620 | (53) chr9:124,004,679-124,030,840 |
| (21) chr16:51169886..51185183 | (54) chr4:158141736..158287227 |
| (22) chr12:85253267..85306606 | (55) chr12:9445136..9462559 |
| (23) chr8:6357172..6420784 | (56) chr12:24964278..25102308 |
| (24) chr14:85996488..86094270 | (57) chrX:21542357..21690352 |
| (25) chr2:182541194..182545381 | (58) chr20:52769988..52790516 |
| (26) chr7:30951468..30965131 | (59) chr3:172162951..172166203 |
| (27) chr8:131792547..132052835 | (60) chr13:28366780..28368089 |
| (28) chr3:128749292..128759583 | (61) chr7:50344378..50472799 |
| (29) chr10:101088856..101154087 | (62) chr7:149412148..149431664 |
| (30) chr7:27282164..27286192 | (63) chr7:24323809..24331477 |
| (31) chr10:129535538..129539450 | (64) chr4:30722037..31148421 |
| (32) chr19:49316274..49339934 | (65) chr10:47083534..47088320 |
| (33) chr6:391752..411443 | |

(ii) la región del gen, que incluye 2kb aguas arriba de uno más cualquiera de:

- | | | | |
|----------------|-----------------|--------------|--------------|
| (1) GRASP | (18) ANGPT2 | (35) NKX2-6 | (52) HOXA5 |
| (2) IRX1 | (19) LHX6 | (36) PAX1 | (53) GDNF |
| (3) SOX21 | (20) NEUROD1 | (37) FOXD2 | (54) FAT4 |
| (4) FGF5 | (21) AC149644.1 | (38) SLC6A15 | (55) HOXA2 |
| (5) ZNF471 | (22) CCDC48 | (39) PHC2 | (56) LPHN3 |
| (6) SUSP5 | (23) EVX1 | (40) FLRT2 | (57) ADCYAP1 |
| (7) FOXB1 | (24) GHSR | (41) GATA2 | (58) GRIA2 |
| (8) PDX1 | (25) HSD17B14 | (42) ADCY8 | (59) AQP1 |
| (9) DLX5 | (26) KRBA1 | (43) CNNM1 | (60) BCAT1 |
| (10) ONECUT2 | (27) OTOF1 | (44) IKZF1 | (61) CYP24A1 |
| (11) DMRTA2 | (28) PPYR1 | (45) NKX2-3 | (62) FOXI2 |
| (12) CMTM2 | (29) SRMS | (46) PCDH7 | (63) GSX1 |
| (13) OTX2 | (30) ZNF582 | (47) SNCB | (64) IRF4 |
| (14) LOC145845 | (31) IRX2 | (48) ST8SIA1 | (65) NPY |
| (15) EBF3 | (32) CSMD1 | (49) TRAPPC9 | (66) PDE1B |
| (16) SALL1 | (33) MIR675,H19 | (50) NKX2-2 | |
| (17) CBX8 | (34) FOXD3 | (51) SLC32A1 | |

5 en una muestra biológica de dicho individuo en donde un nivel más bajo de expresión de las regiones de ADN del grupo (i) y/o (ii) con respecto a los niveles de control es indicativo de una neoplasia de intestino grueso o una predisposición a la aparición de un estado neoplásico.

10 El método de este aspecto de la presente invención se basa en la comparación del nivel de los marcadores neoplásicos de una muestra biológica con los niveles de control de estos marcadores. El "nivel de control" puede ser un "nivel normal", que es el nivel de marcador expresado por una célula o una población celular del intestino grueso correspondiente que no es neoplásica.

Como se detalla en la presente memoria anteriormente, el nivel normal (o "no neoplásico") se puede determinar utilizando tejidos derivados del mismo individuo que es objeto de la prueba. Sin embargo, se apreciará que esto puede ser bastante invasivo para el individuo en cuestión y, por lo tanto, es probable que sea más conveniente analizar los resultados de las pruebas con respecto a un resultado patrón que refleje los resultados individuales o

colectivos obtenidos de personas distintas al paciente en cuestión.

Por lo tanto, se proporciona más concretamente un método para escrutar la aparición o la predisposición a la aparición o el seguimiento de una neoplasia de intestino grueso en un individuo, comprendiendo dicho método evaluar el nivel de expresión de uno o más genes o transcritos seleccionados entre:

- 5 (i) la región definida por una o más cualesquiera de las coordenadas Hg19 y 2kb aguas arriba del sitio de inicio de la transcripción:

(1) chr12:52400748..52409671	(6) chr3:33191537..33260707
(2) chr5:3596168..3601517	(7) chr15:60296421..60298142
(3) chr13:95361876..95364389	(8) chr13:28494168..28500451
(4) chr4:81187742..81212171	(9) chr7:96649702..96654143,
(5) chr19:57019212..57040270	

(ii) la región del gen, que incluye 2kb aguas arriba de uno o más cualesquiera de:

(1) GRASP	(4) FGF5	(6) SUSP5	(8) PDX1
(2) IRX1	(5) ZNF471	(7) FOXB1	(9) DLX5
(3) SOX21			

- 10 en una muestra biológica de dicho individuo en donde un nivel más bajo de expresión del gen o transcritos del grupo (i) y/o el grupo (ii) con respecto a los niveles de control es indicativo de una neoplasia de intestino grueso o una predisposición a la aparición de un estado neoplásico.

Preferiblemente, dicho nivel de control es un nivel no neoplásico.

- 15 Como se detalla en la presente memoria anteriormente, la presente invención está diseñada para escrutar una célula o población celular neoplásica, que está localizada en el intestino grueso. Por consiguiente, la referencia a "población celular o celular" se debe entender como una referencia a una célula individual o un grupo de células. Dicho grupo de células puede ser una población difusa de células, una suspensión celular, una población encapsulada de células o una población de células que adoptan la forma de tejido.

- 20 La referencia a "expresión" se debe entender como una referencia a la transcripción y/o traducción de una molécula de ácido nucleico. Se debe entender que la referencia a "ARN" abarca la referencia a cualquier forma de ARN, tal como ARN primario o ARNm o ARN no traducido (p. ej., miARN, etc.). Sin limitar la presente invención de ninguna manera, la modulación de la transcripción génica que conduce a un aumento o disminución de la síntesis de ARN también se puede correlacionar con la traducción de algunos de estos transcritos de ARN (tal como ARNm) para producir un producto proteico. Por consiguiente, la presente invención también se extiende a la metodología de
- 25 detección que se dirige al escrutinio de niveles o patrones modulados de los productos de la proteína marcadora neoplásica como indicador del estado neoplásico de una célula o población celular. Aunque el método consiste en escrutar transcritos de ARNm y/o el correspondiente producto proteico, se debe entender que la presente invención no está limitada a este respecto y se extiende al escrutinio de cualquier otra forma de producto de expresión marcador neoplásico, tal como, por ejemplo, un transcrito de ARN primario.

- 30 En términos de escrutinio para la regulación a la baja de la expresión de un marcador, el experto en la técnica también sabría que los cambios que son detectables a nivel de ADN son indicativos de cambios en la actividad de la expresión génica y, por lo tanto, cambios en los niveles de productos de expresión. Tales cambios incluyen, pero sin limitarse a, cambios en la metilación del ADN. En consecuencia, la referencia en la presente memoria a "escrutinio del nivel de expresión" y la comparación de estos "niveles de expresión" para controlar los "niveles de expresión" se debe entender como una referencia para evaluar los factores de ADN que están relacionados con la transcripción, tales como los patrones de metilación del gen/ADN. Estos se han descrito, en parte, en detalle anteriormente.

- Un experto en la técnica también sabría que los cambios en la estructura de la cromatina son indicativos de cambios en la expresión génica. El silenciamiento de la expresión génica se asocia a menudo con la modificación de las proteínas de la cromatina, la metilación de las lisinas en cualquiera o ambas posiciones 9 y 27 de la histona H3 son ejemplos bien estudiados, mientras que la cromatina activa se caracteriza por la acetilación de la lisina 9 de la histona H3. Por lo tanto, la asociación de secuencias de genes con cromatina que porta modificaciones represoras o activas se puede utilizar para realizar una evaluación del nivel de expresión de un gen.
- 40

- La referencia a "molécula de ácido nucleico" debe entenderse como una referencia tanto a las moléculas de ácido desoxirribonucleico como a las moléculas de ácido ribonucleico y sus fragmentos. Por lo tanto, la presente invención se extiende tanto al escrutinio directo de los niveles de ARNm en una muestra biológica como al escrutinio del ADNc
- 45

complementario que se ha transcrito de forma inversa a partir de una población de interés de ARNm. Se encuentra dentro del conocimiento práctico de un experto en la técnica diseñar una metodología dirigida al escrutinio de ADN o ARN. Como se detalló anteriormente, el método de la presente invención también se extiende al escrutinio del producto proteico traducido del ARNm del sujeto o del propio ADN genómico.

- 5 En una realización preferida, el nivel de expresión génica se mide mediante la referencia a genes que codifican un producto proteico y, más concretamente, dicho nivel de expresión se mide a nivel de proteína.

En otra realización particularmente preferida, dicha expresión génica se evalúa mediante la asociación de ADN con proteínas de cromatina que portan modificaciones represoras, por ejemplo, metilación de las lisinas 9 o 27 de la histona H3.

- 10 Se debe entender que la presente invención abarca métodos de detección basados en la identificación de proteínas y/o moléculas de ácido nucleico en una o más muestras biológicas. Esto puede tener particular importancia en la medida en que algunos de los marcadores neoplásicos de interés pueden corresponder a genes o fragmentos de genes que no codifican un producto proteico. En consecuencia, en la medida en que esto ocurra, no sería posible analizar una proteína y el marcador del sujeto tendría que evaluarse sobre la base de los perfiles de expresión de transcripción o los cambios en el ADN genómico.

- 15 Se debe entender que el término "proteína" abarca péptidos, polipéptidos y proteínas (incluyendo fragmentos de proteínas). La proteína puede estar glicosilada o no glicosilada y/o puede contener una gama de otras moléculas fusionadas, ligadas, unidas o asociadas de otro modo a la proteína, tales como aminoácidos, lípidos, carbohidratos u otros péptidos, polipéptidos o proteínas. La referencia en la presente memoria a una "proteína" incluye una proteína que comprende una secuencia de aminoácidos, así como una proteína asociada con otras moléculas, tales como aminoácidos, lípidos, carbohidratos u otros péptidos, polipéptidos o proteínas.

- 20 Las proteínas codificadas por los marcadores neoplásicos de la presente invención pueden estar en forma multimérica, lo que significa que dos o más moléculas están asociadas entre sí. Cuando las mismas moléculas de proteína están asociadas entre sí, el complejo es un homomultímero. Un ejemplo de un homomultímero es un homodímero. Cuando al menos una proteína marcadora está asociada con al menos una proteína no marcadora, el complejo es un heteromultímero tal como un heterodímero.

- 25 La referencia a un "fragmento" debe entenderse como una referencia a una porción de la molécula de ácido nucleico o proteína sujeto. Esto es particularmente relevante con respecto a al escrutinio de niveles de ARN modulados en muestras de heces, ya que es probable que el ARN sujeto se haya degradado o se haya fragmentado de otro modo debido al entorno del intestino. Por lo tanto, se puede estar detectando realmente fragmentos de la molécula de ARN sujeto, cuyos fragmentos se identifican en virtud del uso de una sonda adecuadamente específica.

- 30 Aunque el método preferido consiste en detectar el producto de expresión o los cambios en el ADN de los marcadores neoplásicos con el fin de diagnosticar el desarrollo de neoplasias o la predisposición a las mismas, la detección de cambios inversos en los niveles de dichos marcadores puede ser deseable en ciertas circunstancias, por ejemplo, para controlar la eficacia del tratamiento terapéutico o profiláctico dirigido a modular una afección neoplásica, tal como el desarrollo de un adenoma o adenocarcinoma. Por ejemplo, cuando la reducción de la expresión de los marcadores sujeto indica que un individuo ha desarrollado una afección caracterizada por el desarrollo de adenoma o adenocarcinoma, por ejemplo, se puede utilizar el escrutinio de un aumento en los niveles de estos marcadores posteriormente al inicio de un régimen terapéutico para indicar reversión u otra forma de mejora del estados del individuo sujeto. El método de la presente invención es, por lo tanto, útil como prueba única o como seguimiento continuo de aquellos individuos que se cree que están en riesgo de desarrollo de neoplasia o como seguimiento de la eficacia de los regímenes de tratamiento terapéutico o profiláctico dirigidos a inhibir o ralentizar de otro modo del desarrollo de la neoplasia.

- 35 Los medios para evaluar los marcadores de neoplasia expresados por el sujeto en una muestra biológica se pueden conseguir mediante cualquier método adecuado, que sería bien conocido para el experto en la técnica. Para este fin, se apreciaría que en la medida en que uno esté examinando una población celular homogénea (tal como una biopsia de tumor o una población celular que se haya enriquecido de una población de partida heterogénea) o una sección de tejido, se puede utilizar una amplia gama de técnicas tales como la hibridación in situ, la evaluación de perfiles de expresión mediante microensayos, inmunoensayos y similares (a continuación, se describen con más detalle) para detectar la ausencia o la regulación a la baja del nivel de expresión de uno o más marcadores de interés. Sin embargo, en la medida en que se esté escrutando una población celular heterogénea o un fluido corporal en el que se encuentren poblaciones heterogéneas de células, tal como una muestra de sangre, la ausencia o reducción del nivel de expresión de un marcador concreto puede no ser detectable debido a la inherente expresión del marcador por células no neoplásicas presentes en la muestra. Es decir, una disminución del nivel de expresión de un subgrupo de células puede no ser detectable. En esta situación, un mecanismo más apropiado para detectar una reducción en una subpoblación neoplásica de los niveles de expresión de uno o más marcadores de la presente invención es a través de medios indirectos, tales como la detección de cambios epigenéticos.

Los métodos para detectar cambios en los niveles de expresión génica (además de los análisis de metilación

descritos anteriormente en detalle), en particular cuando la muestra biológica del sujeto no está contaminada con un alto número de células no neoplásicas, incluyen, pero no se limitan a:

(i) Detección *In vivo*.

5 La imagen molecular se puede utilizar después de la administración de sondas de obtención de imágenes o reactivos capaces de revelar la expresión alterada de los marcadores en los tejidos intestinales.

10 La imagen molecular (Moore et al., *BBA*, 1402:239-249, 1988; Weissleder et al., *Nature Medicine* 6:351-355, 2000) es la imagen *in vivo* de la expresión molecular que se correlaciona con las macrocaracterísticas que se visualizan actualmente utilizando técnicas de diagnóstico mediante imágenes "clásicas" tales como rayos X, tomografía computarizada (TC), MRI, tomografía por emisión de positrones (PET) o endoscopia.

(ii) Detección de la regulación a la baja de la expresión del ARN en las células mediante Hibridación Fluorescente *In Situ* (FISH), o en extractos de células mediante tecnologías tales como la reacción en cadena de la polimerasa con transcriptasa inversa cuantitativa (QRT-PCR) o la calificación mediante la citometría de flujo de productos de RT-PCR competitiva. (Wedemeyer et al., *Clinical Chemistry* 48:9 1398-1405, 2002).

(iii) Evaluación de los perfiles de expresión de ARN, por ejemplo, mediante tecnologías de matrices (Alon et al., *Proc. Natl. Acad. Sci. USA*: 96: 6745-6750, junio de 1999).

20 Una "micromatriz" es una matriz lineal o multidimensional de regiones preferiblemente discretas, cada una con un área definida, formada en la superficie de un soporte sólido. La densidad de las regiones discretas en una micromatriz se determina por el número total de polinucleótidos diana que se detectarán en la superficie de un solo soporte en fase sólida. Como se emplea en la presente memoria, una micromatriz de ADN es una matriz de sondas oligonucleotídicas colocadas en un chip u otras superficies utilizadas para amplificar o clonar polinucleótidos diana. Dado que la posición de cada grupo concreto de sondas en la matriz es conocida, las identidades de los polinucleótidos diana se pueden determinar en función de su unión a una posición concreta en la micromatriz.

30 La tecnología de micromatrices de ADN permite realizar un ensayo a gran escala de una pluralidad de moléculas de ácido nucleico diana en un solo soporte de fase sólida. La Patente de Estados Unidos Núm. 5.837.832 (Chee et al.) y las solicitudes de patente relacionadas describen la inmovilización de una matriz de sondas oligonucleotídicas para la hibridación y detección de secuencias específicas de ácido nucleico en una muestra. Los polinucleótidos diana de interés aislados de un tejido de interés se hibridan con el chip de ADN y las secuencias específicas se detectan en función de la preferencia de los polinucleótidos diana y el grado de hibridación en localizaciones de sonda discretas. Un uso importante de las matrices está en el análisis de la expresión génica diferencial, donde el perfil de expresión de genes en diferentes células o tejidos, a menudo un tejido de interés y un tejido de control, se compara y se identifica cualquier diferencia en la expresión génica entre los tejidos respectivos. Tal información es útil para la identificación de los tipos de genes expresados en un tipo de tejido concreto y el diagnóstico de las condiciones según el perfil de expresión.

(iv) Medición de los niveles alterados de proteína marcadora neoplásica en extractos celulares, por ejemplo, mediante inmunoensayo.

40 La prueba para el producto de expresión del marcador neoplásico proteináceo en una muestra biológica se puede realizar por uno cualquiera de una serie de métodos adecuados que son bien conocidos por los expertos en la técnica. Los ejemplos de métodos adecuados incluyen, pero no se limitan a, escrutinio de anticuerpos en secciones de tejido, especímenes de biopsia o muestras de fluidos corporales. En la medida en que se utilicen métodos de diagnóstico basados en anticuerpos, la presencia de la proteína marcadora se puede determinar de varias formas, tal como por ejemplo mediante transferencia de Western, ELISA o procedimientos de citometría de flujo. Estos, por supuesto, incluyen ensayos de un solo sitio y de dos sitios o "sándwich" de tipos no competitivos, así como ensayos de unión competitiva tradicionales. Estos ensayos también incluyen la unión directa de un anticuerpo marcado a una diana.

50 (v) Determinación de la expresión alterada de marcadores neoplásicos proteicos en la superficie celular, por ejemplo mediante inmunohistoquímica.

(vi) Determinación de la expresión alterada de la proteína en base a cualquier prueba funcional, prueba enzimática o prueba inmunológica adecuadas, además de las detalladas en los puntos (iv) y (v) anteriores.

55 Una experto con un conocimiento práctico normal en la técnica podría determinar, como cuestión de procedimiento de rutina, la conveniencia de aplicar un método dado a un tipo particular de muestra biológica.

Un aspecto relacionado de la presente invención proporciona una matriz molecular, cuya matriz comprende una pluralidad de:

- (i) moléculas de ácido nucleico que comprenden una secuencia de nucleótidos correspondiente a uno o más cualesquiera de los ADN marcadores neoplásicos descritos anteriormente o una secuencia que muestra al menos 80% de identidad con la misma o un derivado, fragmento, variante u homólogo funcionales de dicha molécula de ácido nucleico; o
- (ii) moléculas de ácido nucleico que comprenden una secuencia de nucleótidos capaz de hibridar con una o más cualesquiera de las secuencias de (i) en condiciones de rigurosidad media o un derivado, fragmento, variante u homólogo funcionales de dicha molécula de ácido nucleico; o
- (iii) sondas de ácido nucleico u oligonucleótidos que comprenden una secuencia de nucleótidos capaz de hibridar con una o más de las secuencias de (i) en condiciones de rigurosidad media o un derivado, fragmento, variante u homólogo funcionales de dicha molécula de ácido nucleico; o
- (iv) sondas capaces de unirse a una o más cualesquiera de las proteínas codificadas por las moléculas de ácido nucleico de (i) o un derivado, fragmento u homólogo de las mismas,

en donde el nivel de expresión de dichos genes marcadores de (i) o proteínas de (iv) es indicativo del estado neoplásico de una célula o subpoblación celular derivada de intestino grueso.

Preferiblemente, dicho porcentaje de identidad es al menos 85%, 90%, 91%, 92%, 93%, 94%, 95%, 96%, 97%, 98% o 99%.

"Hibridación" se refiere al proceso mediante el cual una hebra de ácido nucleico se une a una hebra complementaria a través del emparejamiento de bases. Las reacciones de hibridación pueden ser sensibles y selectivas de modo que se pueda identificar una secuencia concreta de interés incluso en muestras en las que está presente a bajas concentraciones. Las condiciones rigurosas se pueden definir, por ejemplo, por las concentraciones de sal o formamida en las soluciones de prehibridación e hibridación, o por la temperatura de hibridación, y son bien conocidas en la técnica. Por ejemplo, la rigurosidad puede aumentarse reduciendo la concentración de sal, aumentando la concentración de formamida o elevando la temperatura de hibridación, alterando el tiempo de hibridación, como se describe en detalle a continuación. En aspectos alternativos, los ácidos nucleicos de la invención se definen por su capacidad para hibridar en diversas condiciones de rigurosidad (p. ej., alta, media, y baja), como se expone en la presente memoria.

La referencia en la presente memoria a una baja rigurosidad incluye y abarca desde al menos aproximadamente 0 a al menos aproximadamente 15% v/v de formamida y de al menos aproximadamente 1 M a al menos aproximadamente 2 M de sal para la hibridación, y de al menos aproximadamente 1 M a al menos aproximadamente 2 M de sal para las condiciones de lavado.

En general, la baja rigurosidad es de aproximadamente 25-30°C a aproximadamente 42°C. La temperatura se puede alterar y las temperaturas más altas se utilizan para reemplazar la formamida y/o para proporcionar condiciones de rigurosidad alternativas. Se pueden aplicar condiciones de rigurosidad alternativas cuando sea necesario, tal como una rigurosidad media, que incluye y abarca de al menos aproximadamente 16% v/v a al menos aproximadamente 30% v/v de formamida y de al menos aproximadamente 0,5 M a al menos aproximadamente 0,9 M de sal para la hibridación, y de al menos aproximadamente 0,5 M a al menos aproximadamente 0,9 M de sal para las condiciones de lavado, o alta rigurosidad, que incluye y abarca de al menos aproximadamente 31% v/v a al menos aproximadamente 50% v/v de formamida y de al menos aproximadamente 0,01 M a al menos aproximadamente 0,15 M de sal para la hibridación, y de al menos aproximadamente 0,01 M a al menos aproximadamente 0,15 M de sal para las condiciones de lavado. En general, el lavado se lleva a cabo a $T_m = 69,3 + 0,41 (G + C)\%$ (Marmur y Doty, *J. Mol. Biol.* 5: 109, 1962). Sin embargo, la T_m de un ADN dúplex disminuye en 1°C con cada aumento del 1% en el número de pares de bases con emparejamiento erróneo (Bonner y Laskey, *Eur. J. Biochem.* 46:83, 1974). La formamida es opcional en estas condiciones de hibridación. Por consiguiente, los niveles de rigurosidad particularmente preferidos se definen como sigue: la baja rigurosidad es 6 x tampón SSC, SDS al 0,1% p/v a 25-42°C; una rigurosidad moderada es 2 x tampón SSC, SDS al 0,1% p/v a una temperatura en el rango de 20°C a 65°C; la rigurosidad alta es 0,1 x tampón SSC, SDS al 0,1% p/v a una temperatura de al menos 65°C.

Cuando los ácidos nucleicos de la invención se definen por su capacidad para hibridar bajo una alta rigurosidad, estas condiciones comprenden formamida a aproximadamente 50% de aproximadamente 37°C a 42°C. En un aspecto, los ácidos nucleicos de la invención se definen por su capacidad para hibridar bajo condiciones de rigurosidad reducida que comprenden condiciones en formamida de aproximadamente 35% a 25% a aproximadamente 30°C a 35°C. Alternativamente, los ácidos nucleicos de la invención se definen por su capacidad para hibridar bajo condiciones de alta rigurosidad que comprenden condiciones a 42°C en formamida al 50%, 5X SSPE, SDS al 0,3% y una secuencia repetitiva que bloquea el ácido nucleico, tal como cot-1 o ADN de esperma de salmón (p. ej., 200 n/mL de ADN de esperma de salmón sometido a cizallamiento y desnaturalizado). En un aspecto, los ácidos nucleicos de la invención se definen por su capacidad para hibridar en condiciones de rigurosidad reducida que comprenden formamida al 35% a una temperatura reducida de 35°C.

Preferiblemente, las sondas sujeto están diseñadas para unirse al ácido nucleico o proteína a la que se dirigen con un nivel de especificidad que minimiza la incidencia de reactividad no específica. Sin embargo, se apreciará que puede que no sea posible eliminar toda reactividad cruzada o reactividad no específica potenciales, siendo esto una limitación inherente de cualquier sistema basado en sondas.

- 5 En términos de las sondas que se utilizan para detectar las proteínas sujeto, estas pueden adoptar cualquier forma adecuada, incluyendo anticuerpos y aptámeros.

10 Una biblioteca o matriz de sondas de ácidos nucleicos o proteínas proporciona información abundante y altamente valiosa. Adicionalmente, dos o más matrices o perfiles (información obtenida del uso de una matriz) de tales secuencias son herramientas útiles para comparar un conjunto de pruebas de resultados con una referencia, tal como otra muestra o un calibrador almacenado. Al utilizar una matriz, las sondas individuales típicamente se inmovilizan en localizaciones separadas y se deja que reaccionen para reacciones de unión. Los cebadores asociados con conjuntos de marcadores ensamblados son útiles para preparar bibliotecas de secuencias o para detectar directamente marcadores de otras muestras biológicas.

15 Una biblioteca (o matriz, cuando se refiere a ácidos nucleicos físicamente separados que corresponden a al menos algunas secuencias en una biblioteca) de marcadores genéticos exhibe propiedades altamente deseables.

Estas propiedades están asociadas con condiciones específicas y se pueden caracterizar como perfiles reguladores. Un perfil, como se denomina aquí, se refiere a un conjunto de miembros que proporciona información de diagnóstico del tejido del cual se obtuvieron originalmente los marcadores. Un perfil en muchos casos comprende una serie de puntos en una matriz elaborada a partir de secuencias depositadas.

20 Un perfil característico del paciente se prepara generalmente mediante el uso de una matriz. Un perfil de una matriz se puede comparar con uno o más perfiles de matriz u otros perfiles de referencia. Los resultados comparativos pueden proporcionar información abundante relacionada con estados patológicos, estado de desarrollo, receptividad a la terapia y otra información sobre el paciente.

25 Otro aspecto de la presente invención proporciona un kit de diagnóstico para analizar muestras biológicas que comprende uno o más agentes para detectar uno o más marcadores y reactivos neoplásicos útiles para facilitar la detección por dichos agentes. También se pueden incluir otros medios, por ejemplo, para recibir una muestra biológica. El agente puede ser cualquier molécula de detección adecuada.

La presente invención se describe adicionalmente con referencia a los siguientes ejemplos no limitantes.

Ejemplo 1

30 Se aplicó la tecnología de la etiqueta de bisulfito para producir fracciones del genoma metiladas y desmetiladas como se describe a continuación. Brevemente, los ADN se digirieron con las enzimas *MspI* y *TaqI* insensibles a la metilación y se trataron con bisulfito de sodio en condiciones no desnaturalizantes, de modo que la citosina en el saliente de hebra sencilla 5'-CG que queda por cada enzima de restricción se convirtiera en uracilo si estuviera fuera desmetilada, pero permaneciera sin convertir si estuviera metilada. Se ligaron conectores separados con salientes 5'-CG o 5'-CA para proporcionar fracciones metiladas y desmetiladas enlazadas, respectivamente. Después de la 35 incorporación de un segundo cebador por copiado cebado al azar de una hebra inversa, este cebador común se utilizó combinado con el cebador directo apropiado para amplificar las fracciones metiladas y desmetiladas.

En detalle, se procesaron y analizaron muestras de ADN tumorales y normales emparejadas de ocho pacientes, como se describe a continuación.

40 1. Los ADN de tejidos cancerosos y normales (1 a 2 µg) se sometieron a cizallamiento mediante sonicación utilizando un aparato de ultrasonidos Bioruptor UCD-200 (Diagenode, Bélgica) en 300 µL de Tris 10 mM, EDTA 0,1 mM, pH 7,5 a un ajuste de potencia "alto" durante 60 minutos en hielo, con ciclos alternos de 30 segundos de "encendido" o "apagado". A continuación, se aplicó una pequeña parte de cada muestra a un gel de agarosa al 2%, para confirmar que se había alcanzado un intervalo de tamaño medio de 200 a 300 pb. El ADN se precipitó y se resuspendió en agua. 45

2. El volumen se ajustó a 20 µL en el tampón de reacción Antartic Fosfatase (New England Biolabs) y el ADN se desforforiló utilizando 5 unidades de fosfatasa Antartic a 37°C durante 60 min. La enzima se inactivó a continuación calentando a 65°C durante 10 min.

50 3. Digestión con enzimas de restricción secuencial: se añadieron 3 µL de 10 X New England Biolabs Buffer 4 y 2 µL, 20 unidades de enzima *MspI* y la incubación continuó a 37°C durante 2 h. Se añadieron 20 unidades, 2 µL, de *TaqI* y BSA a 100 µg/mL para proporcionar un volumen de 28 µL y la incubación continuó a 65°C durante 2 horas más. La incubación se detuvo mediante la adición de 2 µL de EDTA 500 mM.

4. El ADN cortado (1 µg) se hizo reaccionar con bisulfito de sodio, utilizando el kit MethylEasy de Human Genetic Signatures (North Ryde, Australia), pero omitiendo cualquier etapa anterior de calentamiento o desnaturalización

alcalina. Brevemente:

(a) Se combinaron 25-30 µL de ADN digerido con enzimas de restricción en un tubo de 2 mL con 250 µL de bisulfito de sodio, a continuación se incubaron a 37°C durante 4 horas mientras se omitía el aceite mineral.

5 (b) Se añadieron 20 µg de glucógeno marcado con colorante azul y se precipitó el ADN con 750 µL de solución MethylEasy 4 y 1 mL de isopropanol. Después de la centrifugación y el lavado del sedimento con etanol del 70%, el ADN se disolvió en 12 µL de Solución MethylEasy 3. Alternativamente, se eliminó el exceso de bisulfito utilizando una pequeña columna de sílice y la muestra se eluyó de la columna en 16 µL de Solución MethylEasy 3.

(c) La desulfonación se logró calentando en la solución MethylEasy 3 durante 60 minutos a 72°C, mientras se centrifugaba varias veces para reducir la evaporación.

10 5. Ligación de los conectores CG y CA. Las ligaciones separadas se establecieron con conectores P1-CG o P1-CA (Tabla 1) como se describe a continuación. Los conectores PI-CG y PI-CA (Tabla 1) se modificaron mediante la incorporación de una biotina en el extremo 3' de la hebra superior para permitir la siguiente captura.

Tabla 1. Secuencias de facilitación de la detección y conectores competidores.

conector P1-CG superior	5'-p <u>C</u> GCATACACCGACTGCCCTT-biotina-3'	SEQ ID NO:1
conector P1-CG inferior	5'-GGGCAGTCGGTGATACG-3'	SEQ ID NO:2
conector P1-CA superior	5'-p <u>C</u> AGCAATCACCGACTGCCCTT-biotina-3'	SEQ ID NO:3
conector P1-CA inferior	5'-GGGCAGTCGGTGATTGC-3'	SEQ ID NO:4
competidor CG superior	5'-ACAGAGTCGTA-3'	SEQ ID NO:5
competidor CG inferior	5' -CGTACGACTCTG-3'	SEQ ID NO:6
competidor CA superior	5'-AGTGATCAGCA-3'	SEQ ID NO:7
competidos CA inferior	5'-p <u>C</u> ATGCTGATCAC-3'	SEQ ID NO: 8
cebador P2-N6	5'-CTGCCCCGGGTTCTCATTCTCTNNNNNN-3'	SEQ ID NO:9
cebador P2 largo	5'-CTGCCCCGGGTTCTCATTCT-3'	SEQ ID NO:10

15 Las mezclas de conectores y competidores combinados se prepararon como se muestra en la Tabla 2 a continuación. Estas cantidades, y las proporciones, son para 1000 ng de ADN de 200 pb de longitud promedio.

Tabla 2

Ligación	Conector (20 pb)	Competidor (10 pb)
CG	200 ng (2:1)	200 ng (4:1)
CA	1000 ng (10:1)	100 ng (2:1)

20 Las reacciones de ligación con 1 µg de ADN tratado con bisulfito se ajustaron a 50 µL con 0,6 µL (12 unidades) de ADN ligasa T4 y se incubaron a temperatura ambiente durante 5 h. Después de la ligación, el ADN se purificó a través de una columna Promega Wizard y se eluyó con 2 x 50 µL de Tris.HCl 10 mM, EDTA 0,1 mM, pH 8. Esta etapa elimina los conectores no ligados.

25 6. Captura de esferas y liberación de hebra sencilla: en primer lugar se lavaron dos veces 25 µL de Dynal M280 con estreptavidina con 500 µL de 2X tampón de lavado salino (NaCl 2M, Tris 10 mM pH 7,5, EDTA 1 mM, Tween 20 al 0,2%) y se resuspendieron en 100 µL de 2x tampón de lavado. Los 100 µL de ADN eluido se añadieron y se mezclaron en un agitador oscilante a temperatura ambiente con las esferas durante 15 minutos a 500 rpm. Las esferas se capturaron magnéticamente durante 1 minuto y se eliminó el sobrenadante. A esto le siguieron dos lavados en 500 µL de 1X tampón de lavado, una vez con 500 µL de 1 x SSC y a continuación con 500 µL de 0,5 x

SSC a 65°C durante 3 min con agitación oscilante.

7. Las esferas se resuspendieron a continuación en 50 µL de Tris.HCl 10 mM, EDTA 0,1 mM, pH 8 y se transfirieron a un nuevo tubo. Después de incubar a 98°C durante 5 min y enfriar durante 1 min en hielo, las esferas se capturaron magnéticamente durante un minuto sobre hielo y el sobrenadante (50 µL) se transfirió a un nuevo tubo. Después de secar, el ADN se resuspendió en 10 µL de agua.

8. Cebado aleatorio. La secuencia del cebador P2 se incorporó mediante cebado aleatorio utilizando un cebador P2-N6 (Tabla 1). Los 10 µL de ADN de hebra sencilla eluido se mezclaron con 500 ng (5 µL) de cebador P2-N6, se calentaron a 98°C durante 2 min y se enfriaron sobre hielo. A esta mezcla se le añadieron 2,5 µL de 10x Tampón 2 New England Biolabs, 0,625 µL de dNTP 10 mM, 0,625 µL del fragmento de Klenow de ADN polimerasa (5.000 u/µl) y el volumen se ajustó a 25 µL. Después de la incubación sobre hielo durante 10 minutos, a continuación a temperatura ambiente durante 60 minutos, la reacción se terminó calentando a 75°C durante 20 minutos.

9. Amplificación. Después de las reacciones de prueba utilizando 1 µL de ADN cebado aleatoriamente, numerosas para estimar los ciclos de amplificación, se ajustaron reacciones de amplificación de 300 µL para cada una de las fracciones metiladas y desmetiladas de la siguiente manera:

- 10 µL de muestra de ADN cebada aleatoriamente.
- 150 µL de mezcla maestra de inicio Promega GoTaq 2x Hot Start Mastermix
- 18 µL de cebador P1-CA o P1-CG (Tabla 1, provisión de partida 5 µM)
- 18 µL de cebador P2 largo (Tabla 1, provisión de partida 5 uM)
- 7,5 µL de Sybr Green (dilución 1:3000 de una concentración de 10.000x)
- 96,5 µL de agua

Las muestras se ejecutaron en un Roche LightCycler 480, programa Green SYBR: 95°C, 2 min x 1 ciclo, y 95°C, 15 seg, 60°C, 1 minuto x 40 ciclos. La fluorescencia se controló y las reacciones se detuvieron en la parte superior de la fase exponencial. El ADN se purificó utilizando columnas Promega Wizard, se eluyó en 30 µL de agua y se cuantificó por espectrofotometría.

10. Marcaje e hibridación. se marcaron de forma fluorescente muestras de 20 µg de cada fracción con el kit de marcaje de ADN de doble color de Nimblegen pero sustituyendo los nonúmeros aleatorios Cy3 y Cy5 por hexámeros aleatorios Cy3 y Cy5 (Geneworks, Adelaida, Australia). Las fracciones de ADN metilado se marcaron con colorante Cy3 y se desmetilaron con colorante Cy5.

Las fracciones metiladas de ADN canceroso y normal se hibridaron simultáneamente con una matriz en mosaico del promotor 720K de Nimblegen siguiendo los protocolos de Nimblegen y las fracciones desmetiladas se hibridaron conjuntamente con una matriz separada de acuerdo con los protocolos del fabricante. Las matrices se escanearon en un escáner Axon.

Además de las muestras individuales, se prepararon cuatro reservas de ADN para el marcaje fluorescente (así como cuatro reservas adicionales en los que se utilizó la marca Cy3 para los ADN cancerosos y Cy5 para los normales)

- La reserva 1 combinó las fracciones de ADN metilado de los tejidos cancerosos: marca cy5
- La reserva 2 combinó las fracciones de ADN metilado de tejidos normales emparejadas: marca cy3
- La reserva 3 combinó las fracciones de ADN desmetiladas de los tejidos cancerosos; marca cy5
- La reserva 4 combinó las fracciones de ADN desmetiladas de tejidos normales emparejadas: marca cy3

Identificación de genes metilados diferencialmente

Los datos de las micromatrices para los ocho pares individuales de cáncer y normales, así como el análisis del ADN agrupado y la hibridación de intercambio de fluoróforos con los ADN agrupados se combinaron como se describe a continuación para identificar los genes metilados de manera más diferencial. La metilación diferencial se evalúa mediante una puntuación de diferencia-diferencia, DD. Esto se define para cada sonda como

$$DD = (Y_{\text{tumor.met}} - Y_{\text{tumor.desmet}}) - (Y_{\text{normal.met}} - Y_{\text{normal.desmet}})$$
 donde cada valor Y es el logaritmo en base-2 del valor de respuesta de la sonda bruta para la combinación dada de estado de metilación (met/desmet) y estado de enfermedad (tumor/normal). Los valores más altos de la metilación media de DD aumentan en las muestras de tumores en comparación con las muestras normales. Para cada región en mosaico, las sondas se clasificaron en el orden de DD más alta como DD1, DD2, DD3, etc.

Se crearon dos listas de genes, una que se basaba en la metilación diferencial para las dos sondas más

diferenciales en una región en mosaico (DD2) y otra que se basaba en las cuatro sondas diferenciales superiores (DD4).

Para la lista DD2 se descartaron los datos donde la calidad de la sonda puntuada según Nimblegen está más allá del umbral de 1,5. Este umbral acepta aproximadamente 17% de todas las sondas y minimiza el potencial de "ruido" cuando solo se consideran dos sondas. Para cada región en mosaico, los valores de DD2 para las ocho muestras individuales se combinaron a través de una mediana. A continuación, se obtuvo un valor de DD2 general de todas las muestras a partir de la media de tres valores: esta mediana y los dos valores de muestra agrupados, directo e intercambio de fluoróforos. Todas las regiones en mosaico se clasificaron a continuación según esta puntuación, y se devolvieron las 30 primeras.

Para la lista de DD4 donde se consideró un mayor número de sondas por región en mosaico, se utilizó un umbral de puntuación de calidad de 4 (que acepta aproximadamente 40% de las sondas). El valor global de DD4 para cada región en mosaico se determinó como para DD2, excepto que se utilizaron los valores individuales de DD4 en cada caso.

La Tabla 3 muestra una lista de 44 genes que se muestran metilados de manera diferencial entre los ADN cancerosos y normales, según el nivel de la señal diferencial de acuerdo con el análisis DD2 o DD4. La lista está ordenada por la diferencia según 4 sondas y a continuación 2 sondas. Las 4 principales sondas clasificadas (y 9 en total) aparecen en la lista de los 30 genes principales derivada de ambos métodos. Las coordenadas hg18 de las regiones en mosaico en las matrices de Nimblegen que muestran la metilación diferencial se proporcionan en la primera columna. En las dos columnas de la derecha se muestran los nombres de los genes correspondientes cuando están disponibles vinculados a las regiones en mosaico y las coordenadas de los genes (hg19). Los diagramas de DD a través de las regiones en mosaico para cada gen se muestran en la Figura 1.

Tabla 3

Región en mosaico (hg18)	Resumen DD2	Resumen DD4	Símbolos de Genes	Estructura de Localización del Gen 37.1 (hg19)
chr13:27399624-27401566	3,849	3,202	PDX1	Chr13, (28494168..28500451)
chr19:61708583-61711633	2,968	3,111	ZNF471	Chr19 (57019212..57040270)
chr8:141177019-141180166	3,369	3,023	TRAPPC9	Chr8 (140,811,770-141,537,860)
chr4:81404325-81407375	3,302	2,965	FGF5	Chr4 (81187742..81212171)
chr5:2801368-2810024		2,670	IRX2	Chr5 (2746279..2751769)
chr20:21433932-21445104	2,846	2,597	NKX2-2	Chr20 (21491648..21494664)
chr18:53251474-53259851		2,585	ONECUT2	Chr18 (55102917..55158530)
chr5:3646727-3656054		2,525	IRX1	Chr5 (3596168..3601517)
chr20:36784078-36790786	2,943	2,502	SLC32A1	Chr20 (37353101..37358016)
chr1:50656815-50664169		2,487	DMRTA2	Chr1 (50883225..50889141)
chr8:4836376-4842176		2,480	CSMD1	Chr8 (2792875..4852328)
chr7:27149138-27152252		2,474	HOXA5	Chr7 (27180996..27183287)
chr16:65168411-65171461		2,471	CMTM2	Chr16 (66613351..66622178)
chr11:1970000-2050000		2,462	MIR675,H19	Chr11 (2016406..2019065)
chr5:37870045-37877979	3,052	2,455	GDNF	Chr5 (37815753..37839782)
chr14:56341488-56349377		2,450	OTX2	Chr14 (57267425..57277184)
chr1 :63554982-63563059		2,438	FOXD3	Chr1 (63788730..63790797)
chr4:126454576-126458380	2,791	2,437	FAT4	Chr4 (126237567..126414087)
chr15:34965416-34968466		2,429	LOC145845	Chr15 (37156644..37178734)
chr8:23618420-23622307	3,002	2,427	NKX2-6	Chr8 (23559964..23563922)
chr4:111758454-111759816		2,424		
chr7:27108309-27111359		2,423	HOXA2	Chr7 (27139973..27142394)
chr10:131651159-131661686		2,401	EBF3	Chr10 (131633547..131762091)

Región en mosaico (hg18)	Resumen DD2	Resumen DD4	Símbolos de Genes	Estructura de Localización del Gen 37.1 (hg19)
chr20:21631732-21635689		2,388	PAX1	Chr20 (21686297..21696620)
chr4:61748478-61751396		2,385	LPHN3	Chr4 (62362839..62938168)
chr16:49741200-49746264		2,385	SALL1	Chr16 (51169886..51185183)
chr1:47682299-47683607	4,570		FOXD2	Chr1 (47901689..47906363)
chr7:96488157-96489487	3,812		DLX5	Chr7 (96649702..96654143,)
chr17:75384875-75393063	3,431		CBX8	Chr17 (77768176..77770890)
chr12:83829092-83833177	3,388		SLC6A15	Chr12 (85253267..85306606)
chr18:892503-899574	3,303		ADCYAP1	Chr17 (93598762..93604831)
chr8:6407582-6410632	3,158		ANGPT2	Chr8 (6357172..6420784)
chr13:78079121-78080434	3,056			
chr6:29629089-29629812	3,022			
chr1 :33613171-33616221	2,936		PHC2	Chr1 (33789224..33841194)
chr9:124021356-124022656	2,899		LHX6	Chr9 (124,004,679-124,030,840)
chr14:85063800-85066850	2,898756		FLRT2	Chr14 (85996488..86094270)
chr4:158358745-158361879	2,84852		GRIA2	Chr4 (158141736..158287227)
chr2:182253016-182256066	2,837453		NEUROD1	Chr2 (182541194..182545381)
chr3:129688182-129697160	2,83441		GATA2	Chr12 (9445136..9462559)
chr7:30915552-30918602	2,787447		AQP1	Chr7 (30951468..30965131)

Los gráficos de doble diferencia de estos genes metilados diferencialmente se muestran en la Figura 1. En estos gráficos, se esperan señales bajas cuando las sondas se encuentran a >300 pb desde un sitio de restricción (debido a la longitud cortada de los fragmentos que tienen un extremo ubicado en un sitio de restricción), o cuando un sitio de restricción se encuentra dentro de una sonda, acortando el tamaño de la región de hibridación. Se observa una metilación diferencial extensa en las regiones en mosaico de algunos genes, por ejemplo, PDX1 y TRAPP9C, mientras que en algunos casos el aumento de la metilación se limita a parte de la región en mosaico, por ejemplo, la mitad derecha de ZNF471.

Ejemplo 2

Las fracciones de ADN metilado del ADN tratado con bisulfito de las líneas celulares de cáncer colorrectal HCT116, HT29 y SW480 y del ADN aislado de sangre completa se prepararon utilizando un método de captura con biotina descrito a continuación y se secuenciaron las bibliotecas de ADN metilado utilizando el sistema de secuenciación Applied Biosystems SOLiD. Brevemente, los ADN se cortaron y los conectores SOLiD P2 modificados se ligaron a los ADN cortados. Los ADN se cortaron a continuación con Csp61 (sitio de corte G'TAC) y se ligaron con conectores SOLiD P1 modificados. A continuación, el ADN se desnaturizó y se trató con bisulfito de sodio para convertir todas las citosinas desmetiladas en uracilo. El ADN tratado con bisulfito se copió a continuación utilizando un cebador P2 modificado y se retiró la cadena original de ADN tratada con bisulfito que contenía uracilo. El cebador directo P1 se usó a continuación para cebar la síntesis de la hebra directa en presencia de biotina-dCTP. Por lo tanto, la biotina dCTP se incorporó en posiciones que contenían citosina metilada en el ADN original y, por lo tanto, no se convirtieron en uracilo. La fracción que contenía biotina, que representaba moléculas que contenían citosinas metiladas y que se encontraban adyacentes a los sitios Csp61, se capturaron sobre esferas magnéticas y posteriormente se amplificaron para una secuenciación de alto rendimiento. Los detalles del protocolo son los siguientes:

1. Los ADN genómicos, 2 µg, se sometieron a sonicación como en el Ejemplo 1 para producir fragmentos de ADN que varían en tamaño de 90 a 1000 pb, con la mayoría de las moléculas en el intervalo entre 100 - 230 pb.

El ADN se reparó en el extremo para garantizar la limpieza de los extremos y la fosforilación en 5' para una ligación eficaz utilizando el kit End-it (Epicenter Biotechnologies). Las reacciones se realizaron en 1x tampón End-it, ATP 1 mM, 0,25 mM de cada dNTP y 1 µL de la mezcla de enzimas End-it (ADN polimerasa T4 y polinucleótido quinasa). Después de la incubación a temperatura ambiente durante 45 min, las reacciones se calentaron a 70°C durante 10 min para inactivar la ADN polimerasa de T4.

2. El ADN reparado se purificó y se concentró con un kit de limpieza de reacción Qiagen MinElute. El ADN se eluyó en 2 x 16,5 µL de Qiagen Elution Buffer (EB). El eluato se ajustó a 50 µL de NEBuffer 2 (NaCl 50 mM, Tris-HCl 10 mM, MgCl₂ 10 mM, ditiotritol 1 mM, pH 7,9 @ 25°C) que contenía dATP 200 µM y se incubó con 50 unidades de fragmento de Klenow truncado N-terminalmente con exonucleasa 3' → 5' de ADN polimerasa (New England Biolabs). La reacción se detuvo calentando a 75°C durante 20 min.

3. Los ADN con cola de A reparados se ligaron con conectores reasociados SOLP2-AB/SOLP2-BP. El conector está adaptado a partir del conector P2 de Applied Biosystems utilizado en su sistema de secuenciación de alto rendimiento SOLiD, teniendo las bases subrayadas en SolP2-BP citosinas remplazadas presentes en la secuencia original. La secuencia SolP2-BP no contiene citosinas, por lo que la incorporación posterior de biotina dCTP se limitará a la secuencia del inserto.

SOLP2-AB 5' CCTACCCACATTCTCTATTCTCT SEC ID Núm: 11

SOLP2-BP 3' TTGGATGGGGTGTAAAGGAGTAAGAGp SEC ID Núm: 12

Los oligonucleótidos complementarios se combinaron en un tubo de PCR de 0,2 mL con tampón de ligasa Quick (New England Biolabs) para obtener una concentración final 500 µM. Los oligonucleótidos se reasociaron utilizando un termociclador como se especifica en los apéndices de preparación de la biblioteca SOLiD de Applied Biosystems.

Las ligaciones de ADN se realizaron en tampón Quick Ligase (Tris-HCl 66 mM, MgCl₂ 10 mM, ditiotritol 1 mM, ATP 1 mM, polietilenglicol 6000 al 7,5% p/v, pH 7,5 @ 25°C), utilizando 1 µL de ligasa Quick por cada 40 µL de reacción (New England Biolabs). La razón de conectores con respecto a los extremos de los fragmentos de ADN fue de aproximadamente 10 o 15 a 1. Los conectores se eliminaron utilizando un kit de purificación por PCR QiaQuick (Qiagen) y el ADN se eluyó en 40 o 50 µL de EB.

4. Después de la primera ligación del conector, el ADN se cortó con la enzima de restricción Csp61 (G'TAC) que deja un saliente 5'-TA-3'. Los ADN se cortaron durante la noche en tampones de enzimas de restricción proporcionados por el proveedor (Fermentas, tampón B) con 10 U de Csp61.

Estos extremos se ligaron a continuación con el conector SolP1 hemimetilado en el que las citosinas de la hebra superior SolP1-AM se habían reemplazado por 5-metilcitosinas (mostradas como "M") y el saliente 5'-TA-3', subrayado, se añadió a la secuencia SolP2-B original.

SOLP1-AM 5' MMAMTAMGMMTMMGMTTTMMTMTMTATGGGMAGTMGGTGAT SEC ID NO: 13

SOLP1-BC 3' CGGTGATGCGGAGGCGAAAGGAGAGATACCCGTCAGCCACTAAT SEQ ID NO: 14

5. Después de la ligación del conector P1, el ADN se desnaturizó y se trató con bisulfito de sodio utilizando un kit MethylEasy (Human Genetic Signatures) y se resuspendió en 30 µL de reactivo HGS 3. En la hebra superior, las metilcitosinas en el conector P1 están protegidas de la conversión y la hebra del conector P2 no contiene citosinas, lo que restringe la conversión de C a U a la región del inserto. Debido a la mella de la hebra sencilla, después de la desnaturalización, solo la hebra superior tendrá adaptadores en ambos extremos.

6. El cebador SolP2-AB se utilizó para cebar y extender para sintetizar una copia del ADN convertido. Brevemente, el ADN tratado con bisulfito (1 µg) se incubó con ADN polimerasa Taq Platinum de Invitrogen (1 µL, 5 unidades) en 25 µL de tampón Taq Platinum que contenía dNTP 50 µM, MgCl₂ 2,5 mM y 500 nmoles de cebador SolP2-AB. Después de calentar a 94°C durante 3 minutos, la reacción se incubó durante 15 minutos a 65°C. Los 25 µL de la reacción de la hebra cebada tenían 2,5 µL de tampón de fosfatasa Artic añadidos junto con 5 U de fosfatasa Artic (para eliminar la reserva de dNTP). La incubación se realizó durante 30 minutos a 37°C con desnaturalización posterior de la fosfatasa Antartic durante 8 minutos a 65°C.

7. Después de la síntesis de la hebra complementaria, la hebra original tratada con bisulfito se degradó mediante el tratamiento con una mezcla de enzimas USER que escinde el ADN en las posiciones de las bases de uracilo. La hebra restante se utilizó a continuación como molde para la síntesis de la hebra correspondiente a la hebra original tratada con bisulfito, con incorporación de biotina-dCTP para el etiquetado específico de sitios metilados. El tubo de reacción se enfrió y se añadió una mezcla de reactivos para llevar el volumen a 50 µL con una concentración final de desoxiadenosina trifosfato 100 µM, desoxiguanosina trifosfato 100 µM, desoxitimidina trifosfato 100 µM y biotina-14-desoxicitidina-trifosfato 50 µM junto con 500 nM de cebador SolPI-A, 1 U de Taq de arranque en caliente, 2 U de reactivo de escisión específico de uracilo, mezcla de enzimas USER (New England Biolabs) y 1x tampón Taq. La reacción se incubó durante 10 minutos a 37°C para permitir que la uracilo ADN glicosilasa degradara el ADN tratado con bisulfito que contenía uracilo antes de la desnaturalización durante 2 minutos a 94°C y la extensión del molde durante 10 minutos a 65°C. A continuación se añadió una alícuota final que contenía 2,5 nmoles de desoxicitidina-trifosfato sin marcar, con 5 minutos más de incubación a 65°C. El producto se purificó con un kit de purificación QiaQUIC PCR (Qiagen) y se eluyó en 200 µL de EB.

8. El ADN se incubó a continuación con esferas de estreptavidina para unirse al material marcado con biotina. Una serie de etapas de lavado enriqueció selectivamente este material unido. La desnaturalización por calor en agua

permitió recuperar el material enriquecido. Se utilizó albúmina de suero bovino como agente bloqueante y un agente tensioactivo en las etapas de lavado utilizadas para aumentar la rigurosidad del enriquecimiento. Brevemente, se prepararon esferas magnéticas de estreptavidina Invitrogen M-270 de acuerdo con las especificaciones del fabricante y a continuación se lavaron en 500 μ L de albúmina de suero bovino de 0,1 mg/mL antes de la resuspensión en 200 μ L de 2x de tampón de union y lavado (B&W) (2 moles/L NaCl, 20 mmoles/L de Tris-HCl [pH 7.2], 2 mmoles/L de EDTA y Tween80 al 0,2% v/v) y la adición de solución de ADN marcado purificado de volumen equivalente. En algunos casos, también se "incorporaron" 10 pg de cada ADN oligonucleotídico reasociado de control. La solución mixta de 400 μ L se incubó con balanceo suave durante 30 minutos a 37°C. El tubo se colocó sobre un imán durante 3 minutos antes de aspirar y mantener el sobrenadante. Se realizaron dos lavados adicionales - el primero con 500 μ L de 1 x tampón B&W y el segundo con 550 μ L de agua. A continuación, las esferas se resuspendieron en 45 μ L de agua y el tubo se calentó a 90°C durante 2' y se colocó inmediatamente sobre un imán. El agua calentada se aspiró tan pronto como las esferas magnéticas se aclararon de la solución, se añadieron 5 μ L de Tris-HCl 100 mM, pH 8,0, EDTA 1 mM y el tubo. La fracción capturada y liberada se aspiró, las fracciones se precipitaron con etanol y se resuspendieron en 50 μ L de Tris-HCl 10 mM de pH 8,0, EDTA 0,1 mM.

9. El ADN capturado se amplificó durante un número limitado de ciclos con una polimerasa Taq de inicio en caliente en presencia de 1000 nM de los cebadores SOLiD P1 y P2 convencionales. El cebador inverso se utilizó para modificar la secuencia del amplicón para que coincidiera con la de la secuencia del cebador 2 original de Applied Biosystems. El cebado con emparejamientos erróneos ilegítimo en los primeros ciclos de amplificación requirió una temperatura de reasociación más baja. La amplificación utilizó etapas de desnaturalización de 10 segundos a 94°C y etapas de extensión de 30 segundos a 72°C con etapas de reasociación a 50°C durante los primeros cuatro ciclos antes de pasar a una temperatura de reasociación de 62°C para los ciclos subsiguientes. Los productos de PCR se purificaron y cuantificaron, a continuación se realizaron otras rondas finales de PCR con 2 U de Phusion Taq (Finnzymes) en 100 μ L de tampón de Phusion Taq High Fidelity, cebadores 1000 nM y etapas de desnaturalización de 10 segundos a 98°C, etapas de reasociación de 30 segundos a 62°C y etapas de extensión de 30 segundos a 72°C.

10. Los productos de reacción se ejecutaron en geles de agarosa Low-Range (Biorad), se tiñeron con SYBR Gold (Invitrogen) y el ADN de 125-200 nucleótidos se cortó de la agarosa con un bisturí bajo luz azul en un Safe Imager (Invitrogen). El agar cortado se procesó con un kit de extracción Wizard SV Gel y un kit de limpieza de PCR (Promega) de acuerdo con las instrucciones del fabricante, excepto que la agarosa se disolvió a temperatura ambiente.

Los productos de la PCR se purificaron utilizando un kit Qiagen MinElute, se cuantificaron con un espectrofotómetro (Nanodrop) y se secuenciaron en un aparato SOLiD de Applied Biosystems utilizando la química SOLiD versión 3.

Las lecturas de secuenciación de bisulfito se alinearon con el genoma humano y se determinó el número de lecturas de un CpG en cada posición potencial dentro de la distancia de lectura de 50 bases en cada lado de un sitio Csp61 para cada muestra de ADN. Cada lectura de un CpG en las lecturas de secuenciación de bisulfito corresponde a un CpG metilado en el ADN original. Para cada muestra de ADN, se calcularon las sumas de los sitios CpG metilados leídos en la región desde 2 kb aguas arriba hasta 1 kb aguas abajo del sitio de inicio de transcripción anotado lo más agua arriba de un gen. Esto permitió la identificación de los genes y las regiones promotoras donde había una metilación diferencial significativa al comparar cada una de las líneas celulares de cáncer de colon con el ADN de la sangre. Los perfiles de metilación con etiqueta de bisulfito de estos genes obtenidos del análisis de 8 muestras de ADN de cáncer reunidas y 8 muestras de ADN normal reunidas (Figura 2) se utilizaron a continuación para desarrollar una lista de genes identificados a través del método de captura de biotina que también mostró una metilación diferencial significativa en las muestras clínicas (Tabla 4). En la Tabla 4, el nombre del gen o locus se muestra en la primera columna. Las localizaciones cromosómicas de los genes asociados se muestran en las siguientes dos columnas, y las columnas cuarta y quinta proporcionan las posiciones del primer y último sitios CpG secuenciados en el análisis de captura de biotina. El número de sitios CpG analizados y el número total de CpG metilados contados en cada muestra de ADN se proporcionan en las columnas posteriores. Las claras diferencias en los niveles de metilación entre los ADN de líneas celulares de cáncer de colon y el ADN de la sangre en estas regiones son evidentes.

En particular, cinco genes identificados con un asterisco en la Tabla 4, IRX1, DLX5, SALL1, SLC32A1 y ZNF471, también se identificaron como genes altamente metilados diferencialmente utilizando el método de la etiqueta de bisulfito para el escrutinio primario.

También notablemente, se encontró que los miembros relacionados de las mismas familias de genes, mediante uno o ambos métodos, estaban metilados diferencialmente en el cáncer de colon en comparación con el tejido normal. Esto incluía genes de la familia IRX, IRX1 e IRX2, de la familia FOXD, FOXD2 y FOXD3, de la familia HOXA, HOXA2 y HOXA5, y de la familia NKX2, NKX2-2, NKX2-3 y NKX2-6.

Tabla 4

Gen	Crom	Localizacion del gen (Hg19)	Posiciones CG		número CG	Numero de CG metiladas			
			Inicio	Final		HT29	HCT116	SW480	Sangre
ADCY8	8	131792547..132052835	132051842	132052875	11	312	170	171	2
BCAT1	12	24964278..25102308	25102018	25102062	7	113	96	414	0
CCDC48	3	128749292..128759583	128720532	128720688	18	289	96	315	0
CNKR2	X	21542357..21690352	21391914	21393363	16	257	116	264	0
CNNM1	10	101088856..101154087	101088918	101089825	15	181	172	222	1
CYP24A1	20	52769988..52790516	52789985	52791441	13	274	156	209	3
*DLX5	7	96649702..96654143	96653644	96654348	6	135	61	169	5
EVX1	7	27282164..27286192	27281415	27281581	4	85	48	114	2
FOXB1	15	60296421..60298142	60296891	60297252	14	179	187	213	0
FOXI2	10	129535538..129539450	129534433	129535909	20	208	300	295	0
GHSR	3	172162951..172166203	172165903	172167853	4	96	63	134	4
GRASP	12	52400748..52409671	52401554	52401644	10	198	163	298	0
GSX1	13	28366780..28368089	28366410	28367139	12	195	99	241	3
HSD17B14	19	49316274..49339934	49339630	49340542	13	330	137	285	0
IKZF1	7	50344378...50472799	50343280	50344174	36	623	258	999	0
IRF4	6	391752..411443	391866	392501	15	222	118	212	0
*IRX1	5	3596168..3601517	3594712	3596293	20	315	156	387	1
KRBA1	7	149412148..149431664	149411473	149412383	19	240	170	367	0
NKX2-3	10	101292690..101296281	101290914	101291177	13	144	208	185	0
NPY	7	24323809..24331477	24323101	24323905	15	273	152	442	0
OTOP1	4	4190530..4228621	4228767	4229372	6	195	88	104	4
PCDH7	4	30722037..31148421	30723110	30723305	17	215	196	182	0
PDE1B	12	54943404..54973023	54943115	54943207	11	148	112	247	0
PPYR1	10	47083534..47088320	47083548	47083625	12	258	220	310	2
*SALL1	16	51169886..51185183	51186808	51187120	16	170	154	223	0
*SLC32A1	20	37353101..37358016	37352042	37352086	4	114	97	36	3
SNCB	5	176047210..176057557	176057982	176057996	3	70	59	88	4
SOX21	13	95361876..95364389	95363446	95364116	25	348	135	454	0
ST8SIA1	12	22346325..22487648	22486936	22488797	20	261	173	421	0
SUSD5	3	33191537..33260707	33260578	33260615	6	84	87	213	0
*ZNF471	19	57019212..57040270	57018864	57019470	20	415	127	440	7
ZNF582	19	56894648..56904889	56904842	56904923	12	311	154	173	0

Ejemplo 3

Perfiles de metilación de ADN de genes seleccionados en ADN de cáncer colorrectal y de tejido normal

- 5 Los cebadores se diseñaron para la amplificación del gen y/o las regiones promotoras independiente del estado de metilación para un conjunto de genes identificados en los ejemplos anteriores. Los genes, cebadores y coordenadas cromosómicas de los amplicones se muestran en la Tabla 5.

Los cebadores se utilizaron para la PCR a partir de ADN tratado con bisulfito de 10 muestras de cáncer colorrectal,

su tejido normal compatible y ADN de sangre normal. La amplificación se realizó utilizando la mezcla maestra Promega GoTaq (sin SybrGreen), $MgCl_2$ 4 mM y con cebadores a 200 nM y 10 ng de ADN de entrada. Las condiciones de ciclación fueron 95°C, 2 min (1 ciclo), seguido por 50 ciclos de 95°C 15 s, 60°C 30 s; 72°C 30 seg. donde la temperatura de reasociación N para cada amplicón se muestra en la Tabla 5. Para algunos amplicones, se añadieron 200 μ M adicionales de dATP y dTTP para permitir una amplificación comparable de secuencias de ADN tanto metiladas como no metiladas. Las bandas amplificadas de ADN se purificaron y las cantidades equivalentes de los amplicones separados derivados de cada muestra de ADN se agruparon y se ligaron con conectores para la secuenciación en el sistema Roche 454 Titanium FLX. Las muestras de ADN de cáncer o normales de pacientes individuales y la muestra de ADN de sangre se ligaron por separado con conectores "MID" con código de barras (Roche Núm. de Cat. 05619211001) para que las lecturas de secuencia puedan asignarse a continuación a muestras individuales para el alineamiento y la calificación de la secuencia. Las bibliotecas se prepararon siguiendo los protocolos provistos con el kit de preparación de la Biblioteca Roche y los reactivos y se secuenciaron en dos mitades de una celda de flujo; la mitad contenía todas las muestras de cáncer y la otra, las muestras normales con códigos de barras equivalentes. Las lecturas de secuenciación con bisulfito se segregaron en muestras individuales utilizando las secuencias de códigos de barras y se alinearon con la secuencia convertida con bisulfito de cada amplicón. Después de la mejor alineación, se determinó la fracción de citosinas en cada sitio de metilación de CpG potencial para cada muestra.

Los perfiles de los amplicones individuales se muestran en las Figuras 3-27. Los datos de 57 amplicones que representan 24 genes o regiones se resumen en la Tabla 6. La tabla muestra el rango aproximado de niveles de metilación en los sitios CpG a través de cada amplicón para las muestras de cáncer individuales, AJ y datos combinados para los 10 ADN normales emparejados. Las columnas muestran en el encabezamiento m/10 y p/10 el número de muestras de cáncer de cada 10 que muestran metilación de alto nivel (> 60%) o parcial (30-60%) a través del amplicón. Se ha informado previamente sobre la metilación de dos de estos genes, ADAMTS1 y TMEFF2 en el cáncer colorrectal y muestran metilación de nivel parcial o alto en 9 o 10 muestras de cáncer, respectivamente. Entre los 23 nuevos genes sometidos a ensayo, solo el gen FGFR2 no mostró metilación diferencial entre las muestras de cáncer y normales. La mayoría de los genes mostraron una metilación diferencial en una alta proporción de muestras. Nueve genes - DLX5, FOXD2, IRX1, MEIS1, MMP2, NPY, PDX1, SUSD5 y TCF21 - mostraron una metilación alta o parcial en las 10 muestras, 9 genes - COL1A2, COL4A1, EFEMP, FGF5, FOXF1, GRASP, SDC2, SOX21 y ZNF471 - en 9 muestras, FOXB1 en 8 muestras, PPP1R14A en siete, FBN1 y EDIL3 en seis y MEIS en tres muestras. En algunos casos, p. ej., EDIL3, FBN1, Región 2 de GRASP, MEIS1 y SDC2, el nivel de metilación en el tejido colónico normal emparejado fue sistemáticamente muy bajo. Para otros genes o regiones, p. ej. DLX5, Región 3 de GRASP, IRX1, MMP2, NPY, PDX1 y TCF21, fueron evidentes niveles significativos de metilación en el tejido normal emparejado, pero la metilación siempre aumentó significativamente en el tejido canceroso. Los datos también demuestran que para un gen dado, no todas las regiones muestran una metilación específica para el cáncer equivalente. Por ejemplo, para el gen COL4A, las Regiones 1 y 5 muestran una metilación alta o parcial en 9 de 10 muestras de cáncer, mientras que las Regiones 2 y 3 están metiladas en solo 4 o 2 muestras, respectivamente. La Región 1 COL4A se encuentra dentro del gen COL4A1, mientras que la Región 5 de COL4A se encuentra dentro del gen COL4A2 transcrito divergentemente vecino.

Los datos de secuenciación demuestran de ese modo la metilación del ADN específica de cáncer colorrectal para 23 nuevos genes y regiones específicas que se pueden utilizar para el desarrollo de ensayos para distinguir ADN de cáncer del normal.

Ejemplo 4

Análisis de metilación de ADN en muestras clínicas utilizando PCR selectiva de metilación

El ADN se extrajo de especímenes de tejido de colon que comprendían 10 adenomas, 15 en Estadio I, 18 en Estadio B, 28 en Estadio C, 7 en Estadio IV, 6 especímenes de colon normal emparejados y otras 7 muestras de tejido de colon normal. El ADN aislado se convirtió con bisulfito utilizando el kit de conversión de bisulfito Zymo EZ Gold según lo recomendado por el fabricante. Los ensayos de PCR se realizaron en 15 μ L de mezclas de reacción que contenían una concentración final de 200 nM de oligonucleótidos y $MgCl_2$ como se muestra en la Tabla 7 y una dilución 1:120.000 de Molecular Probe SYBR Green (Invitrogen). Las amplificaciones de GRASP y NPY se realizaron en 1x Platinum Buffer (Invitrogen) utilizando 0,15 μ L de ADN polimerasa Taq Platinum (Invitrogen). Las amplificaciones de COL4A y SDC2 se realizaron en AmpliTaq, Taqman Buffer A utilizando 0,1 μ L · (0,5 unidades) de AmpliTaq Gold (Applied Biosystems). Las amplificaciones por PCR se realizaron en un aparato de PCR en tiempo real Roche LightCycler 480 utilizando placas de 384 pocillos utilizando las condiciones de ciclación que se muestran en la Tabla 7 para cada amplicón. Los niveles de metilación se cuantificaron utilizando una curva patrón de ADN completamente metilado, de 40 pg a 5 ng mezclados con ADN de leucocitos de sangre periférica para obtener una entrada total de 5 ng. La proporción de ADN metilado en una muestra se determinó dividiendo la cantidad de ADN metilado, calculada a partir de la curva patrón para ADN completamente metilado, por la cantidad de ADN de entrada.

Tabla 7

Gen	Par de Cebadores	Condiciones de PCR
GRASP	MSPF1: 5'CGGAAGTCGCGTTCGTC (SEQ ID NO:72)	Tampón Plat Taq que contiene MgCl ₂ 4 mM. 95°C 2 min, seguido de 50 ciclos de (85°C 15 seg, 64°C 15 seg, 72°C 20 seg).
	MSPR1: 5' GCGTACAACCTCGTCCGCTAA (SEQ ID NO:73)	
COL4A	MSP F3 5' GAATGTATTTGGTCGTGTTACGC (SEQ ID NO:74)	TaqMan Gold Buffer A que contiene MgCl ₂ 3,3 mM. 95°C 10 min, seguido de 50 ciclos de (95°C 15 seg, 63°C 15 seg, 72°C 20 seg).
	MSP R2 5'CCCGACGTCCCGCC (SEQ ID NO:75)	
SDC2	MSPF1 5' TTTAGTATTTTCGGACGCGTTTC (SEQ ID NO:76)	TaqMan Gold Buffer A que contiene MgCl ₂ 4 mM. 95°C 10 min, seguido de 50 ciclos de (95°C 15 seg, 63°C 15 seg, 72°C 20 seg).
	MSPR1 5'GAAATAACCGACACTACGTAAAATCG (SEQ ID NO:77)	
NPY	MSPF2 5' CGGAGACGTTTCGTTTCGATAGT (SEQ ID NO:78)	Tampón Plat Taq que contiene MgCl ₂ 2 mM. 95°C 2 min, seguido de 3 ciclos de (95°C 15 seg, 63°C 15 seg, 72°C 20 seg) and 50 ciclos de (84°C 15 seg, 64°C 15 seg, 72°C 20 seg.).
	MSPR2 5' CAAACGAATCGTAACACTCACG (SEQ ID NO:79)	

Las muestras de ADN se calificaron como positivas si la fracción de ADN metilado era >1% para GRASP o >2% para NPY, SDC2 y COL4A1. El número y el % de muestras positivas para cada ensayo de biomarcadores se muestran en la Tabla 8. Para muestras de ADN de cáncer, una alta proporción de muestras, con un rango de 88 a 94%, fueron positivas para la metilación de cada marcador. Por el contrario, la proporción de muestras positivas entre los controles normales emparejados fue baja (0-25%). Dentro de las muestras de ADN normales, el nivel de metilación medido mediante los ensayos MSP fue cuantitativamente bajo en comparación con el de las muestras de ADN de cáncer.

Tabla 8

		GRASP		NPY		SDC2		COL4A	
	Muestras totales	Número de positivos (corte 1%)	% positivos	Número de positivos (corte 2%)	% positivos	Número de positivos (corte 2%)	% positivos	Número de positivos (corte 2%)	% positivos
Adenoma	10	6	60	7	70	7	70	8/9	89
Cáncer A	15	12	80	14	93	14/14	100	10/12	86
Cáncer B	18	18	100	14/17	82	17	94	13/14	93
Cáncer C	28	25	89	25	89	27	96	17/18	94
Cáncer D	7	7	100	6	86	5	72	5/6	83
Total Cáncer	68	62	91	59 (/67)	88	63 (/67)	94	45(/50)	90

		GRASP		NPY		SDC2		COL4A	
	Muestras totales	Número de positivos (corte 1%)	% positivos	Número de positivos (corte 2%)	% positivos	Número de positivos (corte 2%)	% positivos	Número de positivos (corte 2%)	% positivos
Normal emparejado	6	0	0	1	16	1	16	1/4	25
Otros colon normal	7	1	14	3	42	2	28	2/4	50
Int. delgado; estómago; recto	3	0	0	1	recto	0		Int. delgado, recto	

Ejemplo 5

Análisis de metilación de los genes GRASP y COL4A1 en ADN aislado de plasma

Los ensayos para los genes GRASP y COL4A1 también se realizaron en muestras de ADN plasmático de pacientes con cáncer colorrectal, adenomas colorrectales o pacientes sin neoplasia colorrectal según lo determinado por colonoscopia. El ADN se extrajo de 4 mL de plasma sanguíneo humano utilizando el aislamiento QIAmp de los ácidos nucleicos circulantes libres del suero/plasma (QIAGEN). El ADN aislado se convirtió con bisulfito utilizando el kit de conversión con bisulfito Zymo según lo recomendado por el fabricante. Se recuperó un total de 36 µL de ADN convertido con bisulfito de 4 mL de plasma. La presencia de secuencias de COL4A1 metiladas se determinó utilizando el ensayo MSP descrito en el Ejemplo 4, excepto que se incluyó una sonda de detección específica Sonda BS1 de COL4A1, HEX-5'CTAAACCCGTCGCTACCCCTC-BHQ (SEC ID NO: 80) a 100 nm.

La detección de las secuencias de GRASP metiladas se realizó mediante una PCR semi-anidada. La primera ronda de PCR se realizó en 30 µl (2,5 µl de de entrada ADN convertido con bisulfito) que consistía en una concentración final de 1x Platinum Taq Buffer, 0,1 µL ADN polimerasa Platinum Taq (Invitrogen), MgCl₂ 3,3 mM, dNTP 200 µM (New England BioLabs) y 33 nM de oligonucleótidos. La primera ronda de amplificación usó el cebador directo GrspA-F1 5'-CGGATTTTCGATTCGGAAGT (SEC ID NO: 81) y GRASP MSPR1 de la Tabla 7, Ejemplo 4. Las condiciones de ciclación fueron de 95°C durante 2 minutos, seguidas de once ciclos de 92°C, 15 seg; 60°C, 30 seg y 72°C 30 seg. Las amplificaciones de PCR se realizaron en el ciclador de PCR de punto final PALM utilizando placas de 96 pocillos. La segunda ronda de PCR utilizó los cebadores y las condiciones de reacción del Ejemplo 4, Tabla 7 y se realizó en 1 µL de material de la ronda 1 de PCR en una reacción de PCR total de 15 µL. Los niveles de metilación se cuantificaron utilizando una curva patrón de ADN completamente metilado, de 40 pg a 5 ng mezclados con ADN de leucocitos de sangre periférica para obtener una entrada total de 5 ng. La curva patrón se basó en la entrada en la ronda única para COL4A1 o la primera ronda para GRASP.

La proporción de muestras de ADN plasmático con un resultado positivo en al menos 2 o 3 PCR por triplicado se muestra en la Tabla 9. Los datos muestran que ambos

Tabla 9

75	n (%)	Promedio	F/M	% pos COL4A1	% pos GRASP
Normal	44	63	19/25	11%	11%
Adenoma	44	63	21/22	9%	18%
LGD	18	68	7/11	0%	11%
HGD	1	30	-	0%	100%
>3 lesiones	21	62	6/12	5%	14%
<3 lesiones	23	65	12/11	13%	22%
TA	31	62	14/17	3%	16%
TVA	3	76	1/2	0%	33%
VA	4	59	3/1	50%	25%

75	n (%)	Promedio	F/M	% pos COL4A1	% pos GRASP
otros	6	59	3/3	17%	17%
>10mm	17	66	6/11	0%	6%
<10mm	27	69	15/12	15%	26%
Cancer	44	61,1	21/23	43%	48%
I	-	-	-	-	-
II	12	63	8/4	42%	42%
III	11	64,6	5/6	36%	64%
IV	8	55,4	4/4	75%	63%
Estadio desc.	13	68	4/9	31%	31%

Los expertos en la técnica apreciarán que la invención descrita en la presente memoria es susceptible de variaciones y modificaciones distintas de las descritas específicamente. Se debe entender que la invención incluye todas estas variaciones y modificaciones. La invención también incluye todas las etapas, características, composiciones y compuestos mencionados o indicados en esta memoria descriptiva, individual o colectivamente, y todas y cada una de las combinaciones de dos o más cualesquiera de dichas etapas o características.

Tabla 5

Gen	Región	Crom.	Inicio	Fin	Secuencia cebador	CpG	Cond. ensayo
ADAMTS1	Región 1	21	28217946	28218109	gtgattagtagttttgtattgtggggt	10	58°C
					aaccRaaccctccctcctaaa		
ADAMTS1	Región 2	21	28218494	28218777	TTGGAATGGGTGATTGGG	13	58°C
					CTTCTTTCCCCCTCTACACRCTTACTAA		
COL1A2	Región 2	7	94024141	94024345	GGAGGTATTTTAGGGTTAGGGAAAT	11	56°C
					ATATCTAACACTTAAACATACAAACTCCTTATAT		
COL4A	Región 1	13	110959094	110959330	AAAGGAGGTTYGGTTTATTAATG	25	56°C
					CCTTCTACTCCACRAAAAACACA		
COL4A	Región 3	13	110960787	110961141	AGTGTGTTAGTTATTAGGTAGTGAGAYGTT	20	58°C
					CAATACAATCRCCAACTACACCCAC		
COL4A	Región 4	13	110961331	11096165	GATGGAGTAGTTTTGTTTTGTGGTAGT	10	56°C
					AACCTAAAATACTCTAATCAAATCTCC		
COL4A	Región 5	13	110959932	110960181	TAGYGTAGGATGAGGGAGGT	20	56°C, 2X dAdT
					CRCCTTATACAAACTAAACTACAC		
DLX5	Región 1	7	96650026	96650127	AGAGTAAGAGAGAGTAGTTTATTTAATAGAGTGTTT	6	56°C, 2X dAdT
					CCAACTCAATCAATTCCCACCTA		
DLX5	Región 2	7	96651454	96651618	GTGTAGTTTAGGTAGGTTTAGTGATGGTAG	9	56°C, 2X dAdT
					CCAAACTATTATTCCAACTTTCAA		
DLX5	Región 3	7	96653553	96653732	TTGTTTAGTTTTTTTTTTGTTTATGTATTTG	13	56°C, 2X dAdT
					AACTCTCAACCCCTACCAATATCAAT		
EDIL	región 1	5	83679544	83679807	AGAAAGTTGAAGTGATTGTGAGATTT	23	56°C, 2X dAdT
					CAAACCCCTCCCTAAACAATACRA		
EDIL	Región 2	5	83679784	83679988	TTYGTATTGTTTAGGGAGGGTTTG	13	56°C

Gen	Región	Crom.	Inicio	Fin	Secuencia cebador	CpG	Cond. ensayo
					AATCCTAAATACCCCRAAAAAATACTT		
EDIL	Región 3	5	83679960	83680263	ATAAGTATTTTTYGGGTATTTAGGATT	31	56°C, 2X dAdT
					CTACCACCTCRACACTACCTACCCTC		
EDIL	Región 4	5	83680075	83680383	GGGGATTTTTAGTTATTTTTATTTAGTTG	22	58°C
					AAAACCTCTCTCTTAATCACCCTCT		
EFEMP	Región 1	2	56150356	56150606	GGTTTTAGGTTGTTAGGATYGGA	13	56°C, 2X dAdT
					CAACCRACAAAACCTTACCCATAA		
EFEMP	Región 2	2	56150304	56150523	TAGGAGTTGGTTAGAAGTTGG	14	56°C, 2X dAdT
					ACRACATAATTCTCTTTATCTTATCA		
FBN1	Región 3 (-)	15	48938136	48938384	ATTGGTTTTTTTTYGGGTAGGGTT	13	56°C, 2X dAdT
					CAATAAAAAAAAAACAAAATAATCAAATCCTA		
FGF5	Región 1	4	81186918	81187228	GYGGTTAGTTATATGTGTTGGTGTTAGT	18	56°
					CAACCCAACCTTAAAAACCTTTAATATAAC		
FGF5	Región 2	4	81187326	81187578	ATAGTAGGGTTTATAGGGTAAAGAGAGGAG	16	58°C
					CACRCATCCCAACAATTCTC		
FGF5	Región 3	4	81187571	81187792	GATGYGTGGTTTTGGTATGGG	17	56°C
					TTTATAACRCCAATAATCTCACTACTCC		
FGFR2	Región 2	10	123355549	123355736	GGTGTGGGAATATAGGTTAGTATGT	6	56°C
					CCATCCATCAAAAAAAAAATAACAA		
FOXB1	Región 1	15	60296522	60296719	GAGGGAGGATATGGAGGTAGTTATT	24	56°C, 2X dAdT
					AACCTAACTCTTAACTCAACCCC		
FOXB1	Región 2	15	60297024	60297305	AGTTTGTTATTYGGTTTGGTTGATTT	21	56°C, 2X dAdT
					AAAAACRATCCATAATAAACTTATAAATCTC		
FOXD2	Región 1	1	47899091	47899337	TTTTATTATTTYGGAATTTGTGATT	12	56°C, 2X dAdT
					TTCTCTTTCCRCTACTCCTAACCCTA		
FOXD2	Región 2	1	47909944	47910172	AAGGATTTTGTAAGAGAAAGGGAGA	13	58°C
					AACCCCAACCTACACAACATTTTA		
FOXF1	Región 1	16	86544560	86544770	GAGTTTATGTTYGAGGAGGGTTTTT	16	56°C, 2X dAdT
					AATAACCRITTCATCATACCCAAACC		
FOXF1	Región 2	16	86544265	86544584	GTTYGGTTYGTTAAGGTTAAGAAGATTAA	20	56°C, 2X dAdT
					AAAACCCTCCTCRAACATAAACTC		
FOXF1	Región 3	16	86544795	86545110	TTTTGTTAGTTATTYGGTGTTTTATTGT	19	56°C, 2X dAdT
					RACTACTCCAAAAAATACRTAAAAAACTAC		
GRASP	Región 1	12	52399672	52399922	GATGGGTGTTGGGATATGGA	9	56°C, 2X dAdT
					TTCAAACTAAAAAATAACCATACTCAAC		
GRASP	Región 2	12	52400821	52401119	TAGGAAGTTGTAGTAGAAGGAGGAGG	35	56°C, 2X dAdT

ES 2 707 341 T3

Gen	Región	Crom.	Inicio	Fin	Secuencia cebador	CpG	Cond. ensayo
					CRAAATCAACAAACCCTATAAAAAATC		
GRASP	Región 3	12	52401407	52401664	GATAGAGATAGTTTTAGGTAAGTTGAAGGTT	22	56°C, 2X dAdT
					CCTACRACCCCTCCCACTAC		
IRX1	Región 1	5	3597227	3597480	TGYGTTATATAATGGAGGATTAAAGAAAATA	10	56°C, 2X dAdT
					AAAAAACTACCTCCCAAACCC		
IRX1	Región 2 (-)	5	3599990	3600175	GAATTTGTGATGTGGTAGGTGTATAGTT	20	56°C, 2X dAdT
					CCRCACRACAAACCCAAAATCTAAT		
IRX1	Región 3 (-)	5	3600160	3600352	GATYGAGGTTTTGTTTTATTGAGTGT	13	56°C, 2X dAdT
					CCACATCRACAAATTCTCCAATAA		
IRX1	Región 4	5	3594657	3594847	GGAGTTYGGTGTGTTGGAGAGT	15	56°C, 2X dAdT
					CCTCCTCRCTCCCTAAACCTA		
MEIS1	Región 1	2	66662009	66662219	GAGGGAGAAAAGAATATTGAAAATAAAGT	13	56°C, 2X dAdT
					CRTCTTACACAATACATTAACTACAACAAAT		
MEIS1	Región 2	2	66662177	66662430	TYGAGGAGTTTATTTGTTGTAGTTTAATGT	10	56°C, 2X dAdT
					TCTCTCTCCCTCTTACAAATACTACACTA		
MMP2	Región 2 (-)	16	55512662	55512856	TAGTTTTAGAATTTTTTTGTTGGGAAATAT	6	56°C
					AAAATTTCTATCTCTAACCATCTATCATTATAA		
MMP2	Región 3	16	55513916	55514215	TAATTTTTGGATATATTTGGGTAGTTGT	9	58°C
					AAAAAATACRCTCTCTACTTCCCTCCTA		
NPY	Región 1	7	24323765	24323936	GGYGAGGAAGTTTTATAAAAGTTTTG	15	56°C, 2X dAdT
					CCTTTCTCTCCCACCCCTAA		
NPY	Región 2	7	24324150	24324342	TTATTTTTTAGTAGATATGGAGGGAGAATT	14	56°C, 2X dAdT
					AACCCAAAAATCCAAAAAATAACA		
NPY	Región 3	7	24324513	24324717	GGGAGAAAAGTGATTTAGTAGGAAGAAT	15	56°C, 2X dAdT
					AACCCAAAAATAACTAACACCACCTTA		
PDX1	Región 1	13	28502100	28502311	GGTTGGGTTYGGGATTAGAGTT	10	56°C, 2X dAdT
					CCRCCTCCTTATAAACCCACTATATAA		
PDX1	Región 2	13	28502417	28502603	TTTTTAGGGAGGTTTAGGGAGGTA	12	56°C, 2X dAdT
					TCTAATCCAAAAAATATCRATCCAATA		
PDX1	Región 3 (-)	13	28503006	28503210	GAAGATTTTAAGAGGAATGGAGGGT	11	56°C, 2X dAdT
					AAAAAAAACAAAACCTACCAAAAATA		
PPP1R14A	Región 3 (-)	19	38747251	38747424	ATAAATGGATGGATGAGTGAATGAAT	13	56°C, 2X dAdT
					AAATCCTATAAAACRAAACCTAAACAAA		
PPP1R14A	Región 4	19	38746653	38746912	TYGTTTTTTGTGTAGATTAGGTTGGT	26	56°C,

Gen	Región	Crom.	Inicio	Fin	Secuencia cebador	CpG	Cond. ensayo
							2X dAdT
					CAAAAAACAATCCCRAAAACTACAA		
QK1	Región 3	6	163835521	163835719	GGGGYGGYGGGTAGTAGGTAG	30	56°C, 2X dAdT
					CCTCCTCCTCCTCACTCACTTAA		
SDC2	Región 1 (-)	8	97506813	97507045	AATTAATTGTATGTAGTTAAATAGGAAAGT	17	56°C
					AAAAACCCCTAAAATCACTCCCAA		
SDC2	Región 2 (-)	8	97507037	97507257	TYGTAGGATTGGGAATTTAGTGGT	14	56°C, 2X dAdT
					CAATTAATTCTAAAAAATAAAACCAAATTTAAA		
SOX21	Región 1 (-)	13	95364013	9536417	GGGAGTAGAGTGGAATTGTTTATAGAGT	14	56°C, 2X dAdT
					AAACACCTAAAAAACTAACTTATCCTTCTTA		
SOX21	Región 2 (-)	13	95364515	95364784	TGAGAGTTTTTTTTGGTATTTGGTAGTA	25	56°C, 2X dAdT
					RAACAAATTATCTCTAAACACTCTAACTTCT		
SUSD5	Región 2 (-)	3	33260566	33260818	GGGGAGGAGGTAGTTGAAAAGTAG	21	56°C, 2X dAdT
					CCTAAAAACCTCRATACCAAAAAAAC		
TCF21	Región 1	6	134210545	134210749	GGTTTTTTTAGYGATGTGGAGGATTT	9	58°C
					CCCCRCTCAAAAACTCTTCTTAATAA		
TCF21	Región 2	6	134210712	134210951	GAGGAAGGYGTTTATTAAGAAGAGT	14	56°C
					TTATCRTTAACCAAAATCTACCTCAAAT		
TCF21	Región 3 (-)	6	134210994	134211274	GGGATTTTTTTTTTGTGTAGTTTAATAT	26	56°C
					TCCCRAAACTACAACATAATCCAA		
TMEFF2	Región 5	2	193059382	193059532	GTTTTTTAGAGTTTTTTTTTATGGTAGTAGT	11	56°C, 2X dAdT
					CRAAAAAACAACAACCAAAACCC		
ZNF471	Región 1 (-)	19	57018955	57019135	GTTGTTGAAGGAGTGAGAGGGAT	14	56°C
					AACTAATAACTAAAAACRCTTCTAATCTCTAAAC		
ZNF471	Región 2	19	57019294	57019573	GTTTTGGGTGGTTTGGGAGTT	28	56°C, 2X dAdT
					CACACTCTAACAAATCTTTTACACACAA		

Tabla 6

Núm. de Amplicón	Gen	Región	m/10	p/10	A	B	C	D	E	F	G	H	I	J	Normales
1	ADAMTS1	Región 1	7	2	60	80	80	80	30	20	0	80	80	80	<20
5	COL1A2	Región 2	7	2	50	30	60	70	60	40	20	60	80	40	<10
6	COL4A	Región 1	6	3	60	60	50	60	30	30	0	70	60	50	<10
7	COL4A	Región 3	3	1	40	0	0	60	0	0	0	30	70	0	<10
8	COL4A	Región 4	2	0	60	0	0	0	0	0	0	0	60	0	<20
9	COL4A	Región 5	6	3	60	80	60	80	50	40	0	40	80	60	<20

ES 2 707 341 T3

Núm. de Amplicón	Gen	Región	m/10	p/10	A	B	C	D	E	F	G	H	I	J	Normales
10	DLX5	Región 1	7	3	70	70	70	80	40	50	90	70	80	30	10-30
11	DLX5	Región 2	8	2	70	80	80	80	30	40	80	80	80	80	10-40
12	DLX5	Región 3	6	3	70	0	60	80	40	40	80	40	80	80	10-30
13	EDIL	region 1	5	1	60	0	50	50	30	20	0	60	60	10	~10
14	EDIL	Región 2	5	1	80	10	80	80	40	10	0	80	90	10	<10
15	EDIL	Región 3	5	1	70	0	60	60	30	10	0	60	80	0	<10
16	EDIL	Región 4	5	1	70	10	60	60	20	10	0	60	80	0	<10
18	EFEMP	Región 1	8	1	70	60	60	70	30	70	0	70	70	60	~20
19	EFEMP	Región 2	7	2	70	80	50	70	40	70	10	70	70	70	~25
20	FBN1	Región 3	5	1	70	10	80	70	40	10	0	80	90	0	<10
21	FGF5	Región 1	5	4	80	80	50	80	30	50	50	80	80	0	<10
22	FGF5	Región 2	5	3	60	70	50	60	30	20	40	70	80	0	<10
23	FGF5	Región 3	4	4	60	30	40	70	20	10	30	70	80	0	<10
24	FGFR2	Región 2	9	1	80	80	80	80	40	60	80	80	80	80	40-90
25	FOXB1	Región 1	4	4	60	0	30	70	40	30	0	70	70	20	<10
26	FOXB1	Región 2	5	3	80	0	40	80	60	40	0	80	80	30	<10
27	FOXD2	Región 1	9	1	80	80	80	90	70	50	80	90	60	70	20-40
28	FOXD2	Región 2	6	2	70	70	40	80	30	20	10	80	80	70	<20
29	FOXF1	Región 1	5	4	60	50	40	60	50	40	0	60	70	60	20-40
30	FOXF1	Región 2	5	4	60	60	30	70	50	40	0	30	80	70	<20
32	GRASP	Región 1	4	2	60	70	70	20	60	30	0	30	20	10	10-20
33	GRASP	Región 2	7	2	70	80	70	70	40	50	0*	80	90	30	<5
34	GRASP	Región 3	9	1	60	70	70	60	30	40	60	70	70	60	30-60
35	IRX1	Región 1	8	2	70	70	70	70	40	40	70	70	70	70	10-60
36	IRX1	Región 2	8	2	70	70	70	70	40	40	70	70	70	70	10-60
37	IRX1	Región 3	8	2	70	70	70	70	50	50	70	70	70	70	10-60
38	IRX1	Región 4	8	2	70	70	70	60	40	40	80	60	70	70	10-50
39	MEIS1	Región 1	3	0	0	0	0	70	40	0	0	0	50	0	<5
40	MEIS1	Región 2	2	1	0	0	0	70	20	0	0	0	50	0	<5
41	MMP2	Región 2	7	3	30	60	40	60	20	60	50	60	70	50	20-50
42	MMP2	Región 3	2	8	20	40	20	30	20	20	0	20	50	50	<30
43	NPY	Región 1	7	3	30	60	80	40	30	20	60	40	40	50	10-60
44	NPY	Región 2	8	2	70	80	80	80	40	40	80	80	80	80	20-60
45	NPY	Región 3	8	2	50	70	70	70	40	40	80	70	70	70	10-60
46	PDX1	Región 1	7	3	70	90	90	80	50	40	80	70	70	40	10-40
47	PDX1	Región 2	8	2	80	90	80	80	50	50	80	80	70	60	10-50
48	PDX1	Región 3	8	2	70	70	80	80	50	50	80	70	70	60	10-40
49	PPP1R14A	Región 3	4	3	80	10	30	80	30	30	0	80	80	0	10-50
50	PPP1R14A	Región 4	3	2	70	30	50	70	10	20	0	10	30	10	10-60

Núm. de Amplicón	Gen	Región	m/10	p/10	A	B	C	D	E	F	G	H	I	J	Normales
54	SDC2	Región 1	7	2	50	70	70	60	40	30	0	60	70	50	<10
55	SDC2	Región 2	6	2	70	90	70	80	30	10	0	90	80	40	<10
57	SOX21	Región 1	4	5	40	40	60	60	30	30	0	70	60	30	<20
58	SOX21	Región 2	6	3	60	70	60	70	40	40	10	60	70	50	<30
59	SUSD5	Región 2	9	1	80	90	70	80	60	50	70	80	70	70	10-50
60	TCF21	Región 1	8	2	70	70	70	70	50	50	70	70	80	60	10-50
61	TCF21	Región 2	10	0	70	90	80	90	60	60	90	80	80	80	40-80
62	TCF21	Región 3	8	2	70	70	70	70	40	50	70	70	70	70	10-50
63	TMEFF2	Región 5	6	4	60	70	70	80	50	50	50	80	80	50	10-30
64	ZNF471	Región 1	4	4	70	20	40	60	40	30	40	70	60	0	<20
65	ZNF471	Región 2	4	5	60	30	40	60	40	30	40	60	60	0	<20

Bibliografía

- Abrams y Stanton, *Methods Enzymol.*, 212:71-74, 1992
- Adorjan et al. *Nucl. Acids Res.*, 30: e21, 2002
- 5 Alon et al., *Proc. Natl. Acad. Sci. USA*: 96:6745-6750, junio de 1999
- Ammerpohl et al. *Biochim Biophys Acta*. 1790:847-62, 2009
- Ausubel, F. et al., "Current Protocols in Molecular Biology", John Wiley & Sons, (1998)
- Beaucage, et al. *Tetrahedron Letters* 22:1859-1862, 1981
- Bianco et al., *Hum. Mutat.*, 14:289-293, 1999
- 10 Bonner y Laskey, *Eur. J. Biochem.* 46:83, 1974
- Bresslauer et al., *Proc. Natl. Acad. Sci. USA*, 83: 3746-3750, 1986
- "Cancer" National Cancer Institute 2009. <http://www.cancer.gov/cancertopics/commoncancers>
- Caruthers et al., *Methods in Enzymology*, Vol. 154, pág. 287-314 (1988)
- Chen and Kwok, *Nucleic Acids Res.* 25:347-353, 1997
- 15 Clark et al. *Nat Protoc.* 1:2353-64, 2006
- Cottrell et al., *Nucl. Acids Res.* 32: e10, 2003
- DeGraves, et al., *Biotechniques* 34(1):106-10, 112-5 (2003)
- Deiman B, et al., *Mol. Biotechnol.* 20(2):163-79 (2002)
- Deng et al. *Chin. J. Cancer Res.*, 12:171-191,2000
- 20 Dieffenbach y Dveksler (Eds) (En: PCR Primer: A Laboratory Manual, Cold Spring Harbor Laboratories, NY, 1995
- Eads et al., *Cancer Res.* 59:2302-2306 (1999)
- Eads et al., *Nucl. Acids Res.* 28: E32, 2000
- Egholm et al., *Am. Chem. Soc.*, 114:1895, 1992
- Egholm et al., *Nature*, 365:566, 1993
- 25 Fodor et al., *Science* 767-773, 1991
- Frommer et al., *Proc. Natl. Acad. Sci. USA* 89:1827-1831 (1992)
- Gibson et al., *Genome Research* 6:995-1001 (1996)
- Golub et al., *Science*, 286:531-537, 1999
- Gonzalzo y Jones, *Nucleic Acids Res.* 25:2529-2531 (1997)
- 30 Gonzalzo et al., *Cancer Res.* 57:594-599, 1997
- Herman et al., *Proc. Natl. Acad. Sci. USA* 93:9821-9826, (1996)
- Holland et al., *Proc. Natl. Acad. Sci. USA*, 88:7276-7280, 1991
- Kawai et al., *Mol. Cell. Biol.* 14:7421-7427, 1994
- Kristensen y Hansen *Clin Chem.* 55:1471-83, 2009
- 35 Kuppaswamy et al., *Proc. Natl. Acad. Sci. USA* 88:1143-1147, 1991
- Landegren et al., *Genome Res.*, 8(8): 769-776, 1998
- Lee et al., *Nucleic Acid Res.* 21:3761-3766, 1993
- Markowitz and Bertagnolli (2009). *N. Engl. J. Med.* 361(25):2449-60
- Marmur and Doty, *J. Mol. Biol.* 5:109, 1962
- 40 Messing, *Methods Enzymol*, 101, 20-78, 1983
- Mhlanga y Malmberg, *Methods* 25: 463-471, 2001
- Moore et al., *BBA*, 1402:239-249, 1988
- Narang, et al. *Meth. Enzymol* 68: 90, 1979

- Nielsen et al., *J. Chem. Soc. Perkin Trans.*, 1:3423, 1997
 Olek, et al. *Nat. Genet.* 17(3): 275-6 (1997)
 Orum et al., *Clin. Chem.* 45:1898-1905, 1999
 Orum et al., *Nucl. Acids Res.*, 21:5332, 1993
 5 Publicación PCT Núm. WO 00/70090
 Rand et al. *Epigenetics* 1:94-100, 2006
 Rand et al. *Nucl. Acids Res.* 33:e127, 2005
 Rein, et al. *Nucleic Acids Res.* 26 (10): 2255-64 (1998)
 Robinson et al. *Epigenomics* 2:587-98 (2010)
 10 Sadri y Hornsby, *Nucl. Acids Res.* 24:5058-5059 (1996)
 Sambrook et al., *Molecular Cloning, A Laboratory Manual* (2ª Ed., CSHP, Nueva York 1989)
 Santa Lucia, *Proc. Natl. Acad. Sci. USA*, 95: 1460-1465, 1995
 Shames et al. *Cancer Lett.* 251:187-98, 2007
 Simeonov y Nikiforov, *Nucleic Acids Research*, 30(17):1-5, 2002
 15 Singer-Sam et al., *Nucl. Acids Res.* 18, 687, 1990
 Singer-Sam et al., *Nucl. Acids Res.* 18:687, 1990
 Singer-Sam et al., *PCR Methods Appl.* 1: 160-163, 1992
 Singh y Wengel, *Chem. Commun.* 1247, 1998
 Southern et al., *Genomics*, 13:1008-1017, 1992
 20 Szabo y Mann, *Genes Dev.* 9: 3097-3108, 1995
 Toyota et al., *Cancer Res.* 59:2307-12 (1999)
 Patente de Estados Unidos Núm. 5.786.146
 Publicación de Patente de Estados Unidos Núm. 2005/0069879
 Uhlmann et al., *Electrophoresis*, 23:4072-4079, 2002
 25 Wedemeyer et al., *Clinical Chemistry* 48:9 1398-1405, 2002
 Weissleder et al., *Nature Medicine* 6:351-355, 2000
 Weitzel JN (1999). *Cancer* 86 (11 Suppl): 2483-92
 Worm et al., *Clin. Chem.*, 47:1183-1189, 2001
 Xiong y Laird, *Nucleic Acids Res.* 25:2532-2534 (1997)
 30 Zyskind et al., *Recombinant DNA Laboratory Manual*, (Acad. Press, 1988)

La invención se puede describir mediante la referencia a los siguientes apartados numerados:

1. Un método de escrutinio de la aparición o la predisposición a la aparición de una neoplasia de intestino grueso o seguimiento del progreso de una neoplasia en un individuo, comprendiendo dicho método evaluar el estado de metilación de una región de ADN seleccionada entre:

(i) la región definida por una o más cualesquiera de las coordenadas Hg19 y 2kb aguas arriba del sitio de inicio de la transcripción:

- | | |
|-----------------------------------|---------------------------------|
| (1) chr12:52400748..52409671 | (34) chr10:101292690..101296281 |
| (2) chr5:3596168..3601517 | (35) chr4:4190530..4228621 |
| (3) chr13:95361876..95364389 | (36) chr12:54943404..54973023 |
| (4) chr4:81187742..81212171 | (37) chr5:176047210..176057557 |
| (5) chr19:57019212..57040270 | (38) chr12:22346325..22487648 |
| (6) chr3:33191537..33260707 | (39) chr19:56894648..56904889 |
| (7) chr15:60296421..60298142 | (40) chr20:21491648..21494664 |
| (8) chr13:28494168..28500451 | (41) chr1:50883225..50889141 |
| (9) chr7:96649702..96654143, | (42) chr7:27180996..27183287 |
| (10) chr8:140,811,770-141,537,860 | (43) chr11:2016406..2019065 |
| (11) chr5:2746279..2751769 | (44) chr14:57267425..57277184 |
| (12) chr18:55102917..55158530 | (45) chr4:126237567..126414087 |
| (13) chr20:37353101..37358016 | (46) chr8:23559964..23563922 |
| (14) chr8:2792875..4852328 | (47) chr10:131633547..131762091 |
| (15) chr16:66613351..66622178 | (48) chr4:62362839..62938168 |
| (16) chr5:37815753..37839782 | (49) chr1:47901689..47906363 |
| (17) chr1:63788730..63790797 | (50) chr17:77768176..77770890 |
| (18) chr15:37156644..37178734 | (51) chr17:93598762..93604831 |

- | | |
|---------------------------------|-----------------------------------|
| (19) chr7:27139973..27142394 | (52) chr1:33789224..33841194 |
| (20) chr20:21686297..21696620 | (53) chr9:124,004,679-124,030,840 |
| (21) chr16:51169886..51185183 | (54) chr4:158141736..158287227 |
| (22) chr12:85253267..85306606 | (55) chr12:9445136..9462559 |
| (23) chr8:6357172..6420784 | (56) chr12:24964278..25102308 |
| (24) chr14:85996488..86094270 | (57) chrX:21542357..21690352 |
| (25) chr2:182541194..182545381 | (58) chr20:52769988..52790516 |
| (26) chr7:30951468..30965131 | (59) chr3:172162951..172166203 |
| (27) chr8:131792547..132052835 | (60) chr13:28366780..28368089 |
| (28) chr3:128749292..128759583 | (61) chr7:50344378..50472799 |
| (29) chr10:101088856..101154087 | (62) chr7:149412148..149431664 |
| (30) chr7:27282164..27286192 | (63) chr7:24323809..24331477 |
| (31) chr10:129535538..129539450 | (64) chr4:30722037..31148421 |
| (32) chr19:49316274..49339934 | (65) chr10:47083534..47088320 |
| (33) chr6:391752..411443; o | |

(ii) la región del gen, que incluye 2kb aguas arriba, de uno o más cualesquiera de:

- | | | | |
|----------------|-----------------|--------------|--------------|
| (1) GRASP | (18) ANGPT2 | (35) NKX2-6 | (52) HOXA5 |
| (2) IRX1 | (19) LHX6 | (36) PAX1 | (53) GDNF |
| (3) SOX21 | (20) NEUROD1 | (37) FOXD2 | (54) FAT4 |
| (4) FGF5 | (21) AC149644.1 | (38) SLC6A15 | (55) HOXA2 |
| (5) ZNF471 | (22) CCDC48 | (39) PHC2 | (56) LPHN3 |
| (6) SUSP5 | (23) EVX1 | (40) FLRT2 | (57) ADCYAP1 |
| (7) FOXB1 | (24) GHSR | (41) GATA2 | (58) GRIA2 |
| (8) PDX1 | (25) HSD17B14 | (42) ADCY8 | (59) AQP1 |
| (9) DLX5 | (26) KRBA1 | (43) CNNM1 | (60) BCAT1 |
| (10) ONECUT2 | (27) OTOF1 | (44) IKZF1 | (61) CYP24A1 |
| (11) DMRTA2 | (28) PPYR1 | (45) NKX2-3 | (62) FOXI2 |
| (12) CMTM2 | (29) SRMS | (46) PCDH7 | (63) GSX1 |
| (13) OTX2 | (30) ZNF582 | (47) SNCB | (64) IRF4 |
| (14) LOC145845 | (31) IRX2 | (48) ST8SIA1 | (65) NPY |
| (15) EBF3 | (32) CSMD1 | (49) TRAPPC9 | (66) PDE1B |
| (16) SALL1 | (33) MIR675,H19 | (50) NKX2-2 | |
| (17) CBX8 | (34) FOXD3 | (51) SLC32A1 | |

5 en una muestra biológica de dicho individuo en donde un nivel más alto de metilación de las regiones de ADN del grupo (i) y/o (ii) con respecto a los niveles de control es indicativo de una neoplasia de intestino grueso o una predisposición a la aparición de un estado neoplásico de intestino grueso.

2. El método de acuerdo con el apartado 1, en donde dichas una o más regiones de ADN se seleccionan entre:

(i) la región definida por una o más cualesquiera de las coordenadas Hg19 y 2kb aguas arriba del sitio de inicio de la transcripción:

- | | |
|------------------------------|------------------------------|
| (1) chr12:52400748..52409671 | (6) chr3:33191537..33260707 |
| (2) chr5:3596168..3601517 | (7) chr15:60296421..60298142 |
| (3) chr13:95361876..95364389 | (8) chr13:28494168..28500451 |
| (4) chr4:81187742..81212171 | (9) chr7:96649702..96654143 |

(5) chr19:57019212..57040270

(ii) la región del gen, que incluye 2kb aguas arriba, de uno o más cualesquiera de:

- | | | | |
|------------|------------|-----------|----------|
| (1) GRASP | (4) FGF5 | (6) SUSP5 | (8) PDX1 |
| (2) IRX1 | (5) ZNF471 | (7) FOXB1 | (9) DLX5 |
| (3) SOX21. | | | |

5

3. Un método de escrutinio de la aparición o la predisposición a la aparición de una neoplasia de intestino grueso o el seguimiento del progreso de una neoplasia en un individuo, comprendiendo dicho método evaluar el estado de metilación de una o más regiones de ADN seleccionadas entre las regiones de ADN definidas por las coordenadas Hg19:

- | | |
|-------------------------------|--------------------------------|
| (1) Chr12:52399672-52399922 | (30) Chr13:28502100-28502311 |
| (2) Chr12:52400821-52401119 | (31) Chr13:28502417-28502603 |
| (3) Chr12:52401407-52401664 | (32) Chr13:28503006-28503210 |
| (4) Chr8:97506813-97507045 | (33) Chr7:96650026-96650127 |
| (5) Chr8:97507037-97507257 | (34) Chr7:96651454-96651618 |
| (6) Chr13:110959094-110959330 | (35) Chr7:96653553-96653732 |
| (7) Chr5:3597227-3597480 | (36) Chr21:28217946-28218109 |
| (8) Chr5:3599990-3600175 | (37) Chr21:28218494-28218777 |
| (9) Chr5:3600160-3600352 | (38) Chr21:28218859-28219017 |
| (10) Chr5:3594657-3594847 | (39) Chr13:110960787-110961141 |
| (11) Chr13:95364013-95364178 | (40) Chr13:110961331-110961659 |
| (12) Chr13:95364515-95364784 | (41) Chr5:83679544-83679807 |
| (13) Chr4:81186918-81187228 | (42) Chr5:83679784-83679988 |
| (14) Chr4:81187326-81187578 | (43) Chr5:83679960-83680263 |
| (15) Chr4:81187571-81187792 | (44) Chr5:83680075-83680383 |
| (16) Chr19:57018955-57019135 | (45) Chr5:83680356-83680630 |
| (17) Chr19:57019294-57019573 | (46) Chr15:48938136-48938384 |
| (18) Chr3:33260566-33260818 | (47) Chr1:47899091-47899337 |
| (19) Chr2:56150356-56150606 | (48) Chr1:47909944-47910172 |
| (20) Chr6:134210545-134210749 | (49) Chr2:66662009-66662219 |
| (21) Chr6:134210712-134210951 | (50) Chr2:66662177-66662430 |
| (22) Chr6:134210994-134211274 | (51) Chr16:55512662-55512856 |
| (23) Chr7:94023751-94023975 | (52) Chr16:55513916-55514215 |
| (24) Chr7:94024141-94024345 | (53) Chr7:24323765-24323936 |
| (25) Chr15:60296522-60296719 | (54) Chr7:24324150-24324342 |
| (26) Chr15:60297024-60297305 | (55) Chr7:24324513-24324717 |
| (27) Chr16:86544560-86544770 | (56) Chr19:38747251-38747424 |
| (28) Chr16:86544265-86544584 | (57) Chr19:38746653-38746912 |
| (29) Chr16:86544795-86545110 | (58) Chr13:110959932-110960181 |

10

en una muestra biológica de dicho individuo cuando un nivel más alto de metilación de dicha región de ADN con respecto a los niveles de control es indicativo de una neoplasia de intestino grueso o una predisposición a la aparición de un estado neoplásico de intestino grueso.

4. El método de acuerdo con el apartado 3, en donde dicha región de ADN se selecciona entre las regiones de ADN definidas por las coordenadas Hg19:

(1)	Chr12:52399672-52399922	(19)	Chr2:56150356-56150606
(2)	Chr12:52400821-52401119	(20)	Chr6:134210545-134210749
(3)	Chr12:52401407-52401664	(21)	Chr6:134210712-134210951
(4)	Chr8:97506813-97507045	(22)	Chr6:134210994-134211274
(5)	Chr8:97507037-97507257	(23)	Chr7:94023751-94023975
(6)	Chr13:110959094-110959330	(24)	Chr7:94024141-94024345
(7)	Chr5:3597227-3597480	(25)	Chr15:60296522-60296719
(8)	Chr5:3599990-3600175	(26)	Chr15:60297024-60297305
(9)	Chr5:3600160-3600352	(27)	Chr16:86544560-86544770
(10)	Chr5:3594657-3594847	(28)	Chr16:86544265-86544584
(11)	Chr13:95364013-95364178	(29)	Chr16:86544795-86545110
(12)	Chr13:95364515-95364784	(30)	Chr13:28502100-28502311
(13)	Chr4:81186918-81187228	(31)	Chr13:28502417-28502603
(14)	Chr4:81187326-81187578	(32)	Chr13:28503006-28503210
(15)	Chr4:81187571-81187792	(33)	Chr7:96650026-96650127
(16)	Chr19:57018955-57019135	(34)	Chr7:96651454-96651618
(17)	Chr19:57019294-57019573	(35)	Chr7:96653553-96653732
(18)	Chr3:33260566-33260818.		

5. El método de acuerdo con el apartado 4, en donde dicha región de ADN se selecciona entre las regiones de ADN definidas por coordenadas Hg19:

(1)	Chr12:52399672-52399922	(18)	Chr3:33260566-33260818
(2)	Chr12:52400821-52401119	(19)	Chr2:56150356-56150606
(4)	Chr8:97506813-97507045	(20)	Chr6:134210545-134210749
(5)	Chr8:97507037-97507257	(21)	Chr6:134210712-134210951
(6)	Chr13:110959094-110959330	(24)	Chr7:94024141-94024345
(10)	Chr5:3594657-3594847	(25)	Chr15:60296522-60296719
(11)	Chr13:95364013-95364178	(26)	Chr15:60297024-60297305
(12)	Chr13:95364515-95364784	(28)	Chr16:86544265-86544584
(13)	Chr4:81186918-81187228	(30)	Chr13:28502100-28502311
(16)	Chr19:57018955-57019135	(31)	Chr13:28502417-28502603
(17)	Chr19:57019294-57019573	(35)	Chr7:96653553-96653732

- 5 6. El método según uno cualquiera de los apartados 1-5 en donde dicha célula neoplásica es un adenoma o un adenocarcinoma.
7. El método según uno cualquiera de los apartados 1-6 en donde dicho nivel de control es un nivel no neoplásico.
8. El método según uno cualquiera de los apartados 1-7 en donde dicha neoplasia es una neoplasia colorrectal.
- 10 9. El método según uno cualquiera de los apartados 1-8 en donde dicha muestra biológica es una muestra fecal, lavado de enema, resección quirúrgica, biopsia de tejido o muestra de sangre.
10. El método según uno cualquiera de los apartados 1-9, en donde dicho nivel de expresión se evalúa mediante el escrutinio de cambios en el ADN genómico.
11. El método según el apartado 10, en donde dichos cambios en el ADN genómico son cambios en la metilación del ADN.
- 15 12. El método según el apartado 11, comprendiendo dicho método evaluar la metilación de uno o más residuos de citosina seleccionados entre:

ES 2 707 341 T3

Chr12:52400748-52409671 (GRASP)

Chr12:52399713	Chr12:52399731	Chr12:52399749	Chr12:52399783
Chr12:52399796	Chr12:52399808	Chr12:52399823	Chr12:52399835
Chr12:52399891			

Chr12:52400847	Chr12:52400850	Chr12:52400859	Chr12:52400866
Chr12:52400869	Chr12:52400873	Chr12:52400881	Chr12:52400886
Chr12:52400893	Chr12:52400895	Chr12:52400899	Chr12:52400902
Chr12:52400907	Chr12:52400913	Chr12:52400919	Chr12:52400932
Chr12:52400938	Chr12:52400958	Chr12:52400962	Chr12:52400971
Chr12:52400973	Chr12:52400976	Chr12:52400998	Chr12:52401008
Chr12:52401010	Chr12:52401012	Chr12:52401016	Chr12:52401019
Chr12:52401025	Chr12:52401041	Chr12:52401044	Chr12:52401053
Chr12:52401060	Chr12:52401064	Chr12:52401092	Chr12:52401118

Chr12:52401438	Chr12:52401448	Chr12:52401460	Chr12:52401465
Chr12:52401474	Chr12:52401477	Chr12:52401479	Chr12:52401483
Chr12:52401504	Chr12:52401514	Chr12:52401523	Chr12:52401540
Chr12:52401553	Chr12:52401576	Chr12:52401588	Chr12:52401595
Chr12:52401599	Chr12:52401604	Chr12:52401606	Chr12:52401634
Chr12:52401640	Chr12:52401644	Chr12:52401659	

Chr8:97505882-97624037 (SDC2)

Chr8:97506843	Chr8:97506845	Chr8:97506861	Chr8:97506876
Chr8:97506902	Chr8:97506909	Chr8:97506911	Chr8:97506913
Chr8:97506924	Chr8:97506932	Chr8:97506934	Chr8:97506940
Chr8:97506977	Chr8:97506993	Chr8:97507005	Chr8:97507008
Chr8:97507014			

Chr8:97507038	Chr8:97507061	Chr8:97507064	Chr8:97507078
Chr8:97507082	Chr8:97507084	Chr8:97507089	Chr8:97507119
Chr8:97507128	Chr8:97507136	Chr8:97507144	Chr8:97507153
Chr8:97507162	Chr8:97507214	Chr8:97507216	

Chr13:110959094-110959330 (COL4A1).

Chr13:97507038	Chr13:97507061	Chr13:97507064	Chr13:97507078
Chr13:97507082	Chr13:97507084	Chr13:97507089	Chr13:97507119
Chr13:97507128	Chr13:97507136	Chr13:97507144	Chr13:97507153
Chr13:97507162	Chr13:97507214	Chr13:97507216	

Chr5:3596168-3601517 (IRX1)

Chr5:3597229	Chr5:3597299	Chr5:3597311	Chr5:3597321
Chr5:3597330	Chr5:3597350	Chr5:3597352	Chr5:3597373
Chr5:3597413	Chr5:3597427	Chr5:3597431	Chr5:3597447
Chr5:3597450	Chr5:3597454	Chr5:3597456	

Chr5:3599998	Chr5:3600019	Chr5:3600037	Chr5:3600050
Chr5:3600058	Chr5:3600061	Chr5:3600070	Chr5:3600074
Chr5:3600076	Chr5:3600079	Chr5:3600089	Chr5:3600091

ES 2 707 341 T3

Chr5:3600104	Chr5:3600116	Chr5:3600121	Chr5:3600124
Chr5:3600131	Chr5:3600143	Chr5:3600149	Chr5:3600169
Chr5:3600173			
Chr5:3600163	Chr5:3600190	Chr5:3600201	Chr5:3600205
Chr5:3600208	Chr5:3600214	Chr5:3600250	Chr5:3600252
Chr5:3600255	Chr5:3600264	Chr5:3600270	Chr5:3600284
Chr5:3600309	Chr5:3600318	Chr5:3600345	
Chr5:3594663	Chr5:3594679	Chr5:3594684	Chr5:3594697
Chr5:3594703	Chr5:3594711	Chr5:3594725	Chr5:3594738
Chr5:3594745	Chr5:3594758	Chr5:3594768	Chr5:3594774
Chr5:3594778	Chr5:3594794	Chr5:3594799	Chr5:3594818
Chr5:3594840			
<i>Chr13:95361879-95364389 (SOX21)</i>			
Chr13:95364016	Chr13:95364019	Chr13:95364042	Chr13:95364050
Chr13:95364054	Chr13:95364061	Chr13:95364064	Chr13:95364074
Chr13:95364080	Chr13:95364082	Chr13:95364106	Chr13:95364119
Chr13:95364123	Chr13:95364125	Chr13:95364128	Chr13:95364141
Chr13:95364163	Chr13:95364171		
Chr13:95364543	Chr13:95364545	Chr13:95364548	Chr13:95364551
Chr13:95364560	Chr13:95364571	Chr13:95364582	Chr13:95364584
Chr13:95364587	Chr13:95364602	Chr13:95364623	Chr13:95364627
Chr13:95364640	Chr13:95364649	Chr13:95364653	Chr13:95364656
Chr13:95364665	Chr13:95364684	Chr13:95364696	Chr13:95364712
Chr13:95364729	Chr13:95364732	Chr13:95364734	Chr13:95364748
Chr13:95364751			
<i>Chr4:81187742-81212171 (FGF5)</i>			
Chr4:81186919	Chr4:81186947	Chr4:81186964	Chr4:81186968
Chr4:81186973	Chr4:81186975	Chr4:81186983	Chr4:81187001
Chr4:81187011	Chr4:81187041	Chr4:81187056	Chr4:81187062
Chr4:81187093	Chr4:81187116	Chr4:81187125	Chr4:81187161
Chr4:81187191	Chr4:81187196	Chr4:81187198	
Chr4:81187367	Chr4:81187389	Chr4:81187458	Chr4:81187467
Chr4:81187495	Chr4:81187498	Chr4:81187504	Chr4:81187512
Chr4:81187514	Chr4:81187530	Chr4:81187539	Chr4:81187547
Chr4:81187549	Chr4:81187551	Chr4:81187554	Chr4:81187556
Chr4:81187575			
Chr4:81187575	Chr4:81187592	Chr4:81187601	Chr4:81187605
Chr4:81187610	Chr4:81187648	Chr4:81187652	Chr4:81187679
Chr4:81187685	Chr4:81187691	Chr4:81187693	Chr4:81187707
Chr4:81187712	Chr4:81187733	Chr4:81187735	Chr4:81187752
Chr4:81187758	Chr4:81187764	Chr4:81187784	

ES 2 707 341 T3

Chr19:57019212-57040269 (ZNF471)

Chr19:57018990	Chr19:57018994	Chr19:57019003	Chr19:57019010
Chr19:57019018	Chr19:57019020	Chr19:57019025	Chr19:57019029
Chr19:57019044	Chr19:57019047	Chr19:57019067	Chr19:57019073
Chr19:57019084	Chr19:57019101	Chr19:57019118	

Chr19:57019315	Chr19:57019321	Chr19:57019346	Chr19:57019351
Chr19:57019355	Chr19:57019361	Chr19:57019364	Chr19:57019366
Chr19:57019371	Chr19:57019373	Chr19:57019385	Chr19:57019387
Chr19:57019405	Chr19:57019428	Chr19:57019433	Chr19:57019435
Chr19:57019437	Chr19:57019443	Chr19:57019451	Chr19:57019456
Chr19:57019463	Chr19:57019465	Chr19:57019470	Chr19:57019483
Chr19:57019487	Chr19:57019492	Chr19:57019502	Chr19:57019505

Chr3:33191537-33260707 (SUSD5)

Chr3:33260601	Chr3:33260621	Chr3:33260631	Chr3:33260640
Chr3:33260651	Chr3:33260665	Chr3:33260676	Chr3:33260694
Chr3:33260698	Chr3:33260711	Chr3:33260715	Chr3:33260732
Chr3:33260742	Chr3:33260748	Chr3:33260755	Chr3:33260760
Chr3:33260769	Chr3:33260776	Chr3:33260778	Chr3:33260780
Chr3:33260788	Chr3:33260806		

Chr2:56093097-56151298 (EFEMP1)

Chr2:56150376	Chr2:56150389	Chr2:56150394	Chr2:56150415
Chr2:56150419	Chr2:56150423	Chr2:56150433	Chr2:56150473
Chr2:56150475	Chr2:56150478	Chr2:56150499	Chr2:56150537
Chr2:56150549	Chr2:56150580	Chr2:56150601	

Chr6:134210259-134216675 (TCF21)

Chr6:134210556	Chr6:134210598	Chr6:134210615	Chr6:134210640
Chr6:134210649	Chr6:134210667	Chr6:134210692	Chr6:134210694
Chr6:134210697	Chr6:134210720	Chr6:134210745	

Chr6:134210720	Chr6:134210745	Chr6:134210776	Chr6:134210781
Chr6:134210784	Chr6:134210790	Chr6:134210792	Chr6:134210794
Chr6:134210800	Chr6:134210806	Chr6:134210812	Chr6:134210868
Chr6:134210894	Chr6:134210906	Chr6:134210919	Chr6:134210946

Chr6:134211050	Chr6:134211061	Chr6:134211076	Chr6:134211081
Chr6:134211103	Chr6:134211110	Chr6:134211121	Chr6:134211125
Chr6:134211131	Chr6:134211153	Chr6:134211155	Chr6:134211162
Chr6:134211179	Chr6:134211182	Chr6:134211184	Chr6:134211208
Chr6:134211210	Chr6:134211212	Chr6:134211218	Chr6:134211220
Chr6:134211227	Chr6:134211233	Chr6:134211241	Chr6:134211245
Chr6:134211247	Chr6:134211270		

Chr7:94023873-94060544 (COL1A2)

Chr7:94024172	Chr7:94024191	Chr7:94024214	Chr7:94024230
Chr7:94024254	Chr7:94024266	Chr7:94024268	Chr7:94024272
Chr7:94024288	Chr7:94024291	Chr7:94024310	

ES 2 707 341 T3

Chr15:60296421-60298142 (FOXB1)

Chr15:60296555	Chr15:60296561	Chr15:60296563	Chr15:60296578
Chr15:60296585	Chr15:60296598	Chr15:60296601	Chr15:60296614
Chr15:60296616	Chr15:60296619	Chr15:60296627	Chr15:60296633
Chr15:60296639	Chr15:60296643	Chr15:60296647	Chr15:60296654
Chr15:60296665	Chr15:60296668	Chr15:60296670	Chr15:60296675
Chr15:60296679	Chr15:60296684	Chr15:60296689	Chr15:60296694

Chr15:60297035	Chr15:60297050	Chr15:60297053	Chr15:60297109
Chr15:60297118	Chr15:60297121	Chr15:60297126	Chr15:60297128
Chr15:60297130	Chr15:60297152	Chr15:60297169	Chr15:60297174
Chr15:60297178	Chr15:60297185	Chr15:60297192	Chr15:60297203
Chr15:60297212	Chr15:60297221	Chr15:60297228	Chr15:60297252
Chr15:60297266	Chr15:60297273	Chr15:60297298	

Chr16:86544133-86548070 (FOXF1)

Chr16:86544571	Chr16:86544587	Chr16:86544590	Chr16:86544593
Chr16:86544597	Chr16:86544599	Chr16:86544601	Chr16:86544608
Chr16:86544624	Chr16:86544652	Chr16:86544658	Chr16:86544675
Chr16:86544685	Chr16:86544699	Chr16:86544703	Chr16:86544706
Chr16:86544714	Chr16:86544720	Chr16:86544735	Chr16:86544745
Chr16:86544763			

Chr16:86544268	Chr16:86544273	Chr16:86544295	Chr16:86544298
Chr16:86544305	Chr16:86544308	Chr16:86544312	Chr16:86544321
Chr16:86544337	Chr16:86544339	Chr16:86544346	Chr16:86544377
Chr16:86544384	Chr16:86544391	Chr16:86544416	Chr16:86544431
Chr16:86544460	Chr16:86544464	Chr16:86544477	Chr16:86544484
Chr16:86544518	Chr16:86544523	Chr16:86544547	Chr16:86544552
Chr16:86544559	Chr16:86544571		

Chr16:86544810	Chr16:86544832	Chr16:86544835	Chr16:86544843
Chr16:86544853	Chr16:86544859	Chr16:86544862	Chr16:86544865
Chr16:86544867	Chr16:86544870	Chr16:86544874	Chr16:86544877
Chr16:86544885	Chr16:86544892	Chr16:86544900	Chr16:86544907
Chr16:86544915	Chr16:86544928	Chr16:86544931	Chr16:86544934
Chr16:86544951	Chr16:86544955	Chr16:86544958	Chr16:86544966
Chr16:86544972	Chr16:86544975	Chr16:86544978	Chr16:86544987
Chr16:86544993	Chr16:86544996	Chr16:86545000	Chr16:86545002
Chr16:86545005	Chr16:86545015	Chr16:86545018	Chr16:86545060
Chr16:86545062	Chr16:86545078	Chr16:86545092	

Chr13:28494168-28500451 (PDX1)

Chr13:28502109	Chr13:28502153	Chr13:28502161	Chr13:28502177
Chr13:28502179	Chr13:28502191	Chr13:28502198	Chr13:28502205
Chr13:28502207	Chr13:28502210	Chr13:28502245	Chr13:28502309

Chr13:28502442	Chr13:28502449	Chr13:28502461	Chr13:28502464
----------------	----------------	----------------	----------------

ES 2 707 341 T3

Chr13:28502475	Chr13:28502507	Chr13:28502512	Chr13:28502538
Chr13:28502544	Chr13:28502549	Chr13:28502559	Chr13:28502564
Chr13:28502585			
Chr13:28503045	Chr13:28503049	Chr13:28503081	Chr13:28503099
Chr13:28503114	Chr13:28503127	Chr13:28503138	Chr13:28503147
Chr13:28503155	Chr13:28503157	Chr13:28503179	
<i>Chr7:96649702-96654143 (DLX5)</i>			
Chr7:96650062	Chr7:96650072	Chr7:96650078	Chr7:96650096
Chr7:96650099	Chr7:96650102		
Chr7:96651485	Chr7:96651488	Chr7:96651518	Chr7:96651523
Chr7:96651532	Chr7:96651535	Chr7:96651537	Chr7:96651542
Chr7:96651550	Chr7:96651586		
Chr7:96653596	Chr7:96653605	Chr7:96653607	Chr7:96653617
Chr7:96653620	Chr7:96653623	Chr7:96653644	Chr7:96653656
Chr7:96653683	Chr7:96653686	Chr7:96653692	Chr7:96653698
Chr7:96653701			
<i>Chr21:28208606-28217728 (ADAMTS1)</i>			
Chr21:28217973	Chr21:28218002	Chr21:28218015	Chr21:28218018
Chr21:28218047	Chr21:28218051	Chr21:28218057	Chr21:28218072
Chr21:28218074	Chr21:28218084	Chr21:28218105	
Chr21:28218514	Chr21:28218516	Chr21:28218550	Chr21:28218568
Chr21:28218579	Chr21:28218586	Chr21:28218596	Chr21:28218635
Chr21:28218638	Chr21:28218646	Chr21:28218671	Chr21:28218684
Chr21:28218688	Chr21:28218704	Chr21:28218729	Chr21:28218741
Chr21:28218893	Chr21:28218906	Chr21:28218914	Chr21:28218916
Chr21:28218928	Chr21:28218934	Chr21:28218938	Chr21:28218949
Chr21:28218953	Chr21:28218959	Chr21:28218974	Chr21:28218976
Chr21:28218978	Chr21:28218984	Chr21:28218986	Chr21:28218996
Chr21:28219008	Chr21:28219016		
<i>Chr13:110959631-111165373 (COL4A2)</i>			
Chr13:110960813	Chr13:110960827	Chr13:110960849	Chr13:110960875
Chr13:110960925	Chr13:110960930	Chr13:110960938	Chr13:110960978
Chr13:110961001	Chr13:110961003	Chr13:110961025	Chr13:110961045
Chr13:110961049	Chr13:110961069	Chr13:110961072	Chr13:110961088
Chr13:110961091	Chr13:110961095	Chr13:110961110	Chr13:110961116
Chr13:110961131	Chr13:110960786		
Chr13:110961358	Chr13:110961386	Chr13:110961404	Chr13:110961406
Chr13:110961445	Chr13:110961579	Chr13:110961594	Chr13:110961606
Chr13:110961631			

ES 2 707 341 T3

Chr13:110959935	Chr13:110959965	Chr13:110959968	Chr13:110959974
Chr13:110959979	Chr13:110959981	Chr13:110959986	Chr13:110959988
Chr13:110959997	Chr13:110959999	Chr13:110960004	Chr13:110960006
Chr13:110960011	Chr13:110960027	Chr13:110960035	Chr13:110960046
Chr13:110960051	Chr13:110960071	Chr13:110960099	Chr13:110960108
Chr13:110960115	Chr13:110960156	Chr13:110960180	
<i>Chr5:83238126-83680611 (EDIL3)</i>			
Chr5:83679825	Chr5:83679827	Chr5:83679836	Chr5:83679843
Chr5:83679846	Chr5:83679860	Chr5:83679864	Chr5:83679883
Chr5:83679894	Chr5:83679900	Chr5:83679906	Chr5:83679910
Chr5:83679937	Chr5:83679953	Chr5:83679957	Chr5:83679961
Chr5:83679976	Chr5:83679982	Chr5:83679987	Chr5:83680003
Chr5:83680007	Chr5:83680011	Chr5:83680026	Chr5:83680032
Chr5:83680086	Chr5:83680090	Chr5:83680103	Chr5:83680106
Chr5:83680122	Chr5:83680126		
Chr5:83679546	Chr5:83679568	Chr5:83679571	Chr5:83679585
Chr5:83679602	Chr5:83679617	Chr5:83679630	Chr5:83679640
Chr5:83679667	Chr5:83679675	Chr5:83679689	Chr5:83679693
Chr5:83679699	Chr5:83679701	Chr5:83679733	
Chr5:83679973	Chr5:83679989	Chr5:83679992	Chr5:83680001
Chr5:83680003	Chr5:83680006	Chr5:83680012	Chr5:83680015
Chr5:83680019	Chr5:83680033	Chr5:83680036	Chr5:83680045
Chr5:83680051	Chr5:83680061	Chr5:83680063	Chr5:83680066
Chr5:83680108	Chr5:83680115	Chr5:83680118	Chr5:83680132
Chr5:83680147	Chr5:83680159	Chr5:83680174	Chr5:83680181
Chr5:83680185	Chr5:83680198	Chr5:83680205	Chr5:83680209
Chr5:83680217	Chr5:83680232	Chr5:83680235	Chr5:83680237
Chr5:83680253			
Chr5:83680108	Chr5:83680115	Chr5:83680118	Chr5:83680132
Chr5:83680147	Chr5:83680159	Chr5:83680174	Chr5:83680181
Chr5:83680185	Chr5:83680198	Chr5:83680205	Chr5:83680209
Chr5:83680217	Chr5:83680232	Chr5:83680235	Chr5:83680237
Chr5:83680253	Chr5:83680264	Chr5:83680284	Chr5:83680310
Chr5:83680326	Chr5:83680355		
Chr5:83680401	Chr5:83680406	Chr5:83680409	Chr5:83680411
Chr5:83680413	Chr5:83680430	Chr5:83680438	Chr5:83680441
Chr5:83680444	Chr5:83680458	Chr5:83680463	Chr5:83680474
Chr5:83680483	Chr5:83680485	Chr5:83680488	Chr5:83680492
Chr5:83680497	Chr5:83680499	Chr5:83680507	Chr5:83680509
Chr5:83680513	Chr5:83680518	Chr5:83680529	Chr5:83680531
Chr5:83680548	Chr5:83680559	Chr5:83680564	Chr5:83680568
Chr5:83680572	Chr5:83680579	Chr5:83680589	Chr5:83680591

ES 2 707 341 T3

Chr5:83680593	Chr5:83680596	Chr5:83680602	
<i>Chr15:48700503-48937985 (FBN1)</i>			
Chr15:48938149	Chr15:48938163	Chr15:48938172	Chr15:48938181
Chr15:48938183	Chr15:48938218	Chr15:48938236	Chr15:48938238
Chr15:48938254	Chr15:48938267	Chr15:48938273	Chr15:48938280
Chr15:48938291	Chr15:48938349		
<i>Chr1:47901689-47906363 (FOXD2)</i>			
Chr1:47899102	Chr1:47899126	Chr1:47899129	Chr1:47899143
Chr1:47899152	Chr1:47899168	Chr1:47899184	Chr1:47899205
Chr1:47899212	Chr1:47899230	Chr1:47899232	Chr1:47899253
Chr1:47899286	Chr1:47899327		
Chr1:47909988	Chr1:47909995	Chr1:47910005	Chr1:47910036
Chr1:47910051	Chr1:47910056	Chr1:47910062	Chr1:47910074
Chr1:47910103	Chr1:47910122	Chr1:47910137	Chr1:47910142
Chr1:47910144	Chr1:47910146		
<i>Chr2:66662532-66799891 (MEIS1)</i>			
Chr2:66662043	Chr2:66662047	Chr2:66662049	Chr2:66662063
Chr2:66662073	Chr2:66662107	Chr2:66662111	Chr2:66662124
Chr2:66662145	Chr2:66662156	Chr2:66662161	Chr2:66662163
Chr2:66662178	Chr2:66662218		
Chr2:66662178	Chr2:66662218	Chr2:66662220	Chr2:66662246
Chr2:66662265	Chr2:66662280	Chr2:66662306	Chr2:66662310
Chr2:66662323	Chr2:66662333	Chr2:66662337	
<i>Chr16:55513081-55540586 (MMP2)</i>			
Chr16:55512695	Chr16:55512711	Chr16:55512732	Chr16:55512750
Chr16:55512753	Chr16:55512793		
Chr16:55513961	Chr16:55513997	Chr16:55514025	Chr16:55514059
Chr16:55514061	Chr16:55514092	Chr16:55514120	Chr16:55514131
Chr16:55514158	Chr16:55514205		
<i>Chr7:24323807-24331484 (NPY)</i>			
Chr7:24323767	Chr7:24323792	Chr7:24323794	Chr7:24323799
Chr7:24323817	Chr7:24323834	Chr7:24323840	Chr7:24323844
Chr7:24323848	Chr7:24323866	Chr7:24323876	Chr7:24323880
Chr7:24323882	Chr7:24323884	Chr7:24323894	Chr7:24323905
Chr7:24323910	Chr7:24323930	Chr7:24323934	
Chr7:24324180	Chr7:24324186	Chr7:24324206	Chr7:24324217
Chr7:24324222	Chr7:24324225	Chr7:24324244	Chr7:24324249
Chr7:24324251	Chr7:24324268	Chr7:24324274	Chr7:24324280
Chr7:24324311	Chr7:24324313		
Chr7:24324549	Chr7:24324570	Chr7:24324592	Chr7:24324595
Chr7:24324597	Chr7:24324599	Chr7:24324621	Chr7:24324625

Chr7:24324633	Chr7:24324635	Chr7:24324668	Chr7:24324672
Chr7:24324676	Chr7:24324679	Chr7:24324683	Chr7:24324690
<i>Chr19:38741877-38747172 (PPP1R14A)</i>			
Chr19:38747280	Chr19:38747296	Chr19:38747300	Chr19:38747313
Chr19:38747319	Chr19:38747322	Chr19:38747328	Chr19:38747334
Chr19:38747355	Chr19:38747361	Chr19:38747371	Chr19:38747382
Chr19:38747389	Chr19:38747410		
Chr19:38746654	Chr19:38746680	Chr19:38746690	Chr19:38746701
Chr19:38746715	Chr19:38746726	Chr19:38746728	Chr19:38746732
Chr19:38746749	Chr19:38746759	Chr19:38746770	Chr19:38746784
Chr19:38746786	Chr19:38746804	Chr19:38746808	Chr19:38746811
Chr19:38746826	Chr19:38746834	Chr19:38746837	Chr19:38746849
Chr19:38746852	Chr19:38746865	Chr19:38746871	Chr19:38746873
Chr19:38746875	Chr19:38746877	Chr19:38746882	Chr19:38746898

o una citosina correspondiente en la posición n + 1 en la hebra de ADN opuesta, en una muestra biológica de dicho individuo en donde un nivel más alto de metilación de uno o más de dichos residuos con respecto a el nivel de metilación de un residuo correspondiente en una muestra de control es indicativo de una neoplasia de intestino grueso o una predisposición a la aparición de un estado neoplásico.

5

13. El método de acuerdo con el apartado 12, en donde dichos uno o más residuos de citosina se seleccionan entre:

Chr12:52400748-52409671 (GRASP)

Chr12:52399713	Chr12:52399731	Chr12:52399749	Chr12:52399783
Chr12:52399796	Chr12:52399808	Chr12:52399823	Chr12:52399835
Chr12:52399891			

Chr12:52400847	Chr12:52400850	Chr12:52400859	Chr12:52400866
Chr12:52400869	Chr12:52400873	Chr12:52400881	Chr12:52400886
Chr12:52400893	Chr12:52400895	Chr12:52400899	Chr12:52400902
Chr12:52400907	Chr12:52400913	Chr12:52400919	Chr12:52400932
Chr12:52400938	Chr12:52400958	Chr12:52400962	Chr12:52400971
Chr12:52400973	Chr12:52400976	Chr12:52400998	Chr12:52401008
Chr12:52401010	Chr12:52401012	Chr12:52401016	Chr12:52401019
Chr12:52401025	Chr12:52401041	Chr12:52401044	Chr12:52401053
Chr12:52401060	Chr12:52401064	Chr12:52401092	Chr12:52401118

Chr8:97505882-97624037 (SDC2)

Chr8:97506843	Chr8:97506845	Chr8:97506861	Chr8:97506876
Chr8:97506902	Chr8:97506909	Chr8:97506911	Chr8:97506913
Chr8:97506924	Chr8:97506932	Chr8:97506934	Chr8:97506940
Chr8:97506977	Chr8:97506993	Chr8:97507005	Chr8:97507008
Chr8:97507014			

Chr8:97507038	Chr8:97507061	Chr8:97507064	Chr8:97507078
Chr8:97507082	Chr8:97507084	Chr8:97507089	Chr8:97507119
Chr8:97507128	Chr8:97507136	Chr8:97507144	Chr8:97507153
Chr8:97507162	Chr8:97507214	Chr8:97507216	

ES 2 707 341 T3

Chr13:110959094-110959330 (COL4A1).

Chr13:97507038	Chr13:97507061	Chr13:97507064	Chr13:97507078
Chr13:97507082	Chr13:97507084	Chr13:97507089	Chr13:97507119
Chr13:97507128	Chr13:97507136	Chr13:97507144	Chr13:97507153
Chr13:97507162	Chr13:97507214	Chr13:97507216	
Chr5:3594663	Chr5:3594679	Chr5:3594684	Chr5:3594697
Chr5:3594703	Chr5:3594711	Chr5:3594725	Chr5:3594738
Chr5:3594745	Chr5:3594758	Chr5:3594768	Chr5:3594774
Chr5:3594778	Chr5:3594794	Chr5:3594799	Chr5:3594818
Chr5:3594840			

Chr13:95361879-95364389 (SOX21)

Chr13:95364016	Chr13:95364019	Chr13:95364042	Chr13:95364050
Chr13:95364054	Chr13:95364061	Chr13:95364064	Chr13:95364074
Chr13:95364080	Chr13:95364082	Chr13:95364106	Chr13:95364119
Chr13:95364123	Chr13:95364125	Chr13:95364128	Chr13:95364141
Chr13:95364163	Chr13:95364171		

Chr13:95364543	Chr13:95364545	Chr13:95364548	Chr13:95364551
Chr13:95364560	Chr13:95364571	Chr13:95364582	Chr13:95364584
Chr13:95364587	Chr13:95364602	Chr13:95364623	Chr13:95364627
Chr13:95364640	Chr13:95364649	Chr13:95364653	Chr13:95364656
Chr13:95364665	Chr13:95364684	Chr13:95364696	Chr13:95364712
Chr13:95364729	Chr13:95364732	Chr13:95364734	Chr13:95364748
Chr13:95364751			

Chr4:81187742-81212171 (FGF5)

Chr4:81186919	Chr4:81186947	Chr4:81186964	Chr4:81186968
Chr4:81186973	Chr4:81186975	Chr4:81186983	Chr4:81187001
Chr4:81187011	Chr4:81187041	Chr4:81187056	Chr4:81187062
Chr4:81187093	Chr4:81187116	Chr4:81187125	Chr4:81187161
Chr4:81187191	Chr4:81187196	Chr4:81187198	

Chr19:57019212-57040269 (ZNF471)

Chr19:57018990	Chr19:57018994	Chr19:57019003	Chr19:57019010
Chr19:57019018	Chr19:57019020	Chr19:57019025	Chr19:57019029
Chr19:57019044	Chr19:57019047	Chr19:57019067	Chr19:57019073
Chr19:57019084	Chr19:57019101	Chr19:57019118	

Chr19:57019315	Chr19:57019321	Chr19:57019346	Chr19:57019351
Chr19:57019355	Chr19:57019361	Chr19:57019364	Chr19:57019366
Chr19:57019371	Chr19:57019373	Chr19:57019385	Chr19:57019387
Chr19:57019405	Chr19:57019428	Chr19:57019433	Chr19:57019435
Chr19:57019437	Chr19:57019443	Chr19:57019451	Chr19:57019456
Chr19:57019463	Chr19:57019465	Chr19:57019470	Chr19:57019483
Chr19:57019487	Chr19:57019492	Chr19:57019502	Chr19:57019505

Chr3:33191537-33260707 (SUSD5)

Chr3:33260601	Chr3:33260621	Chr3:33260631	Chr3:33260640
Chr3:33260651	Chr3:33260665	Chr3:33260676	Chr3:33260694

ES 2 707 341 T3

Chr3:33260698	Chr3:33260711	Chr3:33260715	Chr3:33260732
Chr3:33260742	Chr3:33260748	Chr3:33260755	Chr3:33260760
Chr3:33260769	Chr3:33260776	Chr3:33260778	Chr3:33260780
Chr3:33260788	Chr3:33260806		
<i>Chr2:56093097-56151298 (EFEMP1)</i>			
Chr2:56150376	Chr2:56150389	Chr2:56150394	Chr2:56150415
Chr2:56150419	Chr2:56150423	Chr2:56150433	Chr2:56150473
Chr2:56150475	Chr2:56150478	Chr2:56150499	Chr2:56150537
Chr2:56150549	Chr2:56150580	Chr2:56150601	
<i>Chr6:134210259-134216675 (TCF21)</i>			
Chr6:134210556	Chr6:134210598	Chr6:134210615	Chr6:134210640
Chr6:134210649	Chr6:134210667	Chr6:134210692	Chr6:134210694
Chr6:134210697	Chr6:134210720	Chr6:134210745	
Chr6:134210720	Chr6:134210745	Chr6:134210776	Chr6:134210781
Chr6:134210784	Chr6:134210790	Chr6:134210792	Chr6:134210794
Chr6:134210800	Chr6:134210806	Chr6:134210812	Chr6:134210868
Chr6:134210894	Chr6:134210906	Chr6:134210919	Chr6:134210946
<i>Chr7:94023873-94060544 (COL1A2)</i>			
Chr7:94024172	Chr7:94024191	Chr7:94024214	Chr7:94024230
Chr7:94024254	Chr7:94024266	Chr7:94024268	Chr7:94024272
Chr7:94024288	Chr7:94024291	Chr7:94024310	
<i>Chr15:60296421-60298142 (FOXB1)</i>			
Chr15:60296555	Chr15:60296561	Chr15:60296563	Chr15:60296578
Chr15:60296585	Chr15:60296598	Chr15:60296601	Chr15:60296614
Chr15:60296616	Chr15:60296619	Chr15:60296627	Chr15:60296633
Chr15:60296639	Chr15:60296643	Chr15:60296647	Chr15:60296654
Chr15:60296665	Chr15:60296668	Chr15:60296670	Chr15:60296675
Chr15:60296679	Chr15:60296684	Chr15:60296689	Chr15:60296694
Chr15:60297035	Chr15:60297050	Chr15:60297053	Chr15:60297109
Chr15:60297118	Chr15:60297121	Chr15:60297126	Chr15:60297128
Chr15:60297130	Chr15:60297152	Chr15:60297169	Chr15:60297174
Chr15:60297178	Chr15:60297185	Chr15:60297192	Chr15:60297203
Chr15:60297212	Chr15:60297221	Chr15:60297228	Chr15:60297252
Chr15:60297266	Chr15:60297273	Chr15:60297298	
<i>Chr16:86544133-86548070 (FOXF1)</i>			
Chr16:86544268	Chr16:86544273	Chr16:86544295	Chr16:86544298
Chr16:86544305	Chr16:86544308	Chr16:86544312	Chr16:86544321
Chr16:86544337	Chr16:86544339	Chr16:86544346	Chr16:86544377
Chr16:86544384	Chr16:86544391	Chr16:86544416	Chr16:86544431
Chr16:86544460	Chr16:86544464	Chr16:86544477	Chr16:86544484
Chr16:86544518	Chr16:86544523	Chr16:86544547	Chr16:86544552
Chr16:86544559	Chr16:86544571		
<i>Chr13:28494168-28500451 (PDX1)</i>			
Chr13:28502109	Chr13:28502153	Chr13:28502161	Chr13:28502177

Chr13:28502179	Chr13:28502191	Chr13:28502198	Chr13:28502205
Chr13:28502207	Chr13:28502210	Chr13:28502245	Chr13:28502309
Chr13:28502442	Chr13:28502449	Chr13:28502461	Chr13:28502464
Chr13:28502475	Chr13:28502507	Chr13:28502512	Chr13:28502538
Chr13:28502544	Chr13:28502549	Chr13:28502559	Chr13:28502564
Chr13:28502585			
<i>Chr7:96649702-96654143 (DLX5)</i>			
Chr7:96653596	Chr7:96653605	Chr7:96653607	Chr7:96653617
Chr7:96653620	Chr7:96653623	Chr7:96653644	Chr7:96653656
Chr7:96653683	Chr7:96653686	Chr7:96653692	Chr7:96653698
Chr7:96653701			

14. El método según uno cualquiera de los apartados 1 a 13, en donde dicho nivel de expresión se evalúa mediante el escrutinio de cambios en la proteína cromatina con la que está asociado dicho gen.

5 15. Un método de escrutinio de la aparición o la predisposición a la aparición o el seguimiento de una neoplasia de intestino grueso en un individuo, comprendiendo dicho método evaluar el nivel de expresión de una región de ADN seleccionada entre:

(i) la región definida por una o más cualesquiera de las coordenadas Hg19 y 2kb aguas arriba del sitio de inicio de la transcripción:

(1) chr12:52400748..52409671	(34) chr10:101292690..101296281
(2) chr5:3596168..3601517	(35) chr4:4190530..4228621
(3) chr13:95361876..95364389	(36) chr12:54943404..54973023
(4) chr4:81187742..81212171	(37) chr5:176047210..176057557
(5) chr19:57019212..57040270	(38) chr12:22346325..22487648
(6) chr3:33191537..33260707	(39) chr19:56894648..56904889
(7) chr15:60296421..60298142	(40) chr20:21491648..21494664
(8) chr13:28494168..28500451	(41) chr1:50883225..50889141
(9) chr7:96649702..96654143,	(42) chr7:27180996..27183287
(10) chr8:140,811,770-141,537,860	(43) chr11:2016406..2019065
(11) chr5:2746279..2751769	(44) chr14:57267425..57277184
(12) chr18:55102917..55158530	(45) chr4:126237567..126414087
(13) chr20:37353101..37358016	(46) chr8:23559964..23563922
(14) chr8:2792875..4852328	(47) chr10:131633547..131762091
(15) chr16:66613351..66622178	(48) chr4:62362839..62938168
(16) chr5:37815753..37839782	(49) chr1:47901689..47906363
(17) chr1:63788730..63790797	(50) chr17:77768176..77770890
(18) chr15:37156644..37178734	(51) chr17:93598762..93604831
(19) chr7:27139973..27142394	(52) chr1:33789224..33841194
(20) chr20:21686297..21696620	(53) chr9:124,004,679-124,030,840
(21) chr16:51169886..51185183	(54) chr4:158141736..158287227
(22) chr12:85253267..85306606	(55) chr12:9445136..9462559
(23) chr8:6357172..6420784	(56) chr12:24964278..25102308
(24) chr14:85996488..86094270	(57) chrX:21542357..21690352
(25) chr2:182541194..182545381	(58) chr20:52769988..52790516
(26) chr7:30951468..30965131	(59) chr3:172162951..172166203

- | | |
|---------------------------------|--------------------------------|
| (27) chr8:131792547..132052835 | (60) chr13:28366780..28368089 |
| (28) chr3:128749292..128759583 | (61) chr7:50344378..50472799 |
| (29) chr10:101088856..101154087 | (62) chr7:149412148..149431664 |
| (30) chr7:27282164..27286192 | (63) chr7:24323809..24331477 |
| (31) chr10:129535538..129539450 | (64) chr4:30722037..31148421 |
| (32) chr19:49316274..49339934 | (65) chr10:47083534..47088320 |
| (33) chr6:391752..411443 | |

(ii) la región del gen, que incluye 2kb aguas arriba de uno o más cualesquiera de:

- | | | | |
|----------------|-----------------|--------------|--------------|
| (1) GRASP | (18) ANGPT2 | (35) NKX2-6 | (52) HOXA5 |
| (2) IRX1 | (19) LHX6 | (36) PAX1 | (53) GDNF |
| (3) SOX21 | (20) NEUROD1 | (37) FOXD2 | (54) FAT4 |
| (4) FGF5 | (21) AC149644.1 | (38) SLC6A15 | (55) HOXA2 |
| (5) ZNF471 | (22) CCDC48 | (39) PHC2 | (56) LPHN3 |
| (6) SUSD5 | (23) EVX1 | (40) FLRT2 | (57) ADCYAP1 |
| (7) FOXB1 | (24)GHSR | (41) GATA2 | (58) GRIA2 |
| (8) PDX1 | (25) HSD17B14 | (42) ADCY8 | (59) AQP1 |
| (9) DLX5 | (26) KRBA1 | (43) CNNM1 | (60) BCAT1 |
| (10) ONECUT2 | (27) OTOP1 | (44) IKZF1 | (61) CYP24A1 |
| (11) DMRTA2 | (28) PPYR1 | (45) NKX2-3 | (62) FOXI2 |
| (12) CMTM2 | (29) SRMS | (46) PCDH7 | (63) GSX1 |
| (13) OTX2 | (30) ZNF582 | (47) SNCB | (64) IRF4 |
| (14) LOC145845 | (31) IRX2 | (48) ST8SIA1 | (65) NPY |
| (15) EBF3 | (32) CSMD1 | (49) TRAPPC9 | (66) PDE1B |
| (16) SALL1 | (33) MIR675,H19 | (50) NKX2-2 | |
| (17) CBX8 | (34) FOXD3 | (51) SLC32A1 | |

5

en una muestra biológica de dicho individuo en donde un nivel de expresión más bajo de las regiones de ADN del grupo (i) y/o (ii) con respecto a los niveles de control es indicativo de una neoplasia de intestino grueso o una predisposición a la aparición de un estado neoplásico.

16. El método según el apartado 15, en donde dichos uno o más genes o transcritos se seleccionan entre:

(i) la región definida por una o más cualesquiera de las coordenadas Hg19 y 2kb aguas arriba del sitio de inicio de la transcripción:

- | | |
|------------------------------|------------------------------|
| (1) chr12:52400748..52409671 | (6) chr3:33191537..33260707 |
| (2) chr5:3596168..3601517 | (7) chr15:60296421..60298142 |
| (3) chr13:95361876..95364389 | (8) chr13:28494168..28500451 |
| (4) chr4:81187742..81212171 | (9) chr7:96649702..96654143, |
| (5) chr19:57019212..57040270 | |

10

(ii) la región del gen, que incluye 2kb aguas de uno o más cualesquiera de:

- | | | | |
|-----------|------------|-----------|----------|
| (1) GRASP | (4) FGF5 | (6) SUSD5 | (8) PDX1 |
| (2) IRX1 | (5) ZNF471 | (7) FOXB1 | (9) DLX5 |
| (3) SOX21 | | | |

17. El método según uno cualquiera de los apartados 15 o 16, en donde dicho nivel de expresión es la expresión de

ARNm o la expresión de proteínas.

18. El método según uno cualquiera de los apartados 1-17, en donde dicho individuo es un ser humano.

19. Una matriz molecular, cuya matriz comprende una pluralidad de:

- 5 (i) moléculas de ácido nucleico que comprenden una secuencia de nucleótidos correspondiente a una o más cualesquiera de las regiones de ADN enumeradas en uno cualquiera de los apartados 1-5 o una secuencia que exhibe al menos 80% de identidad con la misma o un derivado, fragmento, variante u homólogo funcionales de dicha molécula de ácido nucleico; o
- 10 (ii) moléculas de ácido nucleico que comprenden una secuencia de nucleótidos capaz de hibridar con una o más cualesquiera de las secuencias de (i) en condiciones de rigurosidad media o un derivado, fragmento, variante u homólogo funcionales de dicha molécula de ácido nucleico; o
- (iii) sondas de ácido nucleico u oligonucleótidos que comprenden una secuencia de nucleótidos capaz de hibridar con una o más de las secuencias de (i) en condiciones de rigurosidad media o un derivado, fragmento, variante u homólogo funcionales de dicha molécula de ácido nucleico; o
- 15 (iv) sondas capaces de unirse a una o más cualesquiera de las proteínas codificadas por las moléculas de ácido nucleico de (i) o un derivado, fragmento o homólogo de las mismas

en donde el nivel de expresión de dichos genes marcadores de (i) o proteínas de (iv) es indicativo del estado neoplásico de una célula o subpoblación celular obtenidas del intestino grueso.

Lista de secuencias

5 <110> CLINICAL GENOMICS PTY. LTD.
COMMONWEALTH SCIENTIFIC AND INDUSTRIAL RESEARCH
ORGANISATION
ROSS, Jason
DREW, Horace
BUCKLEY, Michael
10 MOLLOY, Peter
MITCHELL, Susan
DUESING, Konsta
BROWN, Glenn

15 <120> Método de diagnóstico

<130> 35014615/TDO

<150> 2010904116

<151> 2010-09-13

20 <160> 82

<170> PatentIn versión 3.5

25 <210> 1
<211> 21
<212> ADN
<213> Artificial

30 <220>
<223> conector CG superior

<400> 1
35 cgcgatatcac cgactgccct t 21

<210> 2
<211> 17
<212> ADN
40 <213> Artificial

<220>
<223> conector CG inferior

45 <400> 2
gggcagtcgg tgatacg 17

50 <210> 3
<211> 21
<212> ADN
<213> Artificial

55 <220>
<223> conector CA

<400> 3
60 cagcaatcac cgactgccct t 21

<210> 4
<211> 17
<212> ADN
65 <213> Artificial

<220>

	<223> conector CA	
5	<400> 4 gggcagtcgg tgattgc	17
10	<210> 5 <211> 11 <212> ADN <213> Artificial	
15	<220> <223> competidor CG <400> 5 acagatcgt a	11
20	<210> 6 <211> 12 <212> ADN <213> Artificial	
25	<220> <223> competidor CG	
30	<400> 6 cgtacgactc tg	12
35	<210> 7 <211> 11 <212> ADN <213> Artificial <220> <223> competidor CA	
40	<400> 7 agtgatcagc a	11
45	<210> 8 <211> 12 <212> ADN <213> Artificial <220> <223> competidor CA	
50	<400> 8 catgctgatc ac	12
55	<210> 9 <211> 29 <212> ADN <213> Artificial	
60	<220> <223> cebador P2-N6	
65	<220> <221> característica miscelánea <222> (24)..(29)	

	<223> n es a, c, g, o t		
5	<400> 9 ctgccccggg ttctcattc tctnnnnn	29	
10	<210> 10 <211> 21 <212> ADN <213> Artificial		
15	<220> <223> cebador P2-largo <400> 10 ctgccccggg ttctcattc t	21	
20	<210> 11 <211> 24 <212> ADN <213> Artificial		
25	<220> <223> conector SolP2-AB <400> 11 cctacccac attctcatt ctct	24	
30	<210> 12 <211> 25 <212> ADN <213> Artificial		
35	<220> <223> conector SolP2-BP <400> 12 ttgatgggg tgtaaggagt aagag	25	
45	<210> 13 <211> 41 <212> ADN <213> Artificial		
50	<220> <223> conector SolP1 AM <400> 13 mmamtamgmm tnmgmtttmm tmtmtatggg magtmggtga t	41	
55	<210> 14 <211> 44 <212> ADN <213> Artificial		
60	<220> <223> conector SolP1 BC <400> 14 cggatgatgag gaggcgaaag gagagatacc cgtagccac taat	44	
65			

ES 2 707 341 T3

	<210> 15	
	<211> 251	
	<212> ADN	
	<213> humano	
5	<400> 15	
	gatgggtgtt gggacatgga gtccccagcc tgtgctgctg acgccctgtg gtggctagcc	60
	gctctttaga caccagacgc tgccttcac ttctctctt cacttctat tcgggcacca	120
10	ctgacgacag agacttcggc tgggccattc ccgcctctcc taccgcctgg cagccatggt	180
	aacagcctgg gggatgttcc ctaagatggg gtcagagaac ggctgagcat ggccatcccc	240
15	ccagccctga a	251
	<210> 16	
	<211> 299	
20	<212> ADN	
	<213> humano	
	<400> 16	
25	caggaagctg cagcagaagg aggaggcggc ggccaccccg gaccccgccg cccggactcc	60
	cgactcgga gtcgcgccc cgcctccgt cccgaccccg ggacccctg ccgcagccgc	120
	caccctggg cccccagcg acgagctgta cgcggcgctg gaggactatc accctgccga	180
30	gctgtaccgc gcgctcgcc tgcgggggg caccctgcc cgcgaaagg tgcgtcccc	240
	gcccgccttc aggatctgt cagccctct ccgactcct acagggcctg ctgactccg	299
35	<210> 17	
	<211> 258	
	<212> ADN	
	<213> humano	
40	<400> 17	
	gacagagaca gcccaggca agtgaaggt ccgagagccc ccggtgggag aagcggggcg	60
	gtggctgcgc cgcgtgcgt ctcactctga ggaagtgcgt ggggagccgc tgactccgga	120
45	tagcacaccc ttccgagggg actccccgat ttctgggctg ggggcctgcc gcctggcccc	180
	acgtctgacg tacggggcgc gagggccact gtcctctgga ctctgtcgg aaccggacgc	240
50	agtgggaggg gtcgcagg	258
	<210> 18	
	<211> 233	
55	<212> ADN	
	<213> humano	
	<400> 18	
	aactgcatg cagtcaaaca ggaaagctg gcggggggg atggtgtgc gaggaaggga	60
60	ccccgaagt tccaggtcat ccctggtctc gaggagcgc cgagtgag ccgttcctc	120
	gcggggccga cccaggctcc cccctctgc cacccttcc cctccgtct tcccagacca	180
65	cgcagcaaga cccgccgagg gcgaagaagt tgggagtgac ttcaggggcc tct	233

ES 2 707 341 T3

	<210> 19	
	<211> 221	
	<212> ADN	
	<213> humano	
5		
	<400> 19	
	ccgcaggact gggatccag tggccggcgt cccagcattt tcggacgcgt tccgtgcctc	60
	ccccagtatc cccttgaggg atcgctact gcgattccac gtagtgtcgg ttacctgcc	120
10	ctagccgcag ggagcatcaa acaaagaac tttgcaaac tttctctct ggacactcgc	180
	gggtctctta aatctggccc ccatctcccc agaactgca t	221
15		
	<210> 20	
	<211> 237	
	<212> ADN	
	<213> humano	
20		
	<400> 20	
	aaaggaggct cgtccacca atgcgcgatc gtagcctaca gggaccccca acgaaccccg	60
	gccagagaa tgcacctggc cgtgccacgc gcgaccccg aggggcaggc ggacgggtcc	120
25	aggcgaggac aaaggggct ctcggggcgc ccaagctcgg ggcgggacgc cgggagcgga	180
	gctggccggg aactcacctt cgcagcggcc cggctgtgct cctcgtggag cagaagg	237
30		
	<210> 21	
	<211> 254	
	<212> ADN	
	<213> humano	
35		
	<400> 21	
	tgcgttacat aatggaggat taaagaaaac agtgtccctt ggcttaaac aaatggtgtc	60
	ctcttagtct cccgtcccag tggcggttag atgcggggc aggcggctgc acacttaatt	120
40	ctccgcgggg gcattggcct gtctgccgtt ccaaatac catttcctt ggtctgactg	180
	caaggtcggg gcttaactt cggacggctg gtgaattgtg cggcggggcgc ggggccctgg	240
45	gaggcagccc cctc	254
	<210> 22	
	<211> 186	
	<212> ADN	
	<213> humano	
50		
	<400> 22	
	gaacttgccg atgtggcagg tgtacagtcc gtggctaggc aggaaggcgg ggtgttgag	60
55	cggcgccccg gcggagggcc cgtgcgcgcc ggggtggccc gcgggtggtg gtggcgaagc	120
	cttgggcgca ccgtcggggc tcgtggctgt ctccgccagc gaccagatct tgggcttgcc	180
60	gtgcgg	186
	<210> 23	
	<211> 193	
	<212> ADN	
	<213> humano	
65		

ES 2 707 341 T3

	<400> 23 gaccgaggcc ttgtctccat tgagtgtccc cggggcaata gcgaccggcg gctgcggtgg	60
5	tggagggtgca ggaagggtgag ggccatgggg cgcggcgtgg ggagcgccaa cgcccaggaa	120
	ggagcgcatg ttgagcaggg agccctgtgc gaggaatgcg ctgttggtcc agttggagaa	180
10	cttgccgatg tgg	193
	<210> 24 <211> 191 <212> ADN <213> humano	
	<400> 24 ggagtccggt gtgctggaga gccgcagcgg ggtgaactcc cgccccgtc tctgcgtagg	60
20	aggtggttcg caaagtggcc ccgggagccg ggactggtac ccggttcccc acggcacctg	120
	ccggagctct ccagccacga ggcgcagaag tggcctgcca gcgccttccc aggctcaggg	180
25	aggcgaggag g	191
	<210> 25 <211> 166 <212> ADN <213> humano	
30	<400> 25 ggcgccgag tggaaactgc tcacagagtc ggagaagcgg ccgttcacg acgaggccaa	60
35	gcgtctacgc gccatgcaca tgaaggagca ccccgactac aagtaccggc cgcggcgcaa	120
	gccaagacg ctgctcaaga aggacaagtt cgccttccc gtgccc	166
40	<210> 26 <211> 270 <212> ADN <213> humano	
45	<400> 26 tgagagcccc ctttggcact tggcagcacg cgcgggcggg ctctcggt caacttcgag	60
	gagtctccgc gacgcaactt ttggggacgc ttgcattta agagagaacg accgaggagg	120
50	aggagcgctc tgcccggccg ccgctacctg cggggagctc accagcaaac gccactgcag	180
	acgaaggacc caaagaacgt aaagggcaaa ctgccgccgc ggggaggggg caccgcccag	240
55	aagttagagt gtcccagaga caacctgctc	270
	<210> 27 <211> 311 <212> ADN <213> humano	
60	<400> 27 gcggtcagtt acatgtgctg gtgtccagcc gctgcctctc ttccccggt cggagcgcg	60
65	gggtgcgtgt gccctcactc tcacgaatac agacggagag ctcccagaa ggaaaaaaa	120

ES 2 707 341 T3

	attcgtcata atgttcagcg cagccgagag ttccaacaa gaaagcagct ccagtcgtgg	180
	catgatgact caggggtggcg ttttaaacgc tgaataaacc cattccttag ctctttaata	240
5	aatcgctaataaacagcaaaaacagccttctccccgaaccg cgccacacca aaggcttccc	300
	aagttgggct g	311
10	<210> 28 <211> 253 <212> ADN <213> humano	
15	<400> 28 atagcagggt ttacagggca aagagaggag aacctggaaa tcgtgtcctg gggggcaaga	60
	gtgcgttgcc cagtcacaag tgtgtcttag aggtgggaga ggacaaggac ccatttcac	120
20	attcaaccc tccgtttcta tcgtgcccc tggaggactc agctgctaac gccgagctcg	180
	ttccacgcg gctctggtcc tagtcgggga atccgggtgg ccgcgcgacg cgagagaact	240
25	gctgggatgc gtg	253
30	<210> 29 <211> 222 <212> ADN <213> humano	
	<400> 29 gatgcgtggc cctggtatgg gcgcacccag cgtccggggc gcaggttctc tcagcccagc	60
35	ttctctccc actcactcgc tcggtatccc tccctcttc acatccccg cccccgggac	120
	cgcgaggctc cctccccgca ccggccagt agtacacaaa gcccggggtg aggggaagct	180
40	tcgcaggcgt gcacggagca gtgagatcac tggcgttata aa	222
45	<210> 30 <211> 181 <212> ADN <213> humano	
	<400> 30 gctgctgaag gagtgaagg gaccttagag cagagcgggc ggtgcctgcg cagtgcgtga	60
50	ttacgcgagc cgggcgtggc ccagggttcc ggcgggtaag agcaggagtg tgcgcaggcg	120
	caaagattgc gctctcccc tctctcgcc tagagaccag aagcgtccct agttactagt	180
55	t	181
60	<210> 31 <211> 280 <212> ADN <213> humano	
	<400> 31 gttttgggtg gtttgggagt ccgagctcga gggctgggcc aggaagggca ggcgaggcgg	60
65	gcggctccga cgcgggtcgc gaaggccag ccgctcctc tgtccccagg acgactacat	120

ES 2 707 341 T3

	ttcccagagg ccagcggggc gcgcgtactc gagtctgcgg ggcggaggcc gcggctcggg	180
	gctgctgggc gttcggggcg gcttggggcg gcggggaccac tggagtgagc tgtgggagag	240
5	atgggggtgt gcctgtgtgt aaaagatctg tcagagtgtg	280
10	<210> 32 <211> 253 <212> ADN <213> humano	
15	<400> 32 ggggaggggg aggaggccag ttgaaaagta gaggccgagg acagagttag acactcgttg	60
	tctaacggcc ctgccggagg ggctccgcct gtcagactgc gtcaccctct cgccaagggt	120
	ccccagacg ggcgggggct ccttgcggcc ggctagctac tctccccgcc tccctgcgcc	180
20	ctcgccctcc gccccgtgt acccgagag cgcgcgggcc agcgagccc ctttggcac	240
	cgaggttcc agg	253
25	<210> 33 <211> 251 <212> ADN <213> humano	
30	<400> 33 ggtttcagc tgctaggac cggaaccagg gatcgaccg cagcccaagg taccagttc	60
	gggcggggcg cctggcccgg caggagatg aggtcccctt tcttaacagc aagctaacgc	120
35	ggcgtcccc tggagtgtct cagcgtccca gcttctaacc agctcctatg gaatccaggt	180
	gcggcttaaa tctgcacac tggccccta aacttcaaa accacgttta tgggcaaagc	240
40	cctgccggct g	251
45	<210> 34 <211> 205 <212> ADN <213> humano	
	<400> 34 ggctccccta gcgatgtgga ggacctcaa gagggtgaga tgttggaatg tgacgggttg	60
50	aaaatggatt cgaacaagga atttgtgact tccaacgaga gcaccgagga gagtccaac	120
	tgcgagaatg ggtctcccca gaagggccgc ggcggcctgg gcaagaggag gaaggcgccc	180
55	accaagaaga gcccctgag cgggg	205
60	<210> 35 <211> 240 <212> ADN <213> humano	
	<400> 35 gaggaaggcg cccaccaaga agagccccct gagcggggtc agccaggagg ggaagcaggt	60
65	ccagcgaac gccgccaacg cgcgagagcg ggcccgcctg cgagtgtga gcaagcctt	120

ES 2 707 341 T3

	ctccagactc aagaccaccc tgccctgggt gccccccgac accaagctct ccaagctgga	180
	cacgctcagg ctggcgtcca gctacatcgc ccactgagg cagatcctgg ctaacgacaa	240
5	<210> 36 <211> 281 <212> ADN <213> humano	
10	<400> 36 gggatccctc ctctgtgcca gctcaacaca ctgcaaact ttaattggg ctgccacgtc	60
15	aaaccctcgc ataaatcact ccgctccgg gggctgtag ggcagagagc gagggccgtg	120
	tctagaccgc ccgctccgg tccctggagg ctctaggccc gcggtggtcg agatgtgtaa	180
	gtcaccgccc cgccacacc ccactccca gccccgcgcg cactcgcgcc caccgcaggc	240
20	gggagtgcgg gcgcgcctgg actgcagctg cagccccggg a	281
25	<210> 37 <211> 225 <212> ADN <213> humano	
30	<400> 37 aggcttcaa ggggaaactc tgactcgtg tctgatacc tccgccctcc gcatcctccc	60
	gccctcccc gcccttcca agtttgaaa cactatggga cagctcgag tgctctgcag	120
	ccccgacatg ggcagaattt gcagatctcc ggcgatcaaa gcaggagctg tccagtcccg	180
35	cctcacctgt gccctgtagg ccactgtag ggtggagggc tccag	225
40	<210> 38 <211> 205 <212> ADN <213> humano	
45	<400> 38 ggaggcacc tagggccagg gaaactttg ccgtataaat agggcagatc cgggctttat	60
	tatttagca ccacggcagc aggaggtttc ggctaagttg gaggtactgg ccacgactgc	120
	atgcccgcgc ccgccagggtg atacctccgc cggtgacca ggggctctgc gacacaagga	180
50	gtctgcatgt ctaagtgcta gacat	205
55	<210> 39 <211> 198 <212> ADN <213> humano	
60	<400> 39 gaggaggagc atggaggcag ccacctagct cagcggagac gcggagccca cagcagcgc	60
	ctccggagcc ctaacacgtc gctgccacca tccgcgccgg gactccgcag ccgagctcgg	120
	ccgcccgcag gacgctccag gagcgtcgcg gaccgggcgg cacgggacgc tgcggggctg	180
65	agctcaagag cccagggt	198

ES 2 707 341 T3

5	<210> 40 <211> 282 <212> ADN <213> humano	
	<400> 40 agtctgttac tcggtctggc tgaccccgcc ggtgtctctg tgcattcatg ctacctttcc	60
10	ctattaccca ccccttccc agatccgagc agtccgccgg ccgcgcgga cccagagcaa	120
	gaagagggcg aggaagaaga tgctcggcc cggccgcaac acgtacagcg accagaagcc	180
15	gccctactcg tacatctcgc tgaccgctat ggccatccag agctctcccg agaagatgct	240
	gccgctgagc gagatctaca agttcatcat ggaccgcttc cc	282
20	<210> 41 <211> 211 <212> ADN <213> humano	
25	<400> 41 gagttcatgt tcgaggaggg ctctttcgg cggcggccgc gcggttcgg aaggaaatgc	60
	caggcgctca agcccatgta cagcatgatg aacgggctcg gcttcaacca cctcccggac	120
30	acctacggct tcaggggctc ggccggcggc ctctcgtgcc cgccaacag cctggcgctg	180
	gagggcgggc tgggcatgat gaacggccac t	211
35	<210> 42 <211> 320 <212> ADN <213> humano	
40	<400> 42 gtccggcccc tccaaggcca agaagaccaa cgccggcatc cggcgcccgg agaagccgcc	60
	ctattcctac atcgcgtca tcgtcatggc catccagagt tcaccacca agcgctgac	120
45	gctgagcgag atctaccagt tctgcagag ccgcttccc ttctccggg gctctacca	180
	gggctggaag aactccgtgc gccacaacct ctgcgtcaac gagtgttca tcaagctacc	240
	caagggcctt gggcgggccc gcaagggcca ctactggacc atcgaccgg ccagcgagtt	300
50	catgttcgag gagggctcct	320
55	<210> 43 <211> 316 <212> ADN <213> humano	
60	<400> 43 ccctgcccag ccaactgggtg cccacctgc ctccaacgg cggccactcg tacatgggcg	60
	gctgcggcgg cgcggcgccc ggcgagtacc cgcaccacga cagctcgggt cccgcctccc	120
	cgctgctgcc caccggcgcc ggtggggta tggagccgca cgccgtctac tcgggctcgg	180
65	cggcggcctg gccgcctcg gcgtccgcg cgctcaacag cggcgctct tatatcaagc	240

ES 2 707 341 T3

	agcagccctt gtccccctgt aaccccgcg ccaacccct gtccggcagc ctctccacgc	300
	actccctgga gcagcc	316
5	<210> 44 <211> 212 <212> ADN <213> humano	
10	<400> 44 ggttgggccc gggatcagag ctttcttg aagtctctg ggtggcagag actcgggcaa	60
15	ccggagcctg agcctccgc ggggaagagc tcggactccg gaggtcgcgc cgccttgggc	120
	ttgaattcag tccttcctta ctactcgtg ctttcttac atcatttaac tctccatttc	180
	cttgtctata cagtgggctc ataaggaggc gg	212
20	<210> 45 <211> 187 <212> ADN <213> humano	
25	<400> 45 cttcaggga gggcaggga ggcagcggag agcgaagtc tgctcggcgg agagacctcg	60
30	aggagagtat ggggaaagga atgaatgctg cggagcgccc ctctgggctc cacccaagcc	120
	tcggaggcgg gacggtgggc tccgtccga ccccttaggc agctggaccg atacctcctg	180
	gatcaga	187
35	<210> 46 <211> 205 <212> ADN <213> humano	
40	<400> 46 gaagattcca agaggaatgg agggcttg gctccagctc ggacgtctc tggggcaagg	60
45	agggtcagga ggctgcgctg ttggattct cctcggggtg agcagggccg ggctgtcctg	120
	ccggctctgg agcgcatatg ccgagccagc gcgcacttg gtagggctaa ctgcgttcag	180
	ctttggcagg agctctgctc ttct	205
50	<210> 47 <211> 102 <212> ADN <213> humano	
55	<400> 47 agagtaagag agagcagccc atctaataga gtgtccgga ggccagcgc agcgggtgct	60
60	gtaaggagcc cggcggcggc aggtgggaat tgattgagct gg	102
65	<210> 48 <211> 165 <212> ADN <213> humano	

ES 2 707 341 T3

	<400> 48	
	gtgcagctca ggcaggctca gtgcatggca ggcgcgtatt tacctgtgtt tgtgtcaatc	60
5	ccagcgaggc ggccagctcg gcgcgttccg gcaaggcgag gtactgagtc ttctgaaacc	120
	ttctctgtaa tgcggccagc tgaaagctgg aataaatagt cctgg	165
10	<210> 49 <211> 180 <212> ADN <213> humano	
15	<400> 49	
	ctgcccagcc ttcccctgt ccatgtacct ggctggttg tggcgcttg gacgcggtg	60
	taggcgccgc cgtactggtg gtaggagcta gcgtagctat agtcggcata agctttggct	120
20	gggtagctcc cggcggagcc gttcacgccg tgatactgat actggtagg gttgagagct	180
25	<210> 50 <211> 164 <212> ADN <213> humano	
	<400> 50	
	gtgaccagca cttgtactg ctggggccgc tccagggaga agactctccc ttccaccgt	60
30	tttctccctc gccggttcc tggaccaccc ttctcccca ccgcccggtt gcgtaactc	120
	agttaccgcg ctgggctcgc gttccagga gggagggttc gggt	164
35	<210> 51 <211> 284 <212> ADN <213> humano	
40	<400> 51	
	ctggaatggg tgatctggga cgcggctcaa ttcctagag cataaggagg gaattgcgt	60
	tttctctt cattcgagaa atgatcggct cccgccagtc tgcgtgctt cactcaacag	120
45	cagctgcaag ccctaggcca gcgtcgaga aacggccagg aacccactt tcctaccgg	180
	gggccagcag cgatcgctgg ggctagcaag cgtgcagagg gggaaagaag gaaatcggct	240
50	tcctcccg acccctcct cctcttcta ccaggaaggg aaaa	284
55	<210> 52 <211> 159 <212> ADN <213> humano	
	<400> 52	
	aaagtgggag gggctcaagg acccagagga aggacgtgt tcacaggcgg aaagccgcg	60
60	ggacaatggc gagagcgacc gccctagccc cgggcggacc cgcaaccctc aactcgcgc	120
	gccccgcgt tagtgctga actggtctcc gccttccg	159
65	<210> 53 <211> 355	

ES 2 707 341 T3

<212> ADN
<213> humano

<400> 53
5 agtgtgtcag tcactaggca gtgagacgcc aggcttaggg cgaaaaaagt ttctctggaa 60
ctcgggagct ggtggggagt ctctgtcacg gactgagggt ttttgtgtt tttaatggg 120
agtcctctggg taaaggggcg gggcgaggag gcgaacgaga caacctagt attgtttgaa 180
10 ttgaagcatt gcgaggggaac aatggcagaa aaaccgcgtt ttctccaag tcctgttccg 240
gccctggaag agctgtccg ggcgccacac tgggatcctg ttgcccgagc ctgccctcc 300
15 acgccggccg tgcacagccc tgcgatacc gtgggtgcag ctggcgactg cactg 355

<210> 54
<211> 329
20 <212> ADN
<213> humano
<400> 54
25 gatggagtag cctgcccctg tggcagcccg ggcccagggt gattcctct gggaacgacc 60
cctccctct cagcgcgcac tgtgccagag cagtacacag gtacaaaggg caaacgtgtt 120
catgattca ttgaattct gttgtttta catcgttctg cctgatgta aaacaaacca 180
30 ggattttaa ggcagtgagt gatgaggagc tactccact tgggaagag ctgctaactt 240
tactttccg ctgctgttg ttccggttca aagctcgggt tgggaagtaa gaggaggact 300
cggagacttt gaccagagca ctccaggcc 329
35

<210> 55
<211> 364
<212> ADN
40 <213> humano
<400> 55
agaaagctga agtgacctgt gagactctc tccacctac ccgcgccaa aacgccagc 60
45 gccgggtctg ggtttcgaa cggctcagcc caggccctgc gccagagcac cgcacccggg 120
ggcggacggc cctgcagctc ccagcctct tccgcatac actagctgac gcccgggcgc 180
actggctcc ccgctcccg ttctgtatta attagtgac gttcgggct attggtttt 240
50 ttctgttctg ttgttatta attagtgat gttgggtgt attggtttt ttgtttttg 300
ccgcacgaa agccctgcc gacgtctga gtcagcatc cccgactgc ctaggaggg 360
55 ttgt 364

<210> 56
<211> 205
60 <212> ADN
<213> humano
<400> 56
65 cccgactgc ctaggagggt ttgcgccga gaccagtgg ccgagtgag cacagatcg 60
ctggctctgg ggacgtgtc ttctaccgt cccaccgtc ctctcttc ctgtatctca 120

ES 2 707 341 T3

	ccccggtacc ccgcaccctt ctccccgctc ggccccgcgc actctgtca gactttacaa	180
5	gcactttctc ggggcaccca ggact	205
	<210> 57	
	<211> 304	
10	<212> ADN	
	<213> humano	
	<400> 57	
	acaagcactt tctcggggca ccaggactc gacgcctct ccgcgcgcgc agcggcgctc	60
15	gccacccttg gcacgccgga gggaccgcct ccggccccct gcgcggcggt ttcagggga	120
	ctccagccc atccctacc cagctgtccg ggtcccgcgc cttacctt gccgaactgg	180
20	gggacaccga ggctgagccc gaccaagagc cagacggcta ccgagcgctt catgatcccg	240
	tctccgggac gtgaccccg ctggtcaggg gtcgtcgcgc agggcagtg agccgaggtg	300
	gcag	304
25		
	<210> 58	
	<211> 309	
	<212> ADN	
30	<213> humano	
	<400> 58	
	ggggactccc agccatccc tcaccagct gtccgggtcc cgacgcctta ccttgccga	60
35	actgggggac accgaggtcg agcccgacca agagccagac ggctaccgag cgcttcatga	120
	tccgtctcc cggacgtgac cccggctggt caggggtcgt cgcggagggc agttagccg	180
	aggtggcagc gcagggcagc agcagactcc gccctacta aagaattcaa gaagacgttc	240
40	tcttctca gcgcttgtt aaacaaatc ttggagaggg cgagagtgt gactaaagag	300
	aggagcctt	309
45		
	<210> 59	
	<211> 275	
	<212> ADN	
	<213> humano	
50	<400> 59	
	gagagtgtg actaaagaga ggagccttc ctccccttt gcctgcgctc cggcgcgcg	60
	aggtgggtga gctccgggga gccgcgcgc gcgtcagccc tccgtgcgc gtgggtccc	120
55	gcagaggcgc ggcgggcggg gcgcgggctc ccgcggccgc cccgggtctg ctgcgcgggc	180
	aggcagacc accggcagac aggcggaccg ggcgctcggc tgcgctgtt ctccgcgcgc	240
60	cggctcggg gcttctgact tggagaacaa tgaag	275
	<210> 60	
	<211> 249	
65	<212> ADN	
	<213> humano	

ES 2 707 341 T3

	<400> 60	
	actggttttc tctcgggccca gggcctccgg ggcaaccgtc tccagcgcgc attcttggtg	60
5	cagggtgaac agctttctgc tccggtaggg cttcacctat cgcgggagag gtaaatctcg	120
	gatctaaacc tcgcagccgc agagcgggct aaaaccgcta ctccacctct tcccattct	180
	cccccccca cctcaagaca aaaagtccca ggccgggcag gacctgatca cctctgcctc	240
10	ctcccactg	249
	<210> 61	
15	<211> 247	
	<212> ADN	
	<213> humano	
	<400> 61	
20	ccctaccact ccgggaactc tgtgatcttc aggaccggcg ggtttcaagt ggcgctgttt	60
	tcggtctctc ctgaggtcgc aacctcttc ccacgaacaa cagcccacag gctccgcagc	120
	tcgccttggt ctcaacaacc gcgcagtact tgggtgctta agcgagtccc ctaccacata	180
25	gtccaggggt gggggcgggg gagatggggc tgggagggga cagtggccag gagtagcgga	240
	aagagaa	247
30	<210> 62	
	<211> 229	
	<212> ADN	
	<213> humano	
35	<400> 62	
	aaggaccttg taagagaaag ggagaaaaga ttttgtgtgt ggagcgtgcc tcgtaagggt	60
	tcgtgcttag gagaagttgg gaggaggcag ctgcctaga gtcttacgg accgaattcg	120
40	gagtttattt cgaacactat gcatcaagcc aaagaaaagc ggggccagtt tgggtttgcg	180
	cctaacttaa ttccgatacg cgcgtcaaaa tgtgtgtag gctggggcc	229
45	<210> 63	
	<211> 211	
	<212> ADN	
	<213> humano	
50	<400> 63	
	gaggagaga aaagaatact gaaaataaag ctggcggccg cgggctactg cctgcgttg	60
	tgtgcgtgtg ccctgggtgt gtggtgttg tgctgggcg tgcgatttaa tggagcgcct	120
55	ctctgcctct ccagtgcgc cagagctgc ttcgcgcacc caccctgcc gaggagccta	180
	cttgctgcag cccaatgcat tgttaagac g	211
60	<210> 64	
	<211> 254	
	<212> ADN	
	<213> humano	
65	<400> 64	
	ccgaggagcc tacttgctgc agcccaatgc attgtgtaag acgcgacctg ttatggccac	60

ES 2 707 341 T3

	cactacttcc gggttctagc attctggctg gaatccacct ctccgcctgt gcaacacaca	120
5	ctttacacac gcacggggac tgcaagcggg cagcatcgat cgtggctcct ttaagacaaa	180
	ctcagacaga cattttttt aaccctcctt ctctaatttc ctccagtgc agcacttgca	240
	aagagggaga gaga	254
10	<210> 65 <211> 195 <212> ADN <213> humano	
15	<400> 65 cagcctcaga acccctgct gggaaacatc tgctgctcta ggcccttgac gtcctgaggt	60
20	tagagagcag cgttactact aggagggacg ccggcttggc taggacaccc tgcactccct	120
	ggggtcagga acggaagga atggtcagaa acagatgatc agccacaatg atagatggtc	180
	agagacagaa atttt	195
25	<210> 66 <211> 300 <212> ADN <213> humano	
30	<400> 66 caacttttg acacatctgg gcagttgcta agggctcttg ccaagcgtct aggtgaagcct	60
35	ttggcaaaca gctacagggg tcgttttgc taatgtagga ctttggaac ggtgctctgg	120
	cacacaattt gggtaaactt atgcgcgcac aaggatggga gggagcttg tcaaagcggg	180
	gcttgcaaaa ttctaggaa ccttcggcac agatccggag agggacctt aaacaaacag	240
40	ctcgaggggg ccatttgga agtgattggg gcaggaggga agcagagagc gcattctttt	300
45	<210> 67 <211> 172 <212> ADN <213> humano	
50	<400> 67 ggcgaggaag ctccataaaa gccctgtgc gaccgcctct ctgcaccca tccgtggct	60
	ctcacccctc ggagacgctc gcccgacagc atagtacttg ccgccagcc acgcccgcgc	120
	gccagccacc gtgagtgcta cgaccgcgtc gtctaggggt gggagcgaac gg	172
55	<210> 68 <211> 193 <212> ADN <213> humano	
60	<400> 68 ttaccttta gcagatatg agggagaacc cgggaccgct atccaaggc agctggcgg	60
65	ctccctgcgg gtcgccgct tgaggccag gaagcgggc gcggtaggaa ggtttccc	120
	gcagcgccat cgagtgagga atccctggag ctctagagcc ccgcgccctg ccacctcct	180

ES 2 707 341 T3

	ggattcttgg gct	193
5	<210> 69 <211> 205 <212> ADN <213> humano	
10	<400> 69 gggagaaaag tgaccagca ggaagaactt ccaattcgtt ttgaatgct aaactggcgg	60
	ggccccacc ttgactctc gccgcgcgt tcttggtccc tgagactcg aacgaagtg	120
15	cgcgaagttt tcaggtggag cagaggggca ggtcccgacc ggacggcgcc cggagcccg	180
	aaggtggtgc tagccactcc tgggt	205
20	<210> 70 <211> 174 <212> ADN <213> humano	
25	<400> 70 acaaatggat ggatgagtga atgaatgaac gaaggaacaa gtgaccgctc gaccttctac	60
	agcgacagcg gcgcaggcgc tcccgacca acagcccccc accccgccac cgccagagg	120
30	cgcagacagg ccgggtcccg agtgtctgtc ccaggcccc gccccacagg atcc	174
35	<210> 71 <211> 260 <212> ADN <213> humano	
40	<400> 71 tcgtcctctt gtgcagacca ggctggccgt gcaccagcga gtgtgcaccg agacccaag	60
	ggcgtggggt ctccgcgcc gggtctatc tgtcccgac caccgccag cctccccgg	120
	gctcaccatg ccgcggtaca gctctccag gcgcccgtcg atccactct ccacgtccag	180
45	ccgccgtgc agtcccgcc ggtcatactt gacggtgacg cgcgcgtgcc gcttctgcag	240
	cccccgga ctgcccctg	260
50	<210> 72 <211> 17 <212> ADN <213> humano	
55	<400> 72 cggaagtcgc gttcgtc	17
60	<210> 73 <211> 20 <212> ADN <213> humano	
65	<400> 73 gcgtacaact cgtccgctaa	20

5	<210> 74 <211> 23 <212> ADN <213> humano	
10	<400> 74 gaatgtattt ggtcgtgta cgc	23
15	<210> 75 <211> 14 <212> ADN <213> humano	
20	<400> 75 cccgacgtcc cgcc	14
25	<210> 76 <211> 23 <212> ADN <213> humano	
30	<400> 76 tttagtattt tcggacgcgt ttc	23
35	<210> 77 <211> 26 <212> ADN <213> humano	
40	<400> 77 gaaataaccg acactacgta aaatcg	26
45	<210> 78 <211> 21 <212> ADN <213> humano	
50	<400> 78 cggagacggt cggtcgatag t	21
55	<210> 79 <211> 22 <212> ADN <213> humano	
60	<400> 79 caaacgaatc gtaacactca cg	22
65	<210> 80 <211> 23 <212> ADN <213> humano	
	<400> 80 ctaaacccgt ccgcctaccc ctc	23
	<210> 81 <211> 20	

ES 2 707 341 T3

<212> ADN
<213> humano

5	<400> 81 cggattttcg attcggaagt	20
10	<210> 82 <211> 250 <212> ADN <213> humano	
15	<400> 82 tagcgcagga tgaggaggc agcccatcct caccgccggt ctcggtccgc gagacgcggg	60
	gacagcgcgg tgcgcggccc gcatgcaggg gtgaccggag ggccgtcccc cccacgaccc	120
	ggaaagaagg agagcctccc gttaggcccc tgtgggtgct ccttgccga ggagctcgg	180
20	cttcgtctc ccaccctccc ctttctact cccaagcagg agagcgtgca gccctagcct	240
	gcacaaggcg	250
25		

REIVINDICACIONES

1. Un método de escrutinio de la aparición o la predisposición a la aparición de una neoplasia colorrectal o el seguimiento del progreso de una neoplasia colorrectal en un individuo, comprendiendo dicho método evaluar el estado de metilación de la región de ADN definida por las coordenadas Hg19 chr12:24964278..25102308 y 2kb
5 aguas arriba del sitio de inicio de la transcripción del gen BCAT1 comprendido en el mismo en una muestra biológica de dicho individuo, en donde un nivel superior de metilación de las regiones de ADN especificadas más arriba con respecto a los niveles de control es indicativo de una neoplasia colorrectal o una predisposición a la aparición de una neoplasia colorrectal.
2. El método según la reivindicación 1, en donde dicha neoplasia es un adenoma o un adenocarcinoma.
- 10 3. El método según una cualquiera de las reivindicaciones 1-2, en donde dicho nivel de control es un nivel no neoplásico.
4. El método según la reivindicación 3, en donde una disminución en el nivel de metilación con respecto a dicho nivel de control es indicativa de aclaramiento de la neoplasia.
- 15 5. El método según una cualquiera de las reivindicaciones 1-4, en donde dicha muestra biológica es una muestra fecal, un lavado de enema, una resección quirúrgica, una biopsia de tejido o una muestra de sangre.
6. El método según la reivindicación 5, en donde dicha muestra de sangre es sangre completa, suero o plasma.
- 20 7. Un método de escrutinio de la aparición o la predisposición a la aparición o el seguimiento de una neoplasia colorrectal en un individuo, comprendiendo dicho método evaluar el nivel de expresión de la región de ADN definida por las coordenadas Hg19 chr12:24964278..25102308 por medio de lo cual dicha expresión es específica para el gen BCAT1 comprendido en dicha región de ADN en una muestra biológica de dicho individuo, en donde un nivel inferior de expresión de la región de ADN especificada más arriba con respecto a los niveles de control es indicativo de una neoplasia colorrectal o una predisposición a la aparición de una neoplasia colorrectal.
8. El método según la reivindicación 7, en donde dicho nivel de expresión es la expresión de ARNm o la expresión de proteína.
- 25 9. El método según una cualquiera de las reivindicaciones 7 y 8, en donde dicho nivel de control es un nivel no neoplásico.
10. El método según una cualquiera de las reivindicaciones 7-9, en donde dicha muestra biológica es una muestra fecal, un lavado de enema, una resección quirúrgica, una biopsia de tejido o una muestra de sangre.
11. El método según la reivindicación 10, en donde dicha muestra de sangre es sangre completa, suero o plasma.
- 30 12. El método según una cualquiera de las reivindicaciones 1-6, en donde dicha región de ADN es la región promotora.
13. El método según una cualquiera de las reivindicaciones 1-12, en donde dicho individuo es un ser humano.

FIGURA 1

Figura 1(a)

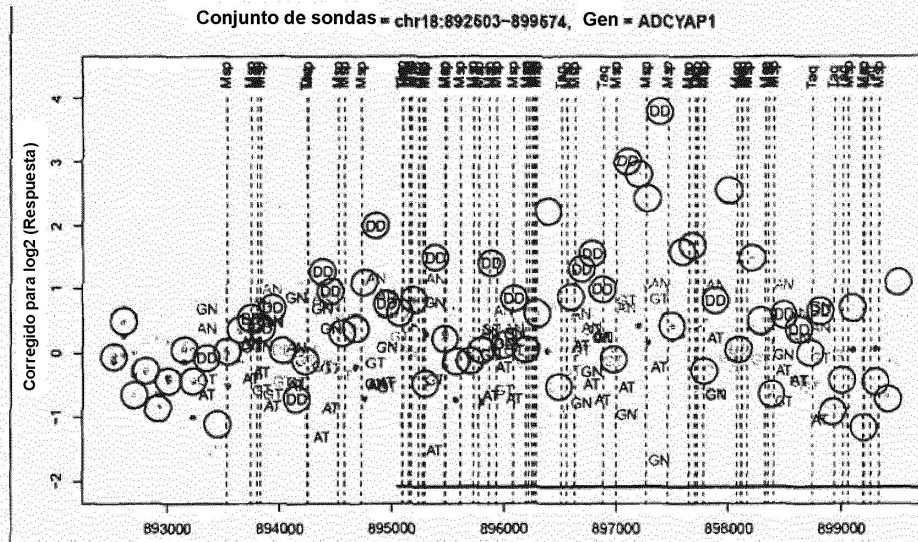


Figura 1(b)

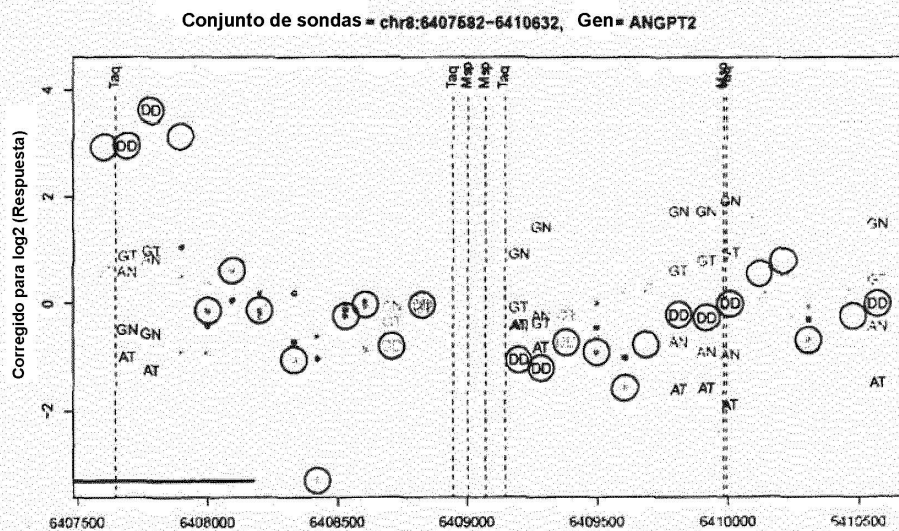


FIGURA 1 (cont.)

Figura 1(c)

Conjunto de sondas = chr7:30915552-30918602, Gen = AQP1

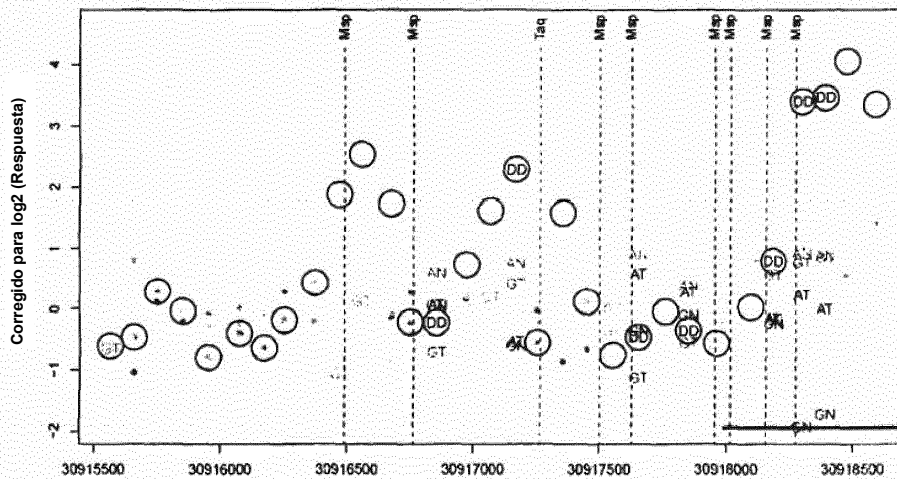


Figura 1(d)

Conjunto de sondas = chr17:75384875-75393063, Gen = CBX8

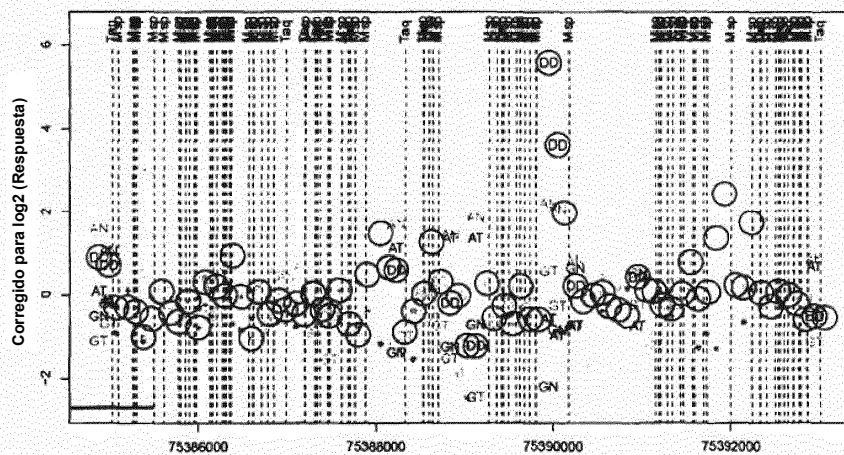


FIGURA 1 (cont.)

Figura 1(e)

Conjunto de sondas = chr16:65168411-65171461, Gen = CMTM2,CKLF8F2

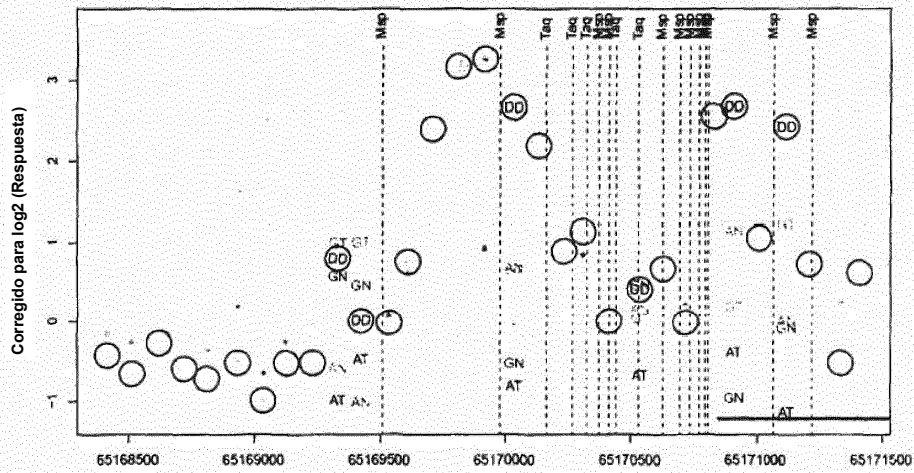


Figura 1(f)

Conjunto de sondas = chr8:4836376-4842176, Gen = CSMD1

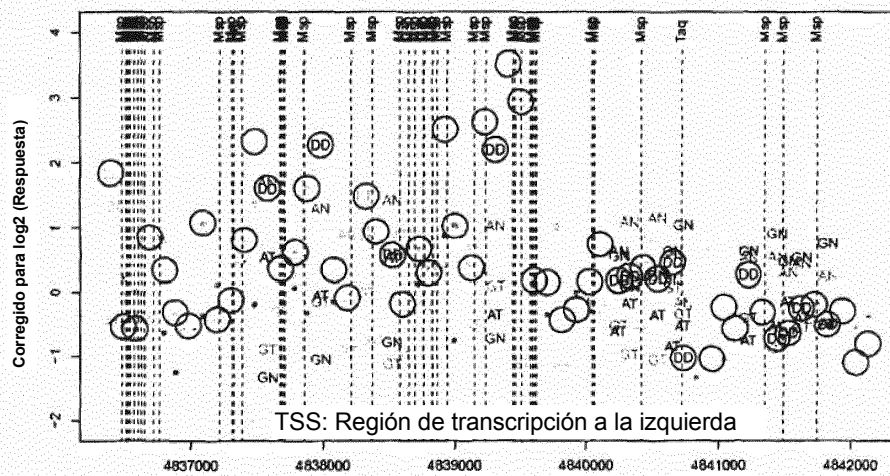


FIGURA 1 (cont.)

Figura 1(g)

Conjunto de sondas = chr7:96491403-96494519, Gen = DLX5

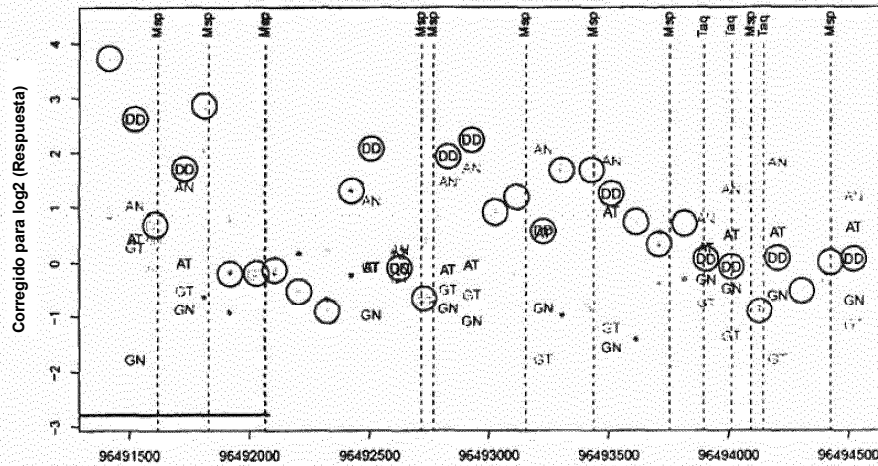


Figura 1(h)

Conjunto de sondas = chr1:50655815-50664169, Gen = DMRTA2

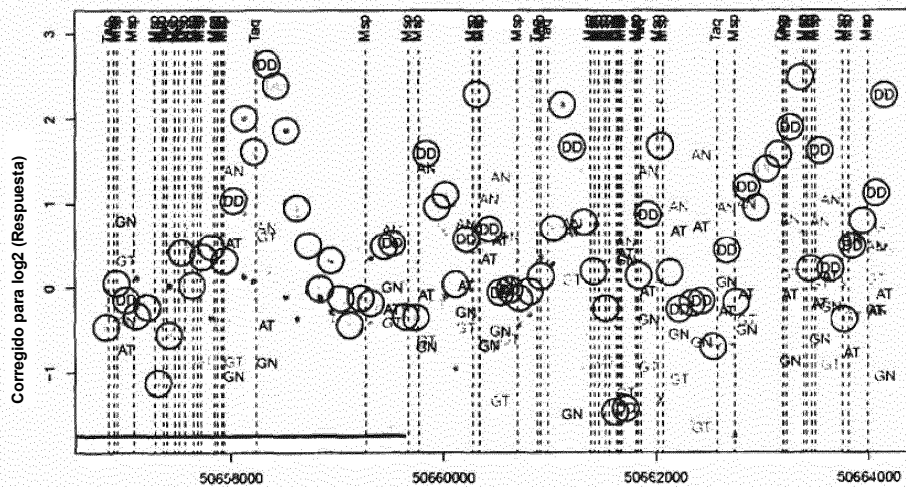


FIGURA 1 (cont.)

Figura 1(i)

Conjunto de sondas = chr10:131651159-131661686, Gen = EBF3

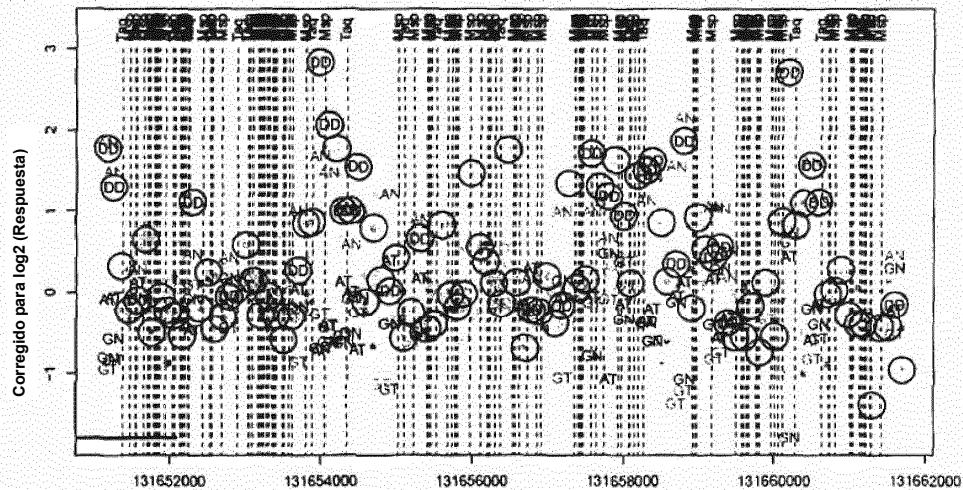


Figura 1(j)

Conjunto de sondas = chr4:126454576-126458380, Gen = FAT4

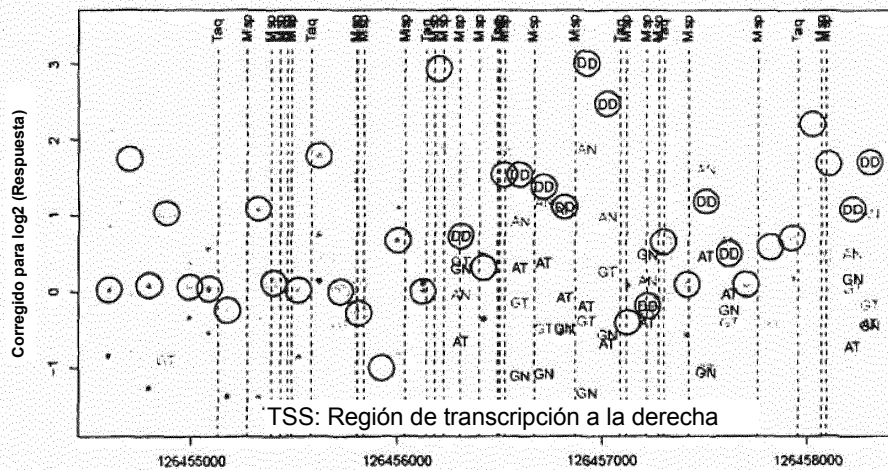


FIGURA 1 (cont.)

Figura 1(k)

Conjunto de sondas = chr4:81404325-81407375, Gen = FGF5

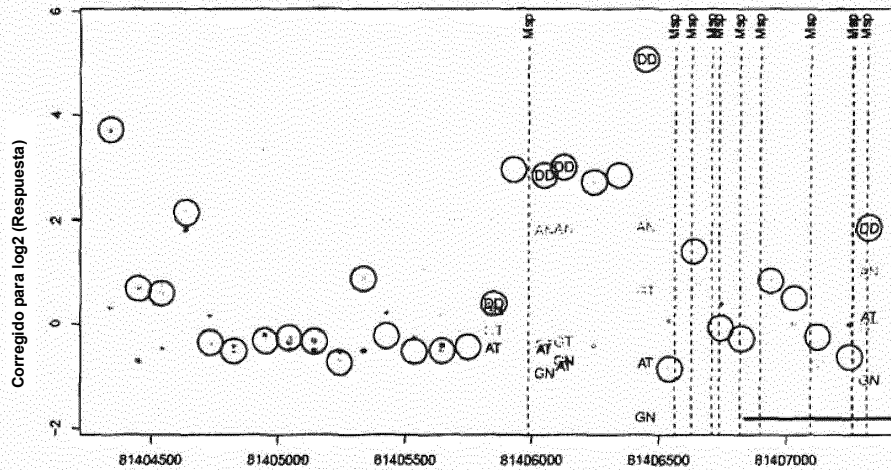


Figura 1(l)

Conjunto de sondas = chr14:85063800-85066850, Gen = FLRT2.BX248253

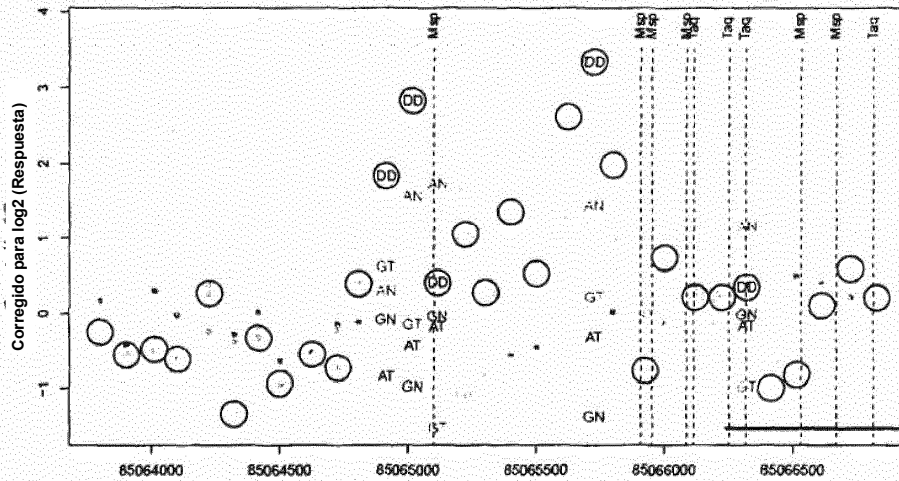


FIGURA 1 (cont.)

Figura 1(o)

Conjunto de sondas = chr3:129688182-129697160, Gen = GATA2.CR595360

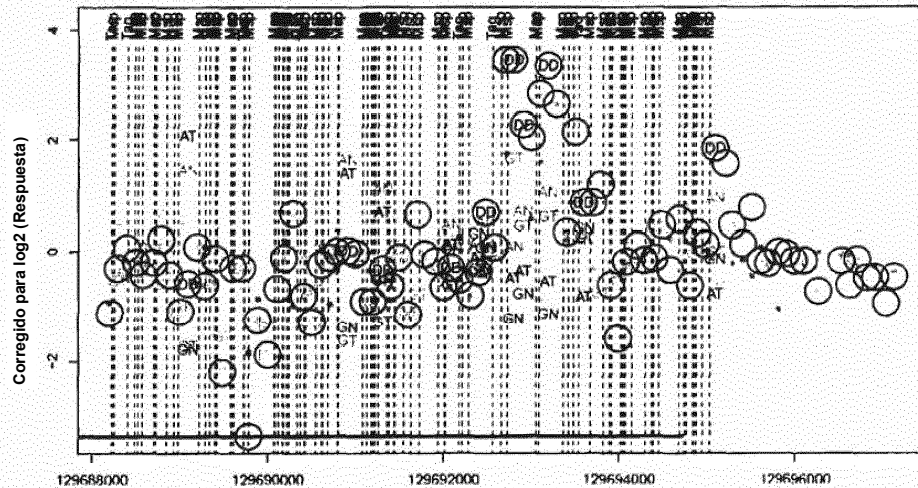


Figura 1(p)

Conjunto de sondas = chr5:37870045-37877979, Gen = GDNF

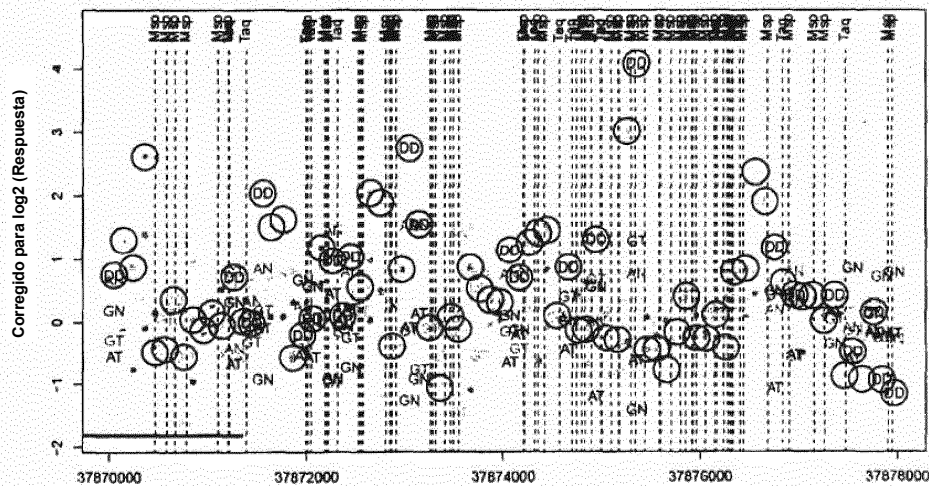


FIGURA 1 (cont.)

Figura 1(s)

Conjunto de sondas = chr7:27149138-27152252, Gen = HOXA5

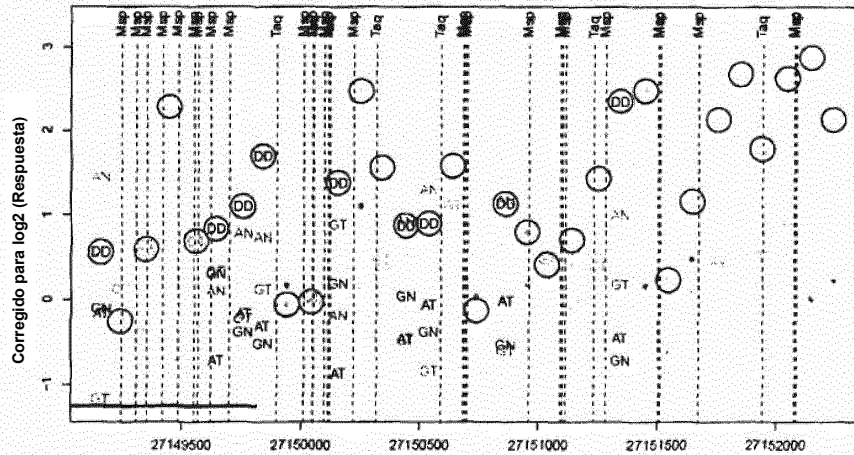


Figura 1(t)

Conjunto de sondas = chr5:3848727-3656054, Gen = IRX1

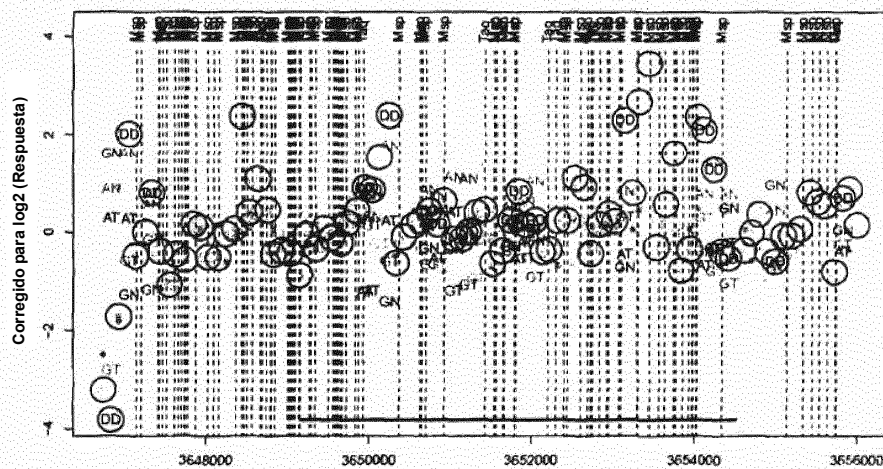


FIGURA 1 (cont.)

Figura 1(u)

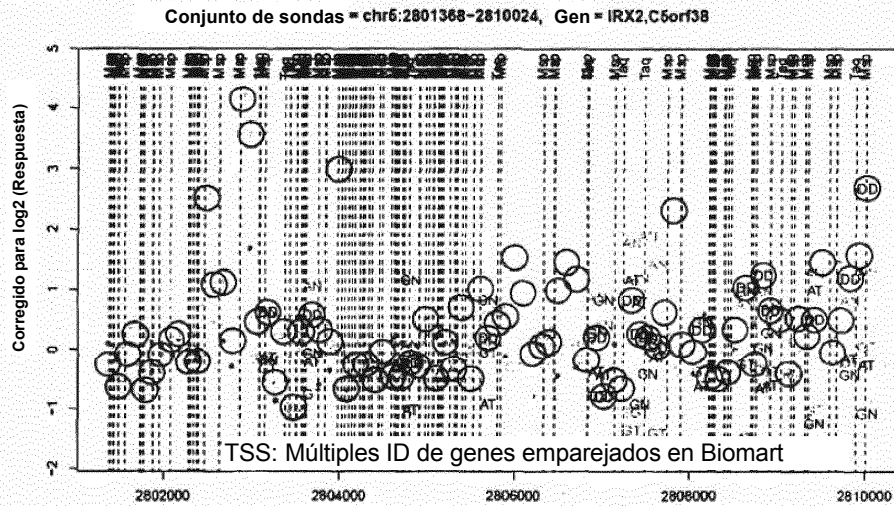


Figura 1(v)

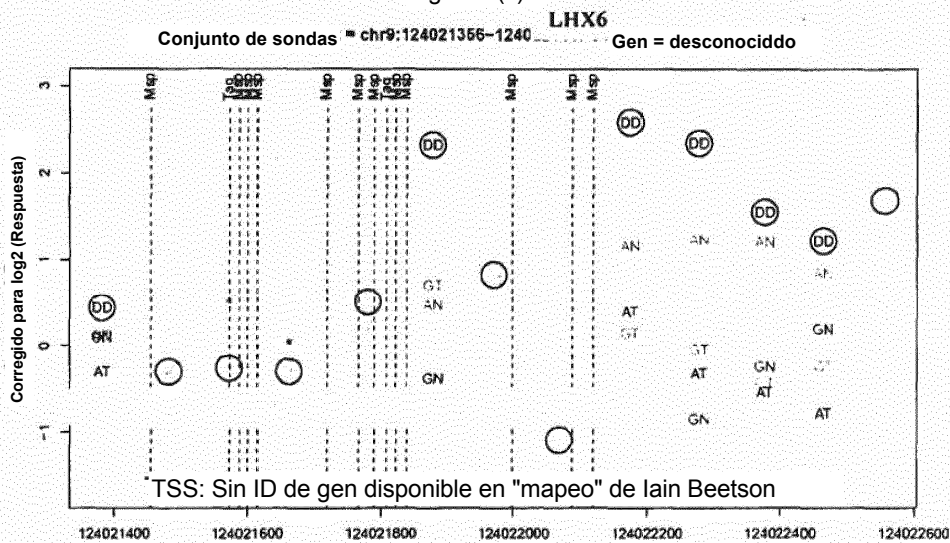


FIGURA 1 (cont.)

Figura 1(w)

Conjunto de sondas = chr15:34965416-34968466, Gen = LOC145845

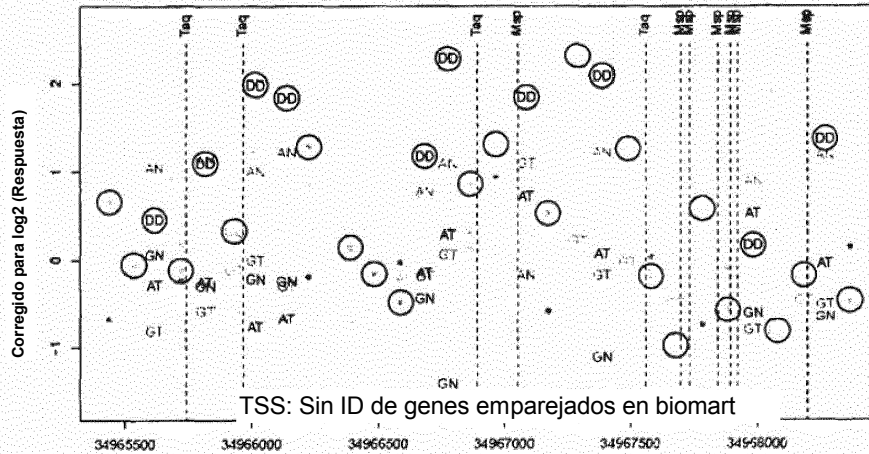


Figura 1(x)

Conjunto de sondas = chr4:61748478-61751396, Gen = LPHN3,LEC3

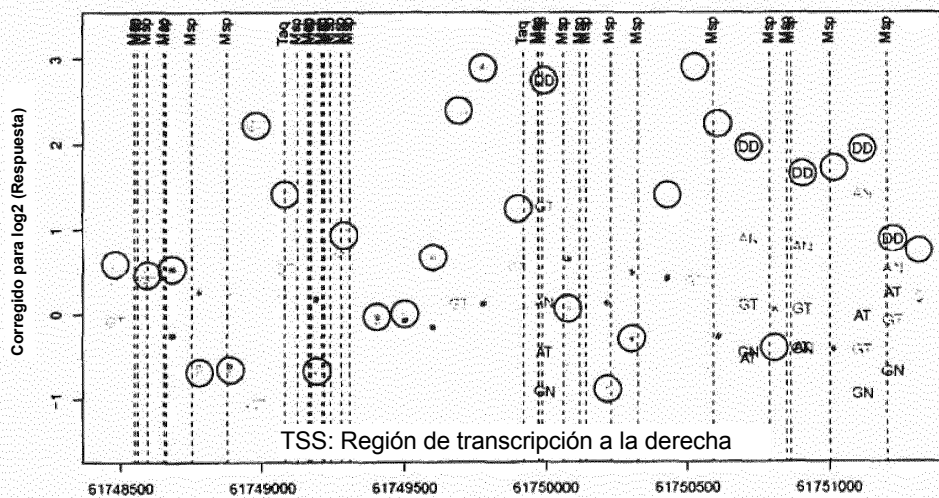


FIGURA 1 (cont.)

Figura 1(y)

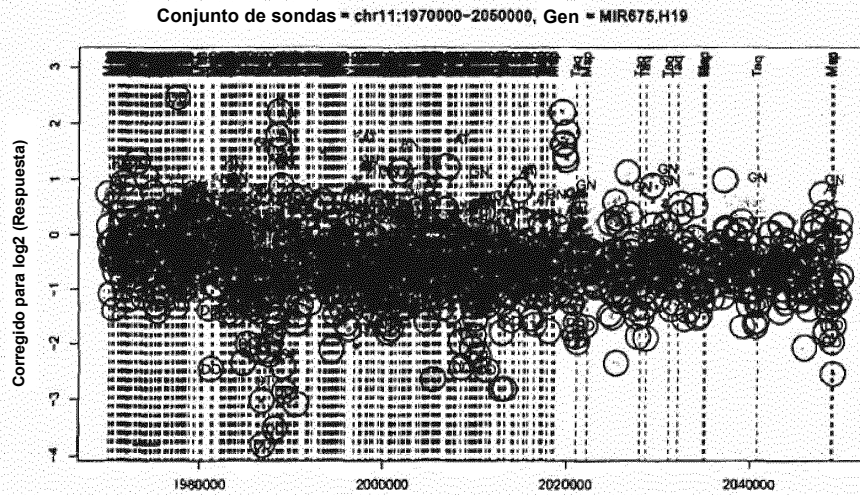


Figura 1(z)

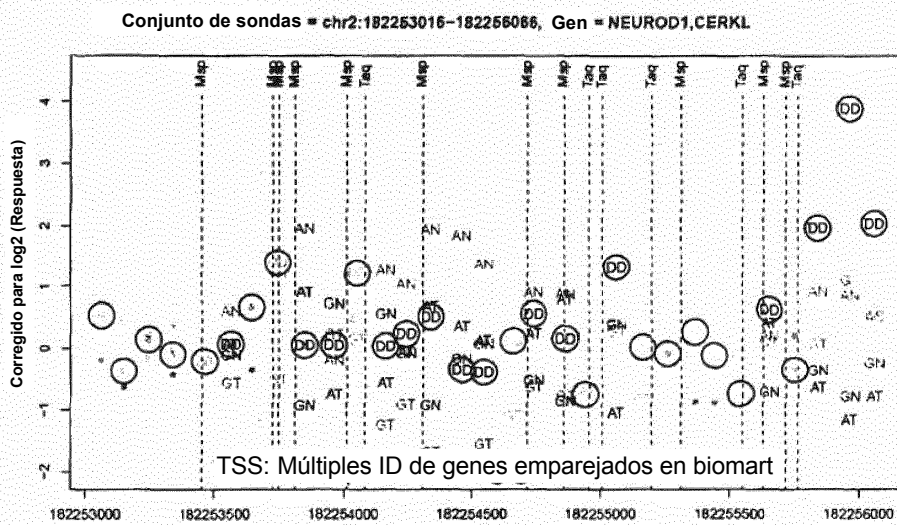


FIGURA 1 (cont.)

Figura 1(aa)

Conjunto de sondas = chr20:21433932-21446104, Gen = NKX2-2

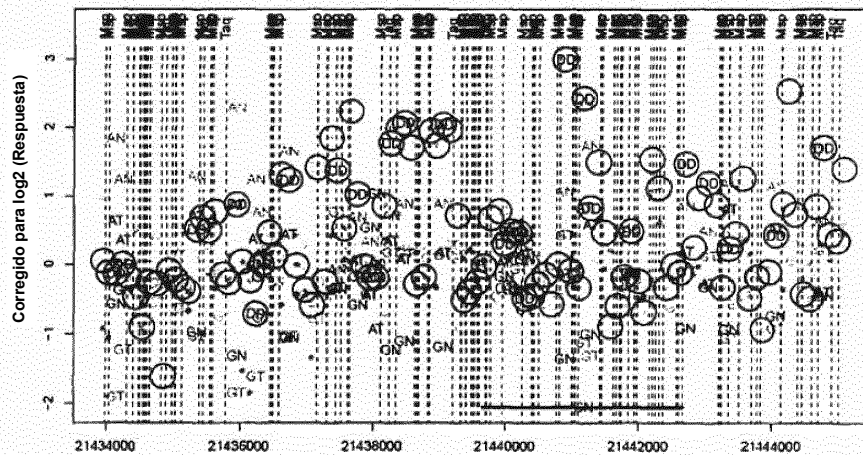


Figura 1(bb)

Conjunto de sondas = chr8:23618420-23622307, Gen = NKX2-6

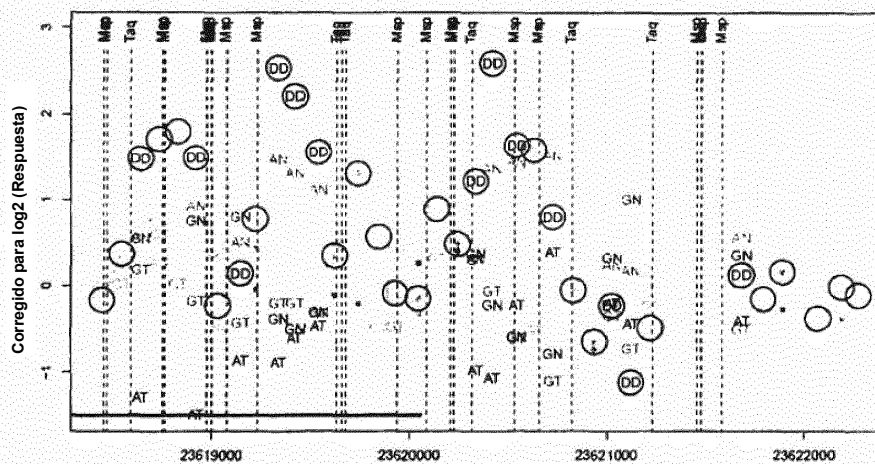


FIGURA 1 (cont.)

Figura 1(cc)

Conjunto de sondas = chr6:108591467-108597232, Gen = NR2E1

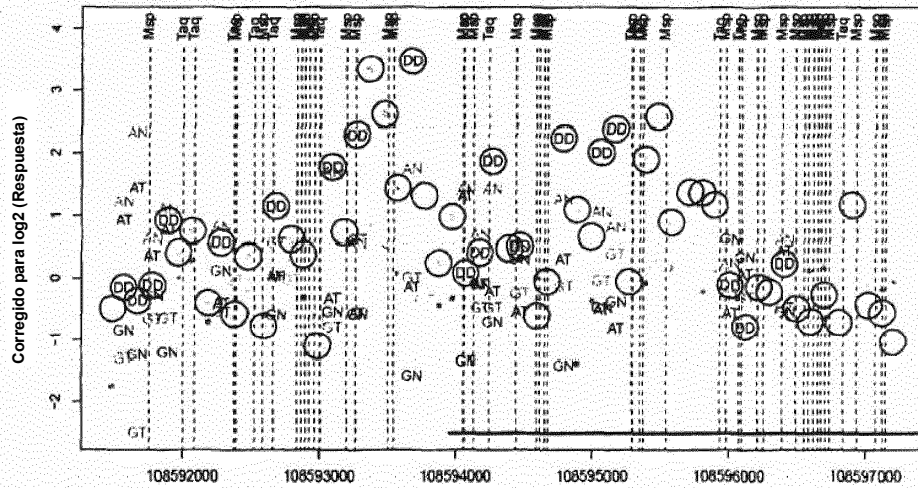


Figura 1(dd)

Conjunto de sondas = chr18:53251474-53259851, Gen = ONECUT2

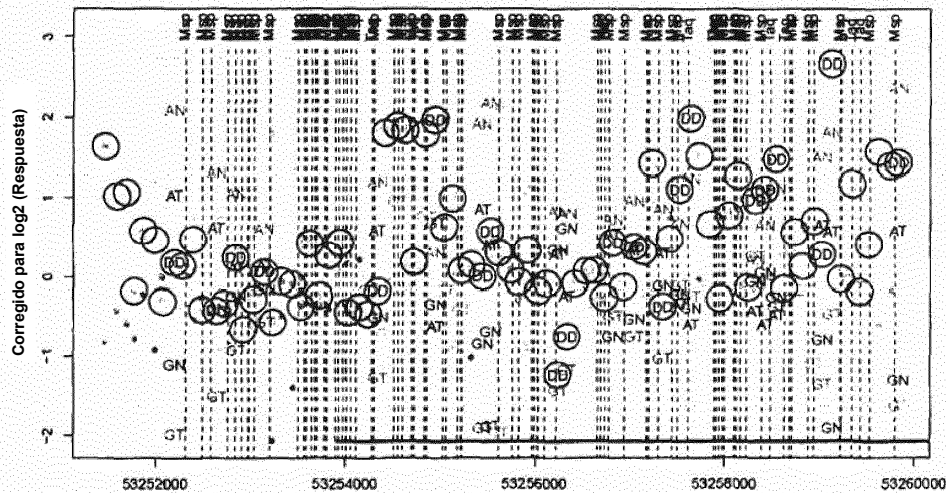


FIGURA 1 (cont.)

Figura 1(ee)

Conjunto de sondas = chr14:56341488-56349377, Gen = OTX2

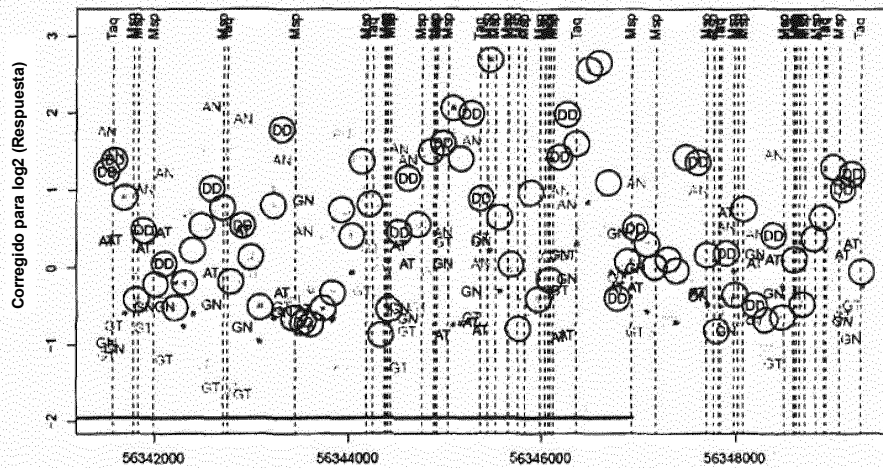


Figura 1(ff)

Conjunto de sondas = chr20:21631732-21636689, Gen = PAX1

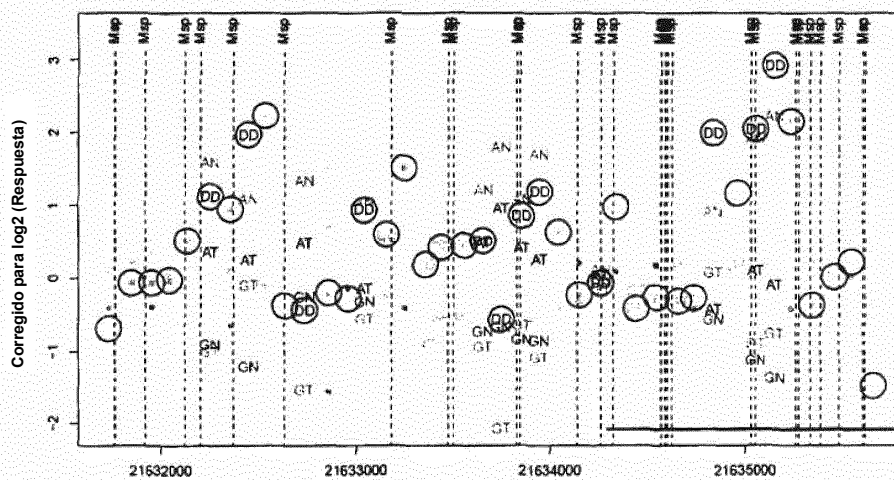


FIGURA 1 (cont.)

Figura 1(gg)

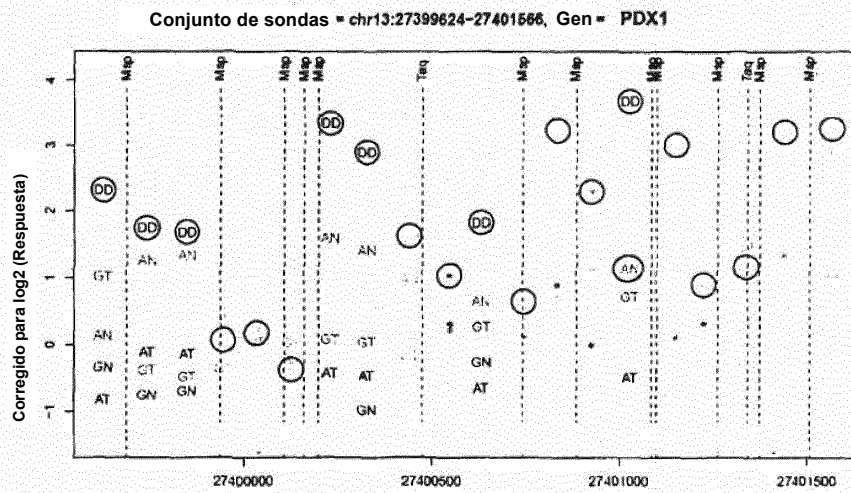


Figura 1(hh)

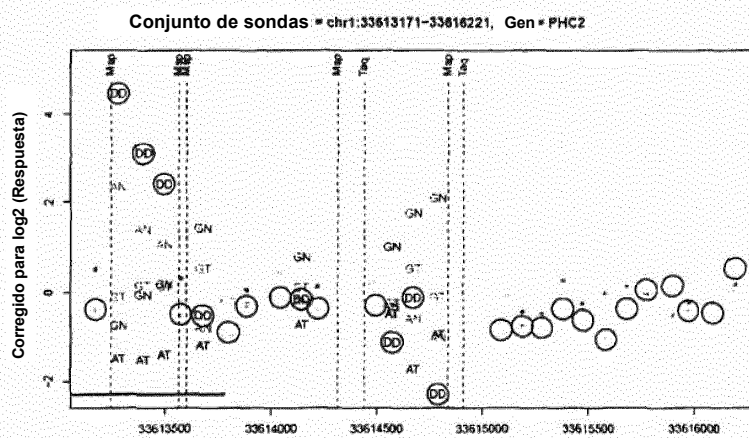


FIGURA 1 (cont.)

Figura 1(ii)

Conjunto de sondas = chr16:49741200-49746264, Gen = SALL1

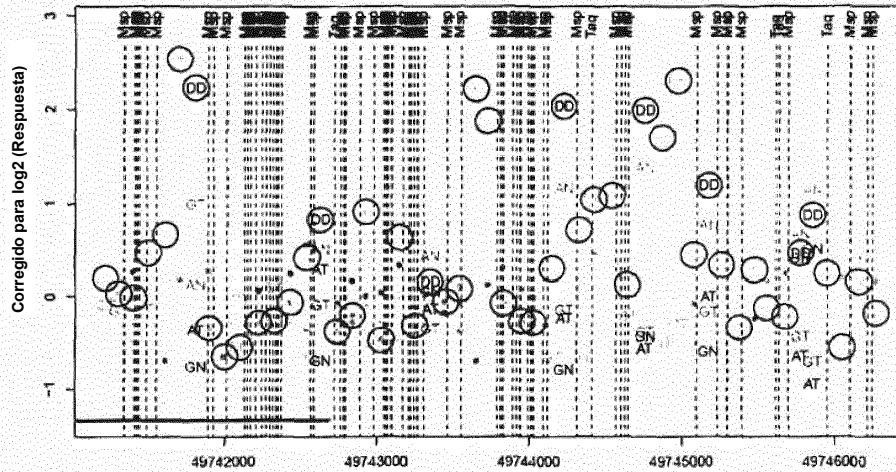


Figura 1(jj)

Conjunto de sondas = chr12:83829092-83833177, Gen = SLC6A15

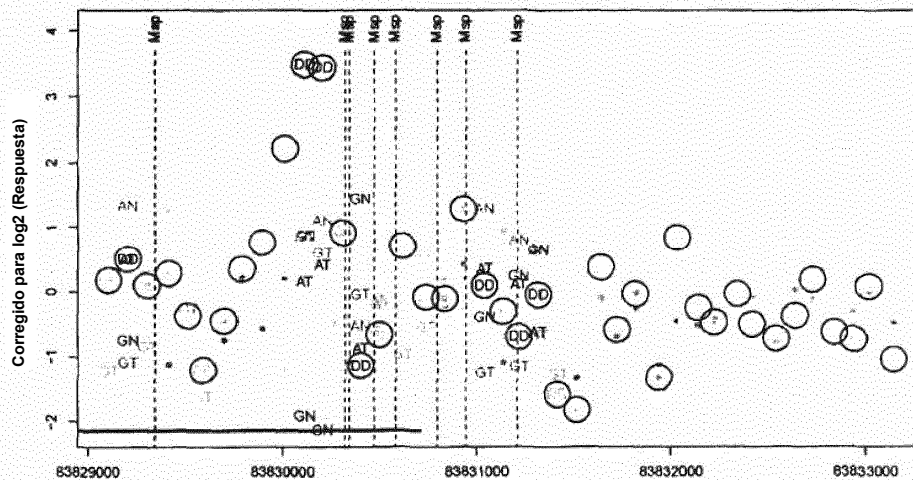


FIGURA 1 (cont.)

Figura 1(kk)

Conjunto de sondas = chr20:36784078-36790786, Gen = SLC32A1

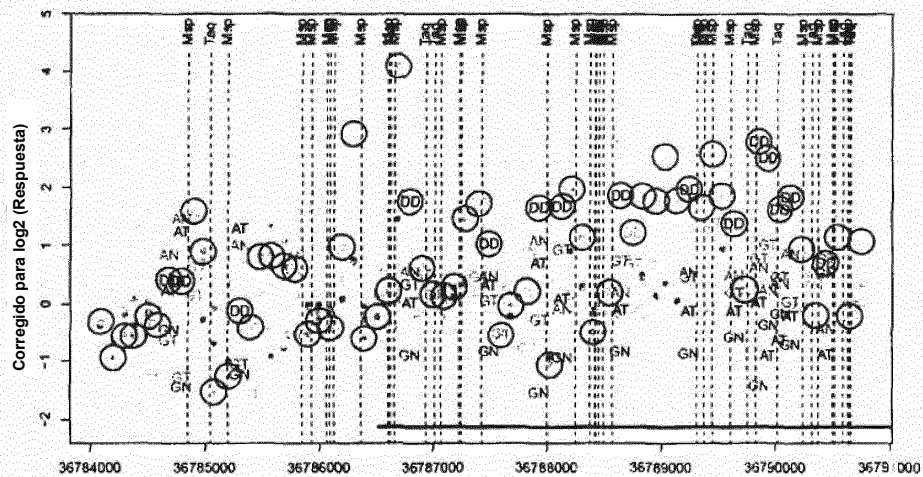


Figura 1(ll)

Conjunto de sondas = chr8:141177019-141180166, Gen TRAPPC9

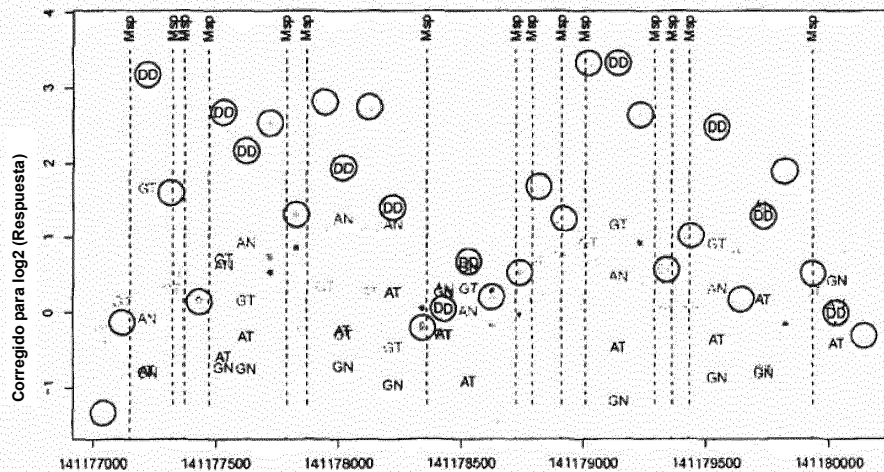


FIGURA 1 (cont.)

Figura 1(mm)

Conjunto de sondas = chr19:61708583-61711633, Gen = ZNF471

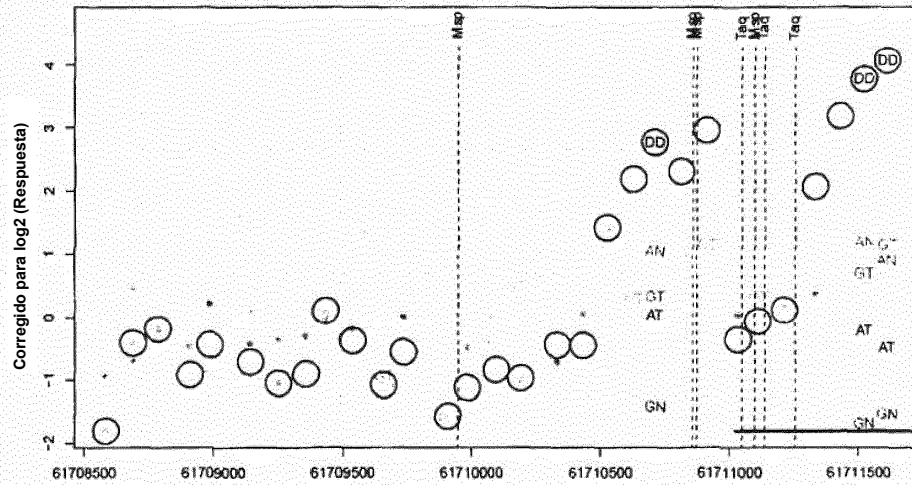


Figura 1(nn)

Conjunto de sondas = chr2:187421532-187424582, Gen = ZSWIM2

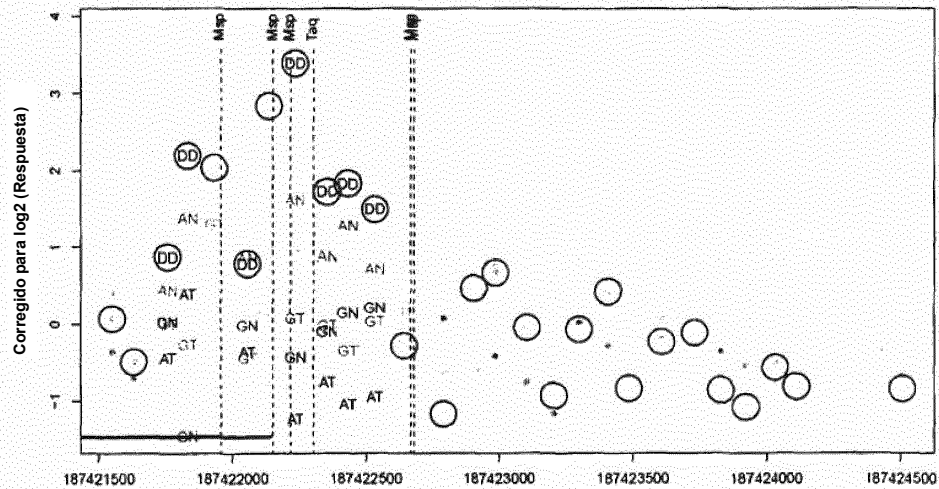


FIGURA 1 (cont.)

Figura 1(oo)

Conjunto de sondas = chr4:111758454-111759816, Gen = desconocido

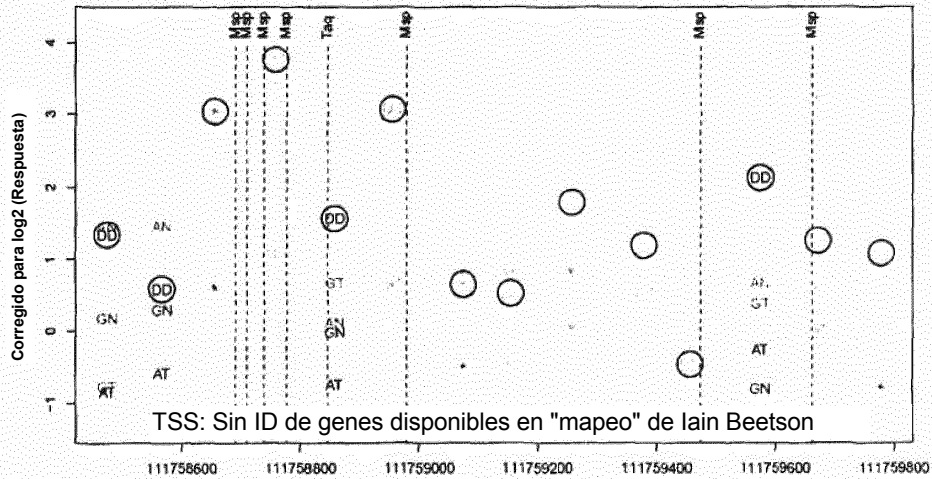


Figura 1(pp)

Conjunto de sondas = chr6:29629089-29629812, Gen = desconocido

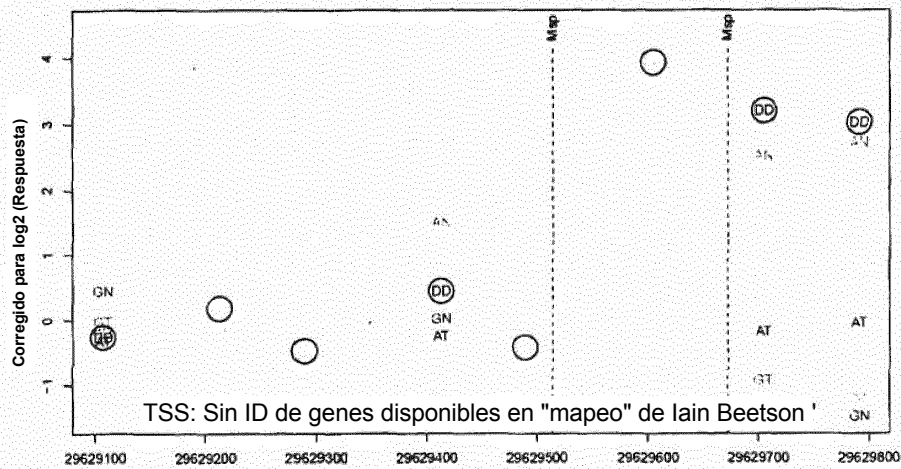


FIGURA 1 (cont.)

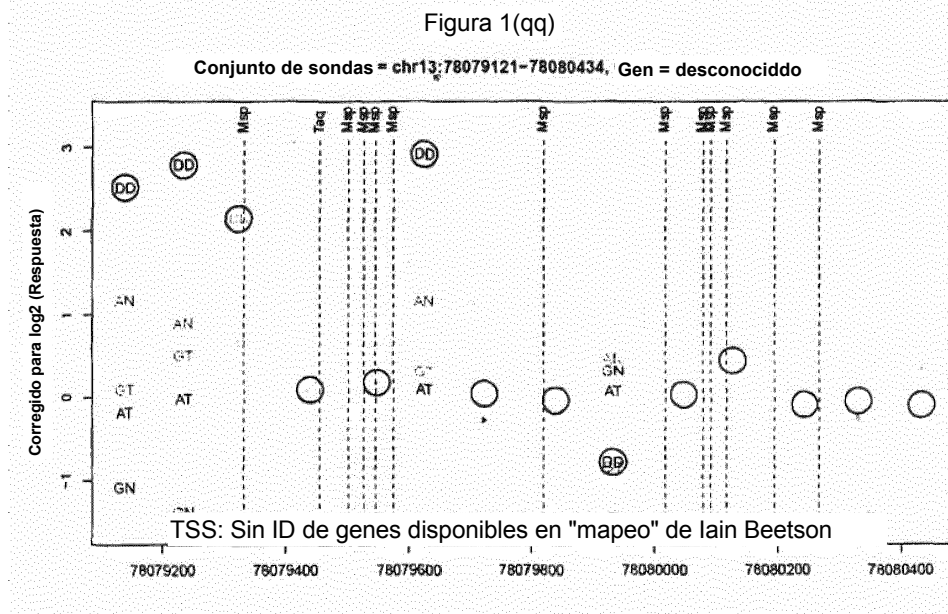


FIGURA 2

Figura 2(a)

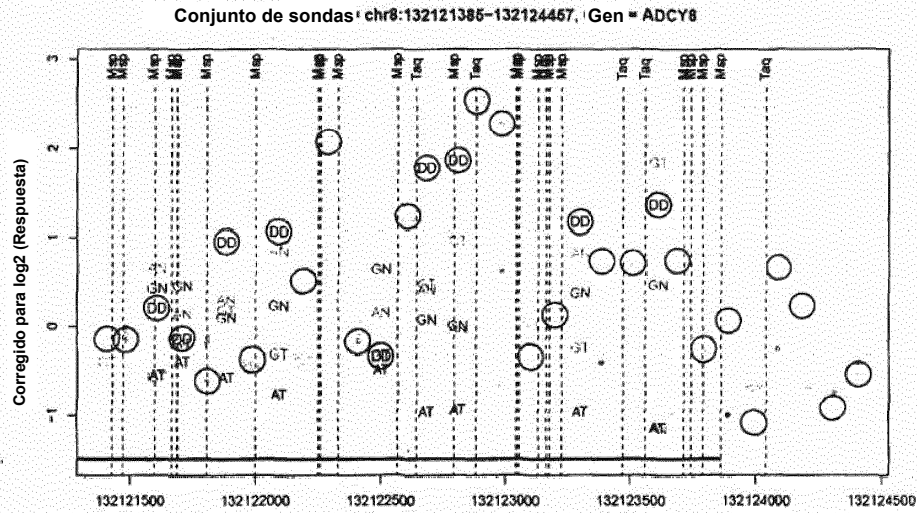


Figura 2(b)

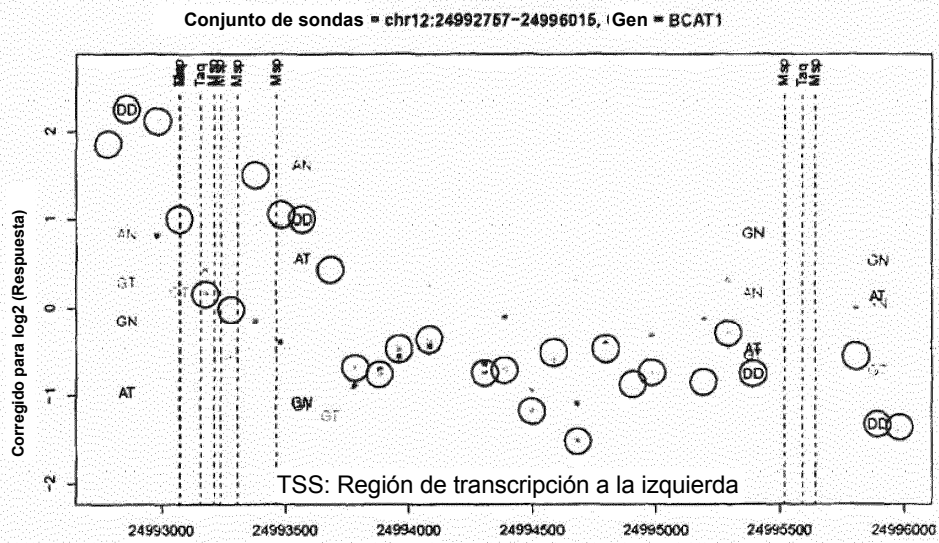


FIGURA 2 (cont.)

Figura 2(c)

Conjunto de sondas = chr3:130200721-130203932, Gen = CCDC48

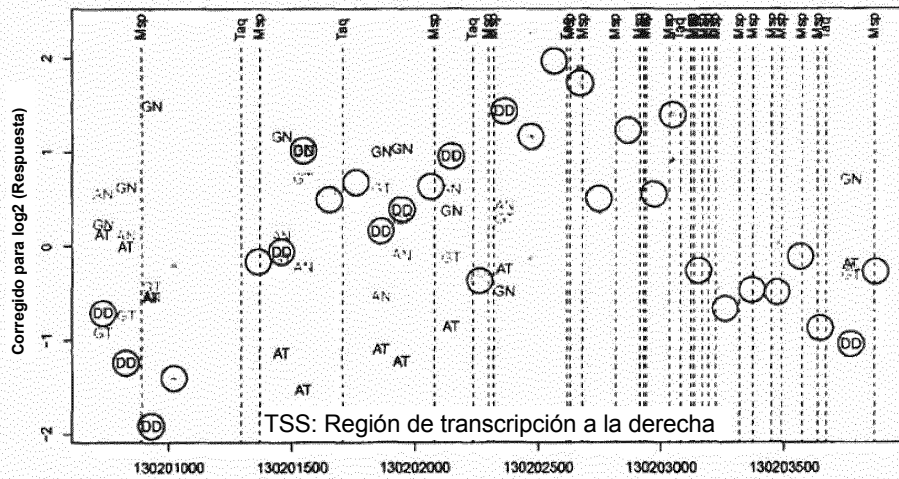


Figura 2(d)

Conjunto de sondas = chrX:21300460-21303610, Gen = CNKSR2

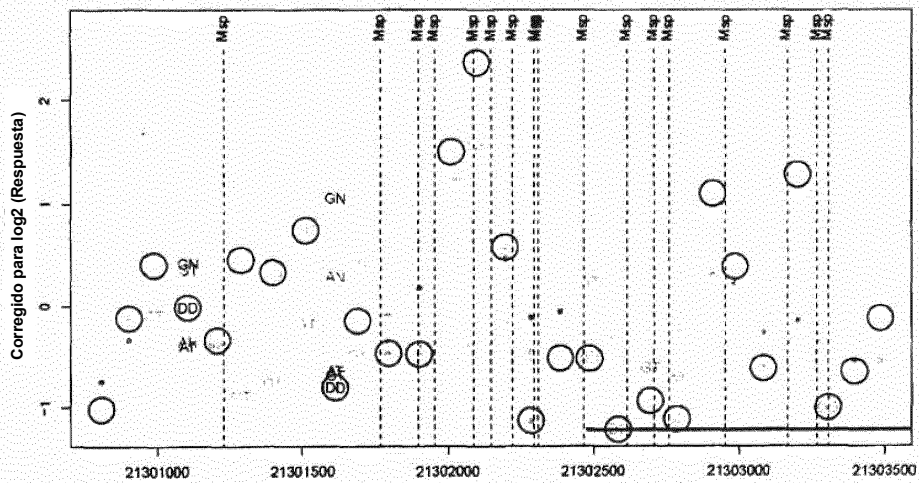


FIGURA 2 (cont.)

Figura 2(e)

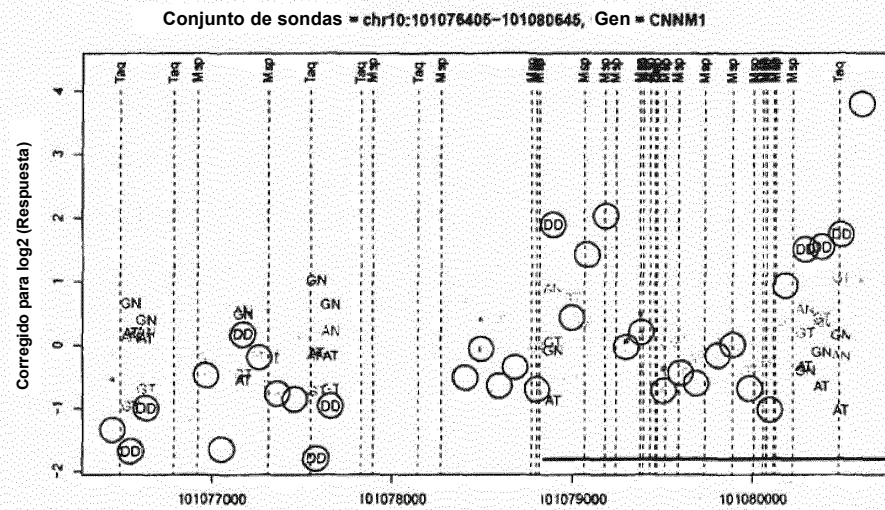


Figura 2(f)

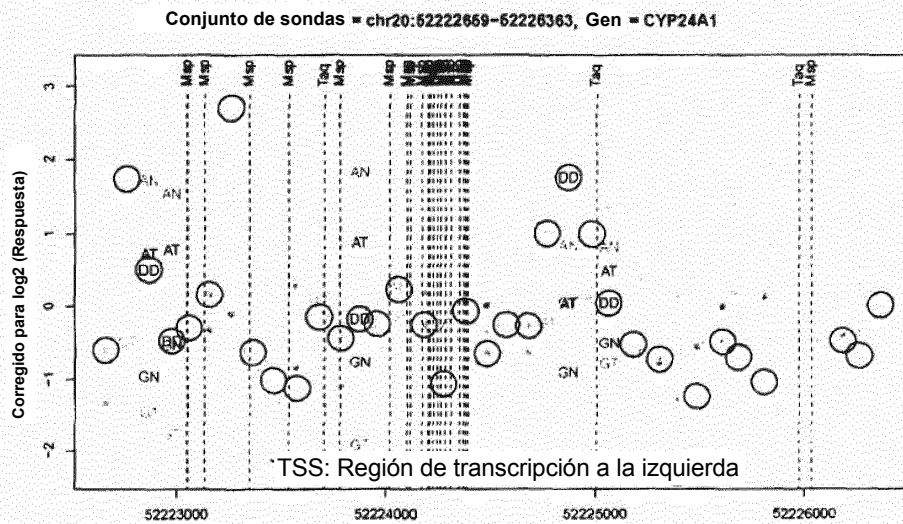


FIGURA 2 (cont.)

Figura 2(g)

Conjunto de sondas = chr7:27246248-27249661, Gen = EVX1

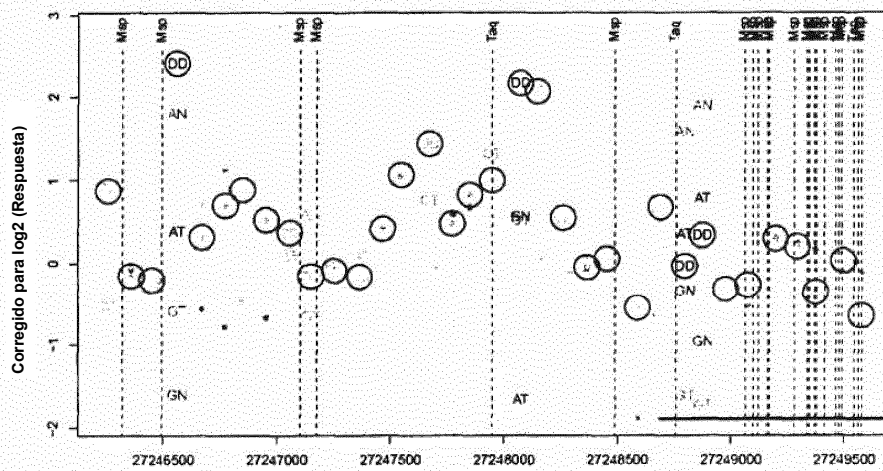
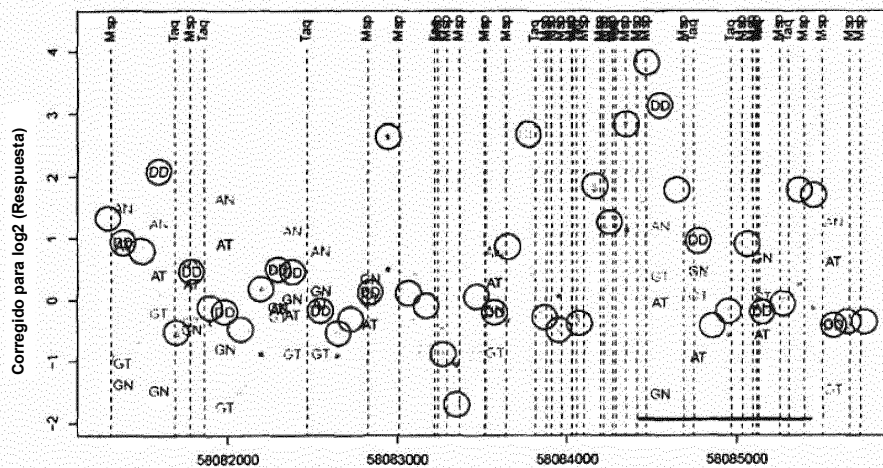


Figura 2(h)

Conjunto de sondas = chr15:58081272-58085812, Gen = FOXB1



Conjunto de sondas = chr10:129423087-129427356, Gen = FOXI2,BC132944

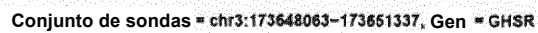


FIGURA 2 (cont.)

Figura 2(k)

Conjunto de sondas = chr12:50684574-50687963, Gen = GRASP

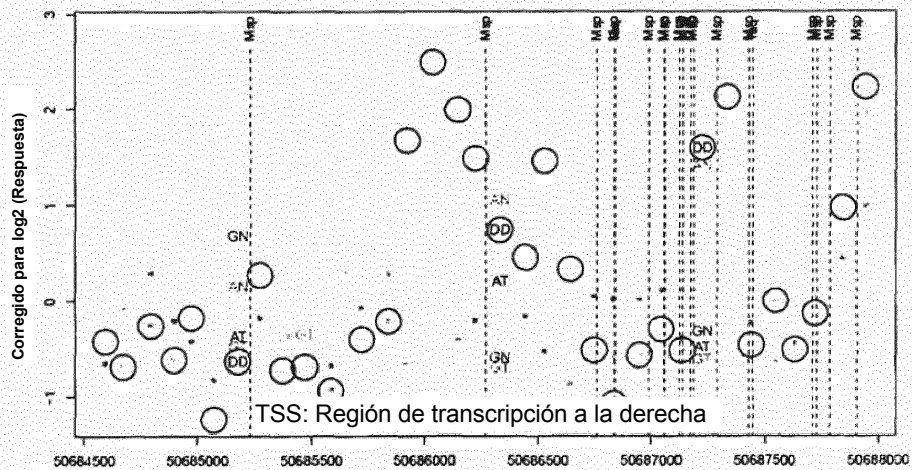


Figura 2(l)

Conjunto de sondas = chr13:27261856-27266505, Gen = GSX1

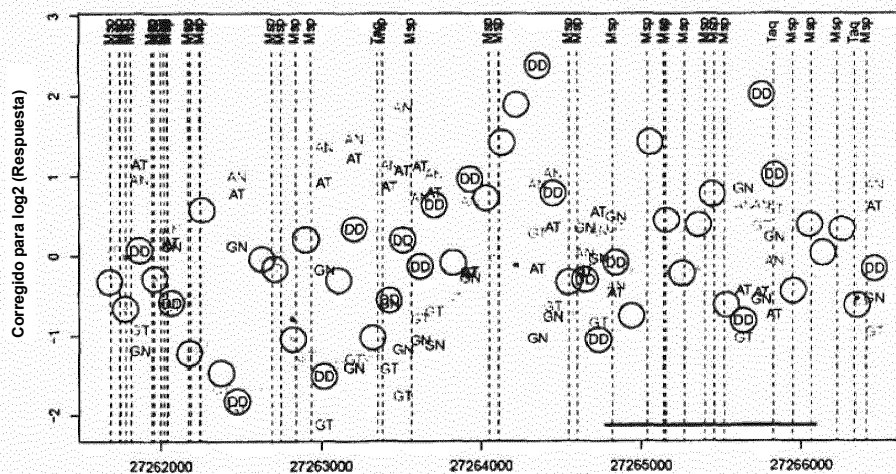


FIGURA 2 (cont.)

Figura 2(m)

Conjunto de sondas = chr19:54031135-54034186, Gen = HSD17B14, UNQ502

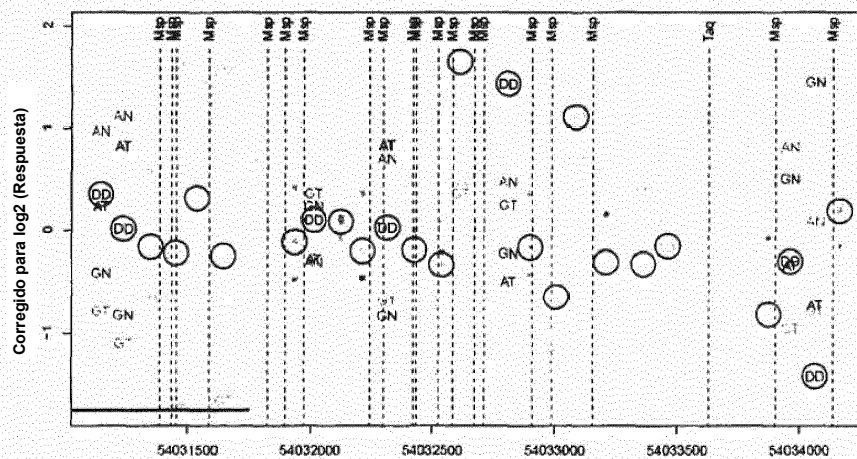


Figura 2(n)

Conjunto de sondas = chr7:50312483-50315533, Gen = IKZF1.ZNFN1A1

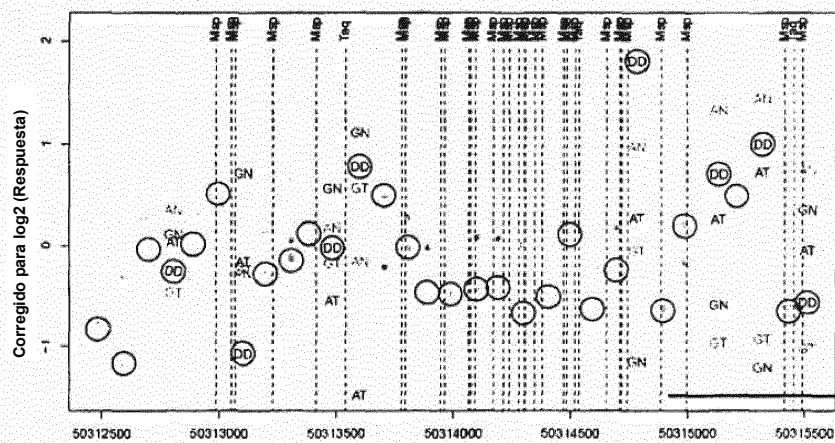


FIGURA 2 (cont.)

Figura 2(o)

Conjunto de sondas = chr6:334311-338790, Gen = IRF4

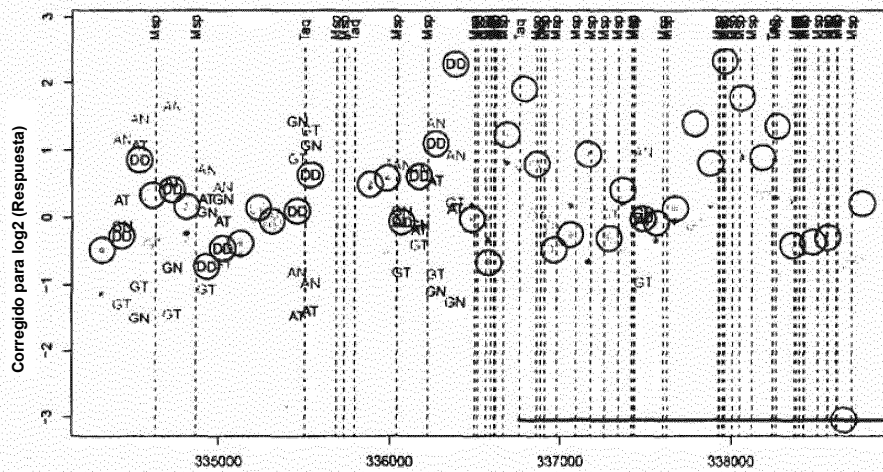


Figura 2(p)

Conjunto de sondas = chr7:149040640-149043690, Gen = KRBA1, KIAA1862

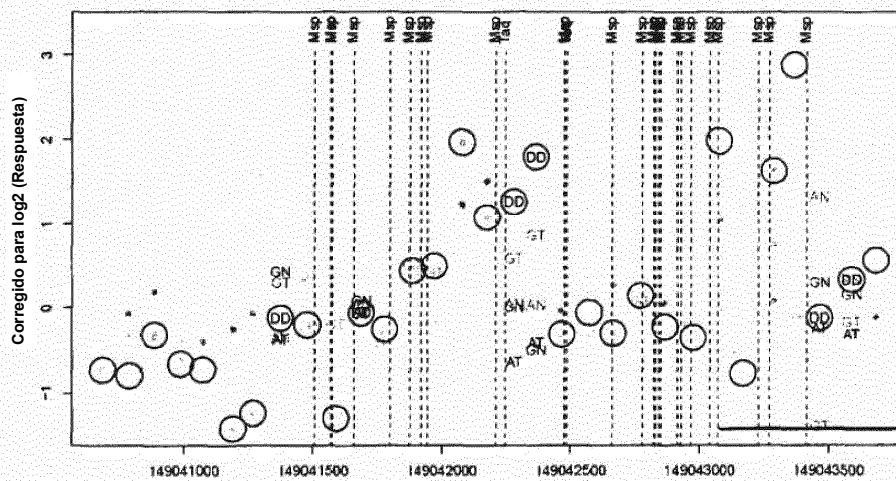


FIGURA 2 (cont.)

Figura 2(q)

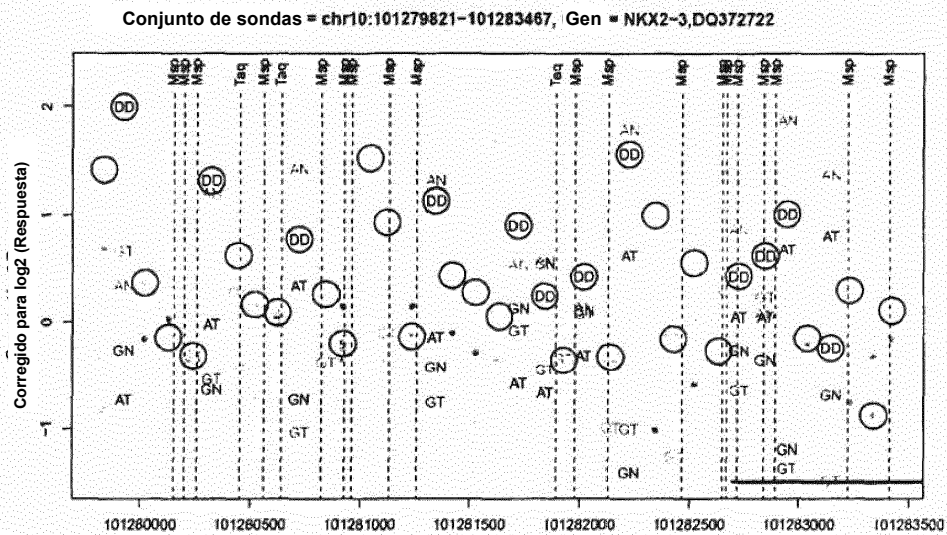


Figura 2(r)

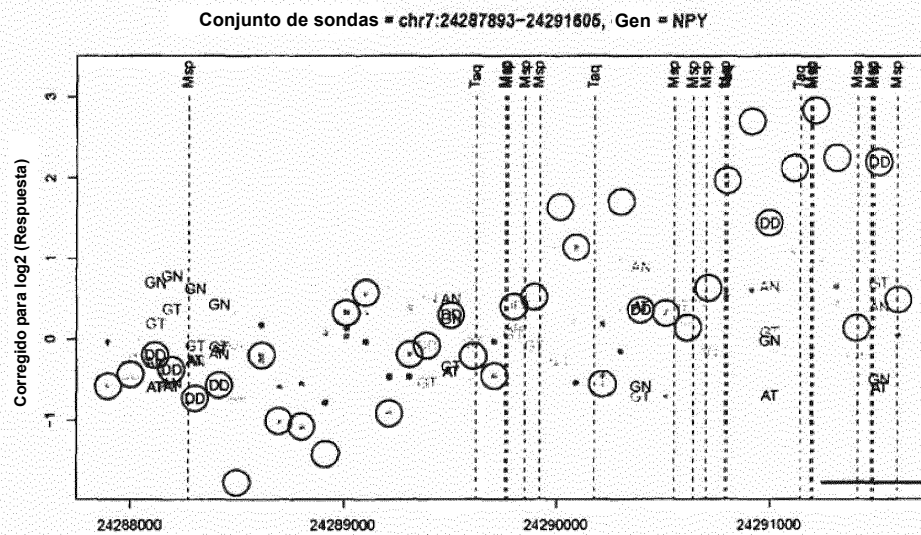


FIGURA 2 (cont.)

Figura 2(s)

Conjunto de sondas = chr4:4278912-4281962, Gen = OTOP1

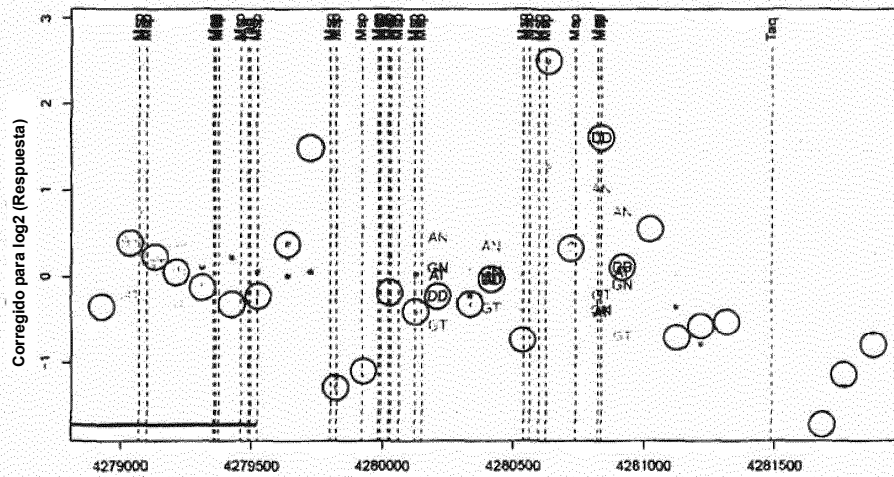


Figura 2(t)

Conjunto de sondas = chr4:30327951-30333940, Gen = PCDH7

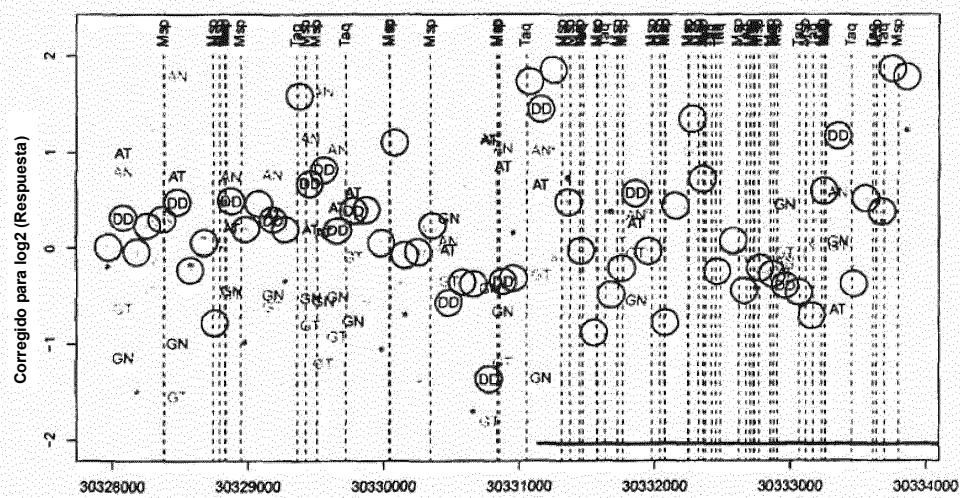


FIGURA 2 (cont.)

Figura 2(u)

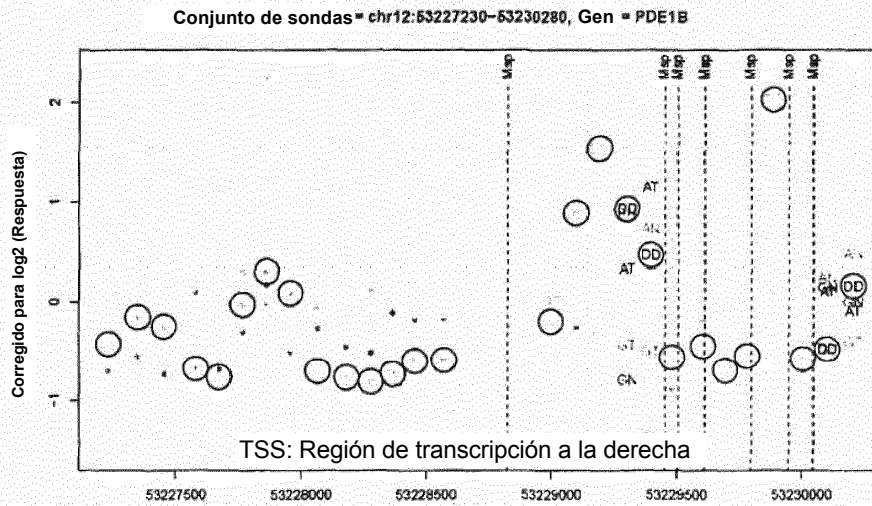
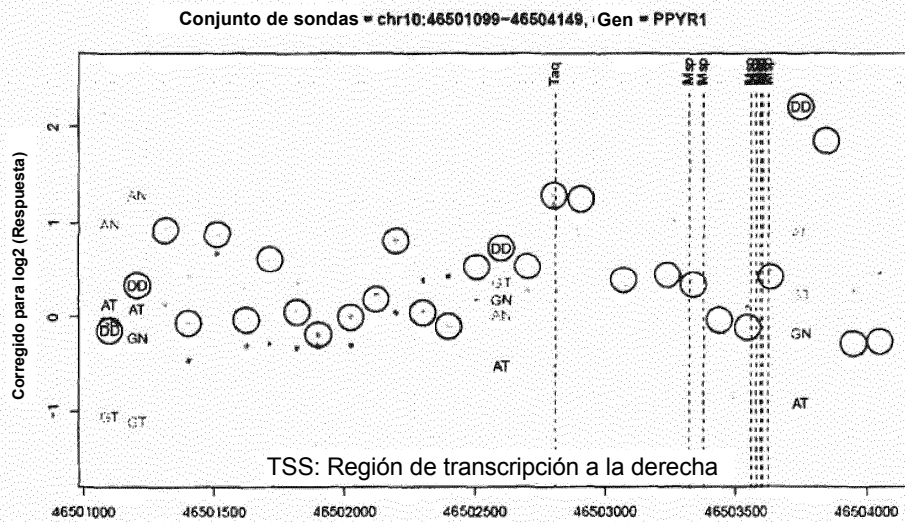


Figura 2(v)



Conjunto de sondas = chr12:22378102-22381355, Gen = ST8SIA1

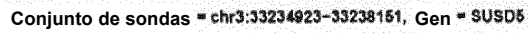
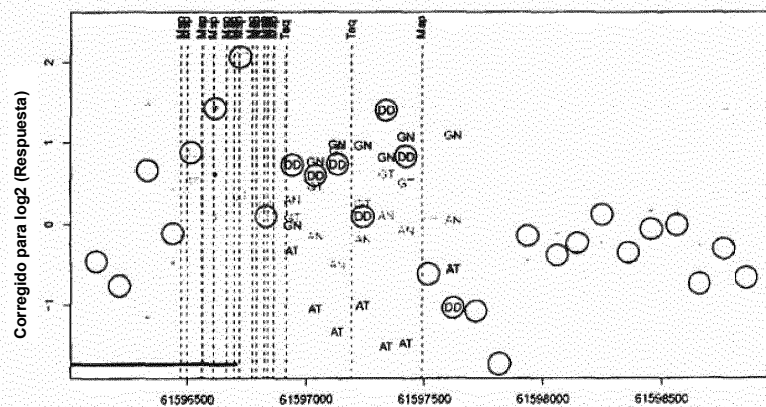


FIGURA 2 (cont.)

Figura 2(aa)

Conjunto de sondas = chr19:61596091-61599141, Gen = ZNF582.BC040939,BC036928



Metilación media por sitio

ADAMTSF1R1

Posición metilada

Nota: El rango intercuartil está sombreado, la metilación de la sangre arterial se indica con una línea de trazos

Metilación media por sitio

ADAMTSF2R2

Posición metilada

Nota: El rango intercuartil está sombreado, la metilación de la sangre arterial se indica con una línea de trazos

Metilación media por sitio

ADAMTSF3R3

Posición metilada

Nota: El rango intercuartil está sombreado, la metilación de la sangre arterial se indica con una línea de trazos

gtagcagcacttgaactgctagggcgcctcaggaggagagctctctctcaccgctttctccctgcgcgcttctccagcccttctcccaacgcgcgttggggtaactagttacgcgcaggggctggggcttcacagggagggatctctcctt

>ADAMTSF2R2

cggatagggtgacaggagcgcgaattccagagcataggagggaattcttcttc
ttcgaaagaatttgctctccagcttgtcttctcacagagctgcagagcttagcagc
cgcgaagaagcagagagacacwtlctaaccttggccagcagcgttgcctgac
gggggggaagagaggaatactgcttctctggaccctcttctctacaggagaaa

[illegible]

ADAMT51  Genes RefSeq
U138 22466 1 al. Alineamientos de Mifmetrix Consenso Ilustrativos de HG-U133
Is la CGC Las Islas - 300 Bases son de Color Verde Claro
C₁C₂ 15 2
C₁C₂ 15 2
Secuencia de la Biblioteca Blat ADAMT51F21
ADAMT51F11

FIGURA 4

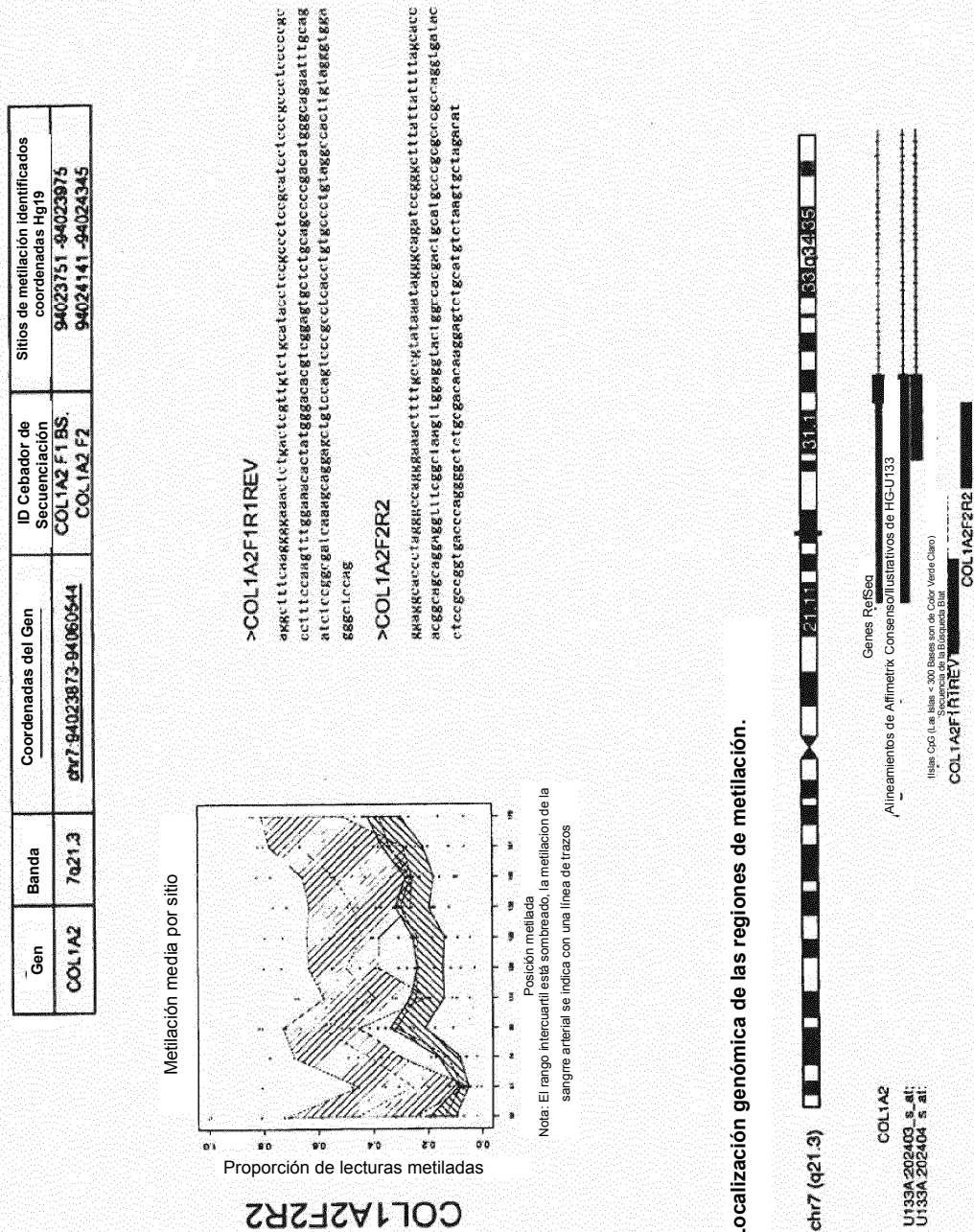
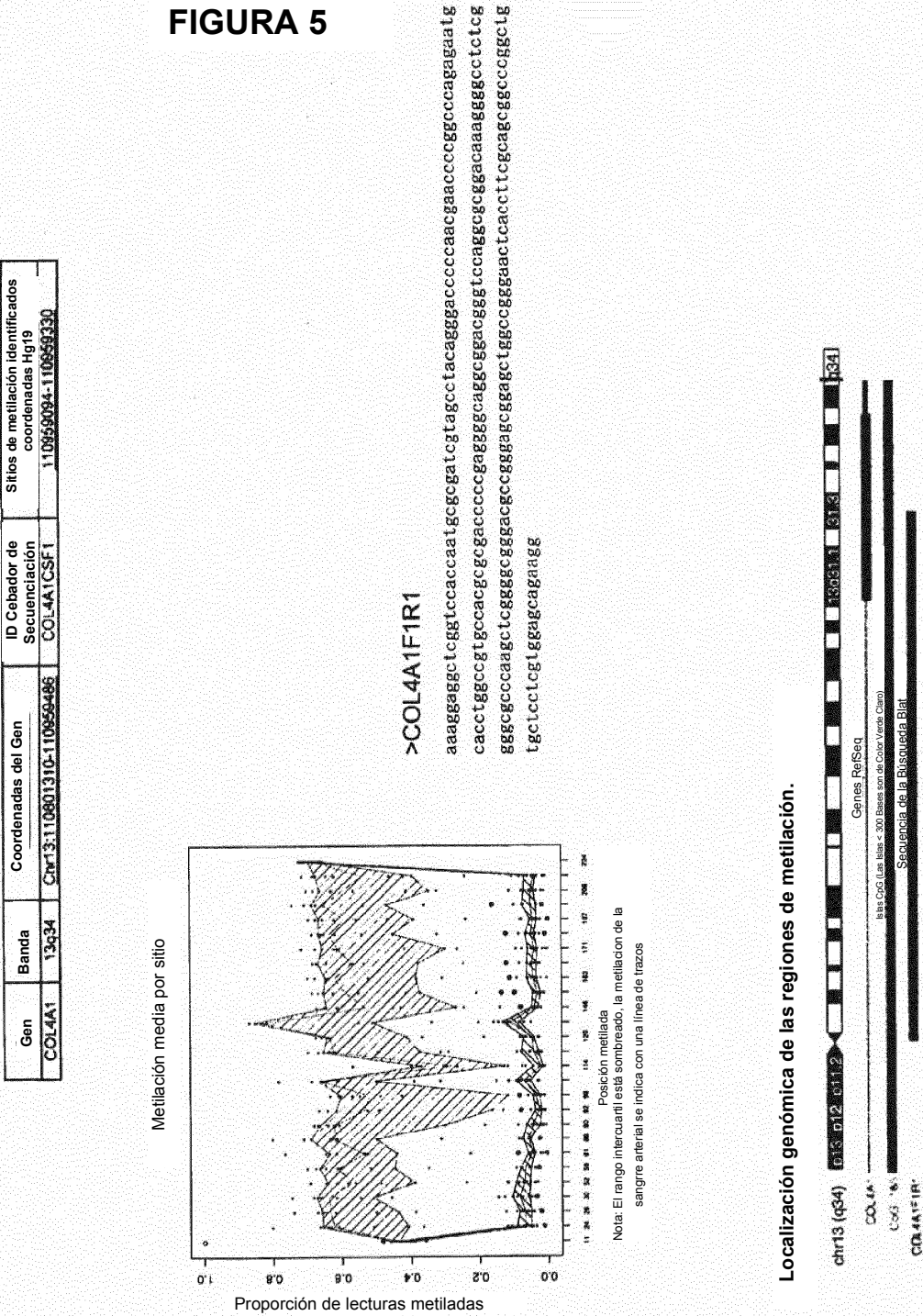
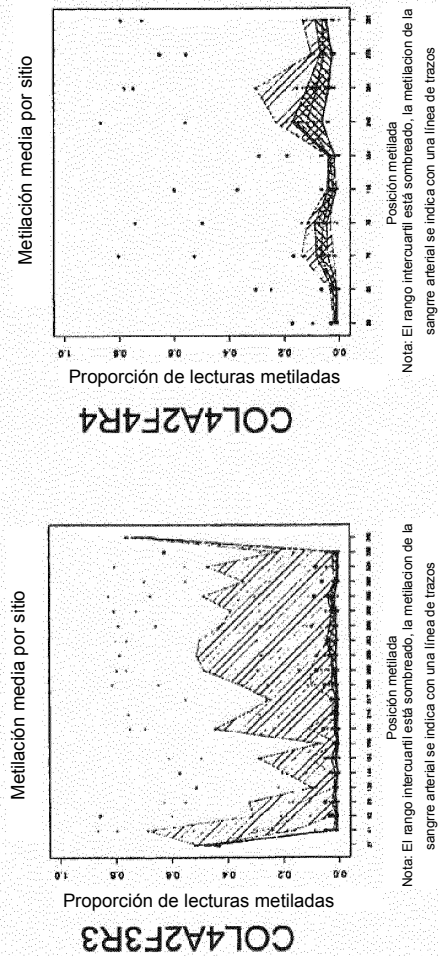


FIGURA 5



Localización genómica de las regiones de metilación.

Gen	Banda	Coordenadas del Gen	ID Cebador de Secuenciación	Sitios de metilación identificados coordenados Hg19
COL4A2	13q34	chr13:110959631-111165373	COL4A2CSF3 COL4A2CSF4 COL4A2Reg5	110980787-110981141 110961331-11096165 110959832-110960181



>COL4A2F3R3

>COL4A2F4R4

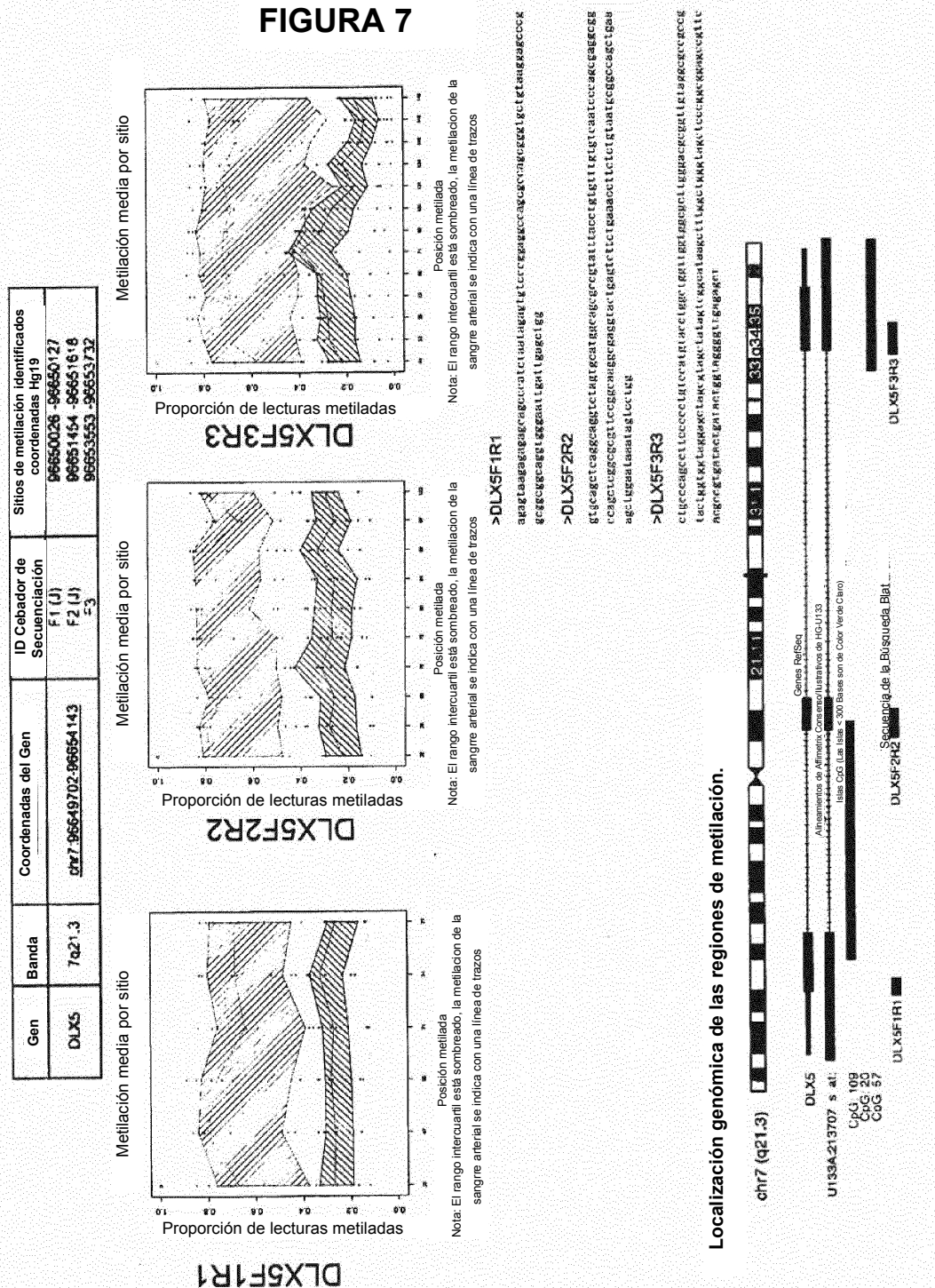
>COL4A2Req5

[illegible]

>COL4A2F-4R4

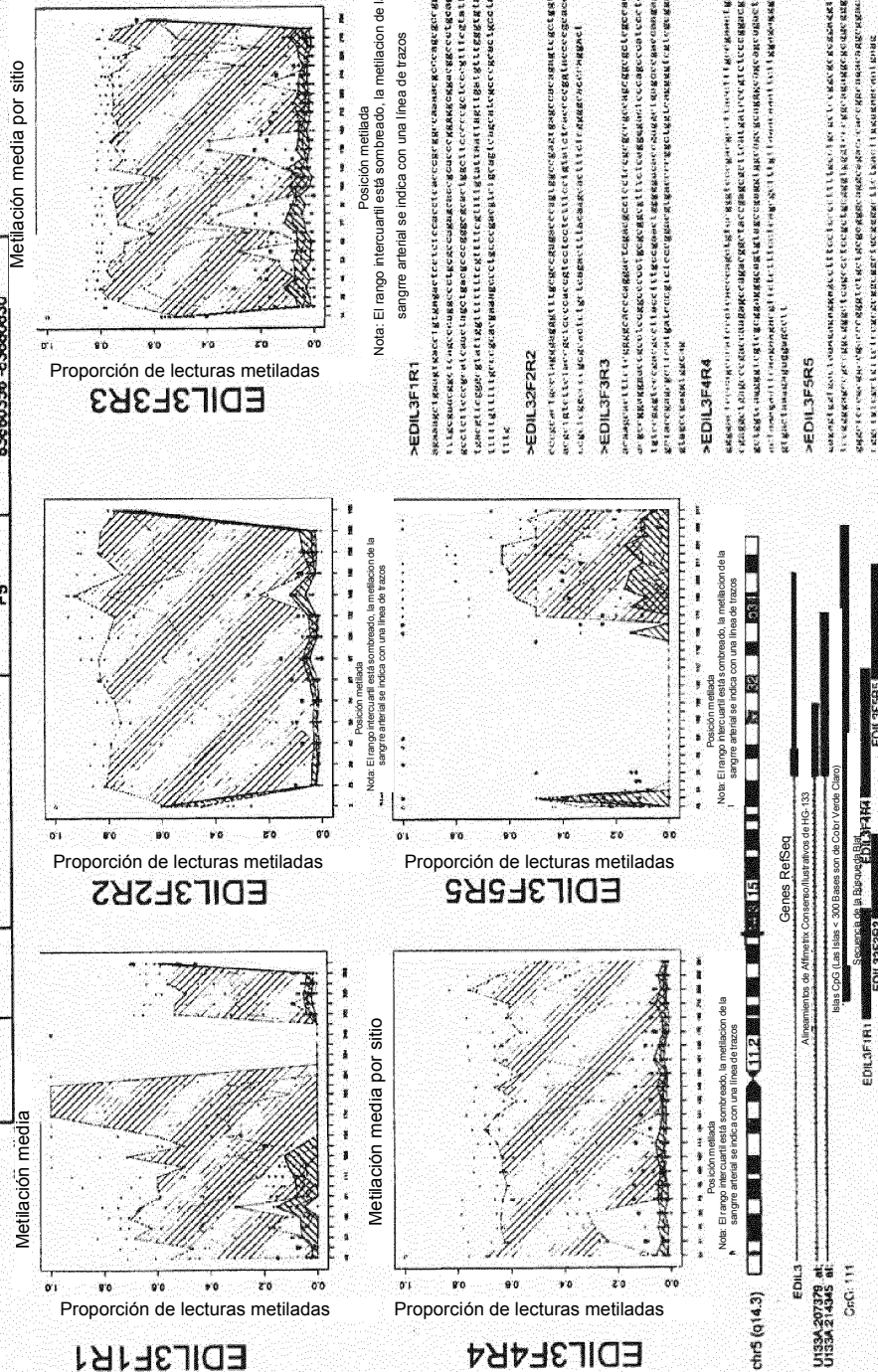
>COL4A2Reg5

Localización genómica de las regiones de metilación.



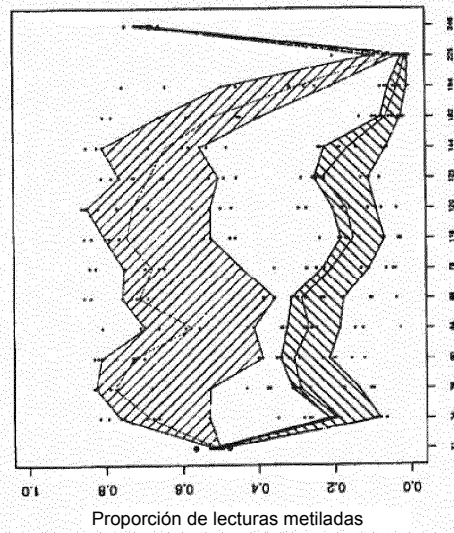
Metilación media por sitio

Gen	Banda	Coordenadas del Gen	ID Cebador de Secuenciación	Sitios de metilación identificados
EDL3	Sc14.3	chr5:83238126-8368061	F1	83679544-83679807
			F2	83679784-83679988
			F3	83679980-83680283
			F4	83680075-83680383
			F5	83680356-83680630



>EFEMP1F1R1

Gen	Banda	Coordenadas del Gen	ID Cebador de Secuenciación	Sitios de metilación identificados coordinados Hg19
EFEMP1	2p16.1	chr2:56093097-5615298	EFEMP1	56150355-56150606



Posición metilada

Nota: El rango intercuartil está sombreado, la metilación de la sangre arterial se indica con una línea de trazos

>EFEMP1F1R1

Ggtttcaggctgcctaggacacggaacacaggatcgacacgcagccccagggtacccagtttcggggggggcggc
ctggccggcagggagatgggtccctctttaa-cagcaagctaaacgcggcggtcccttggaagctgtcagcg
gtccagctttctaacagctctctatggaaacaggggcggtcttaattctgcacacgtgtcccttaaacatttcaaa
acacagtttatggggcaaaagccctgcggctg

Localización genómica de las regiones de metilación.

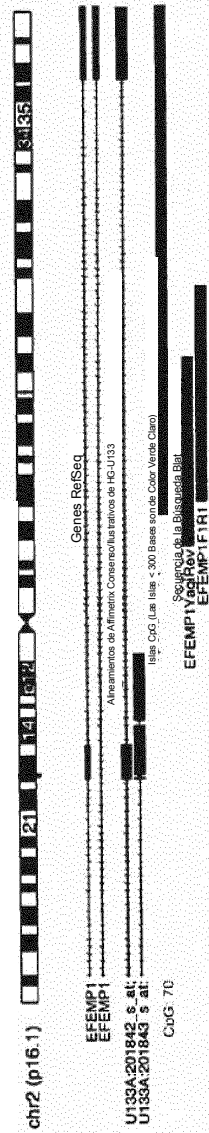


FIGURA 10

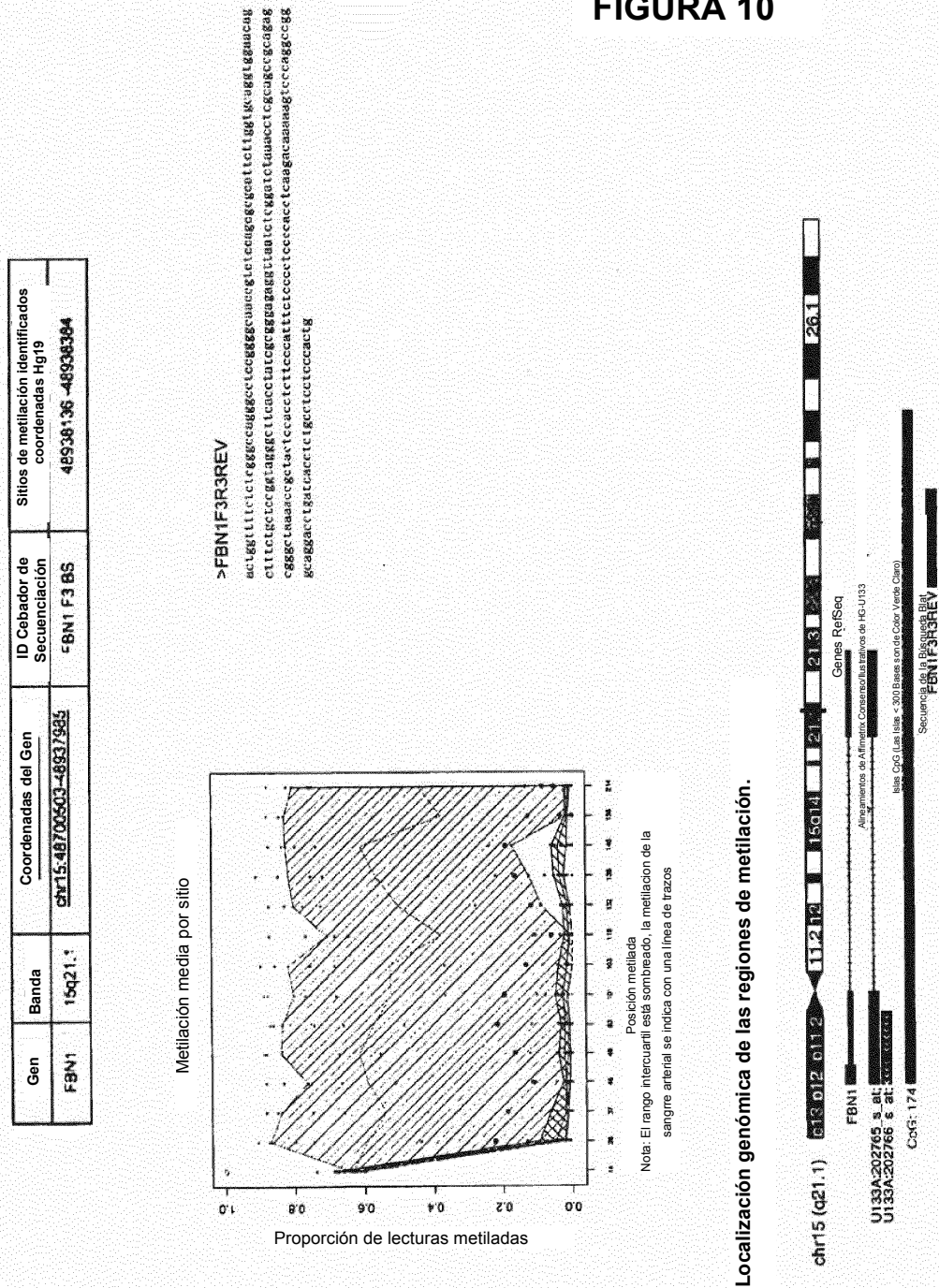
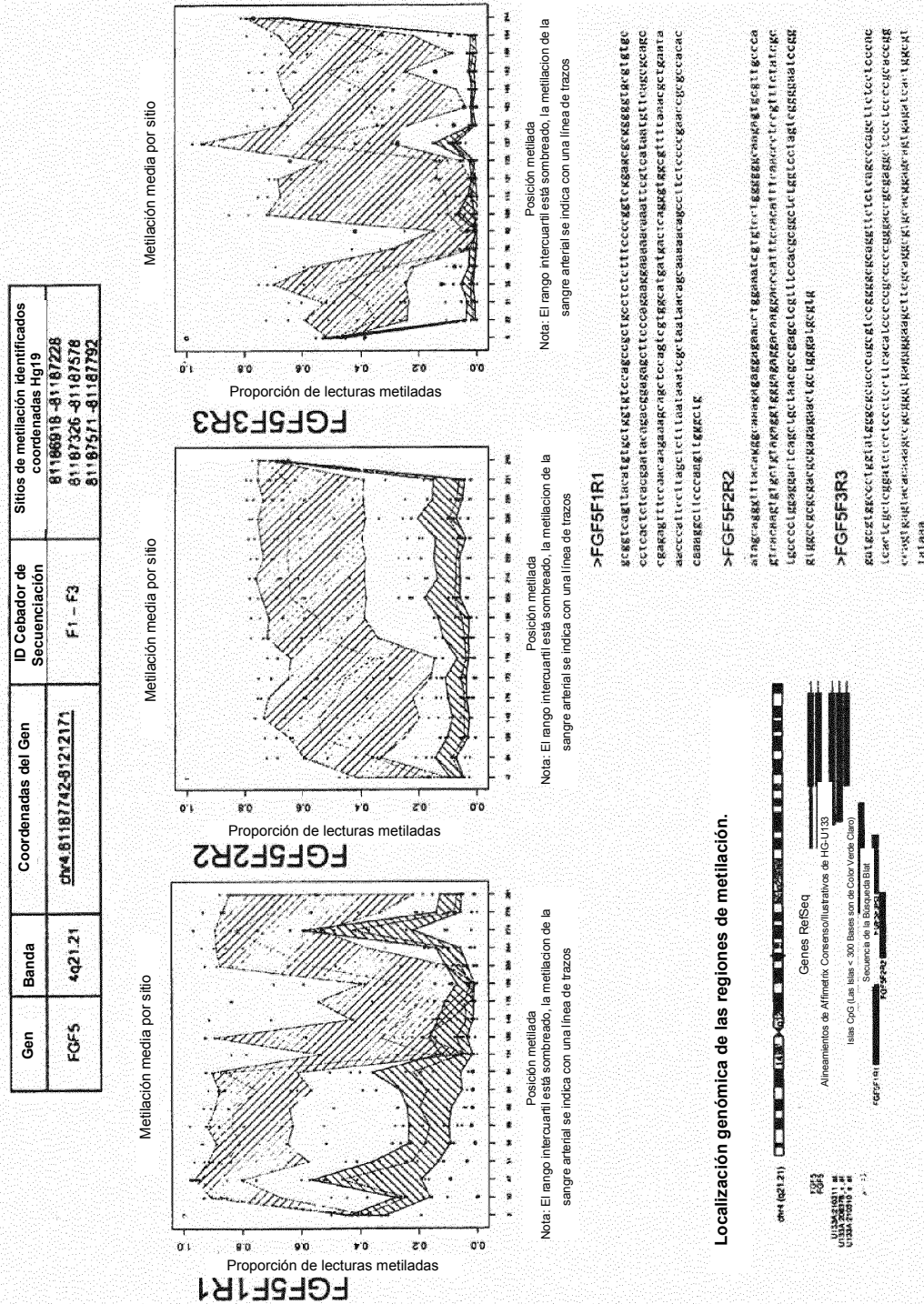


FIGURA 11



Localización genómica de las regiones de metilación.

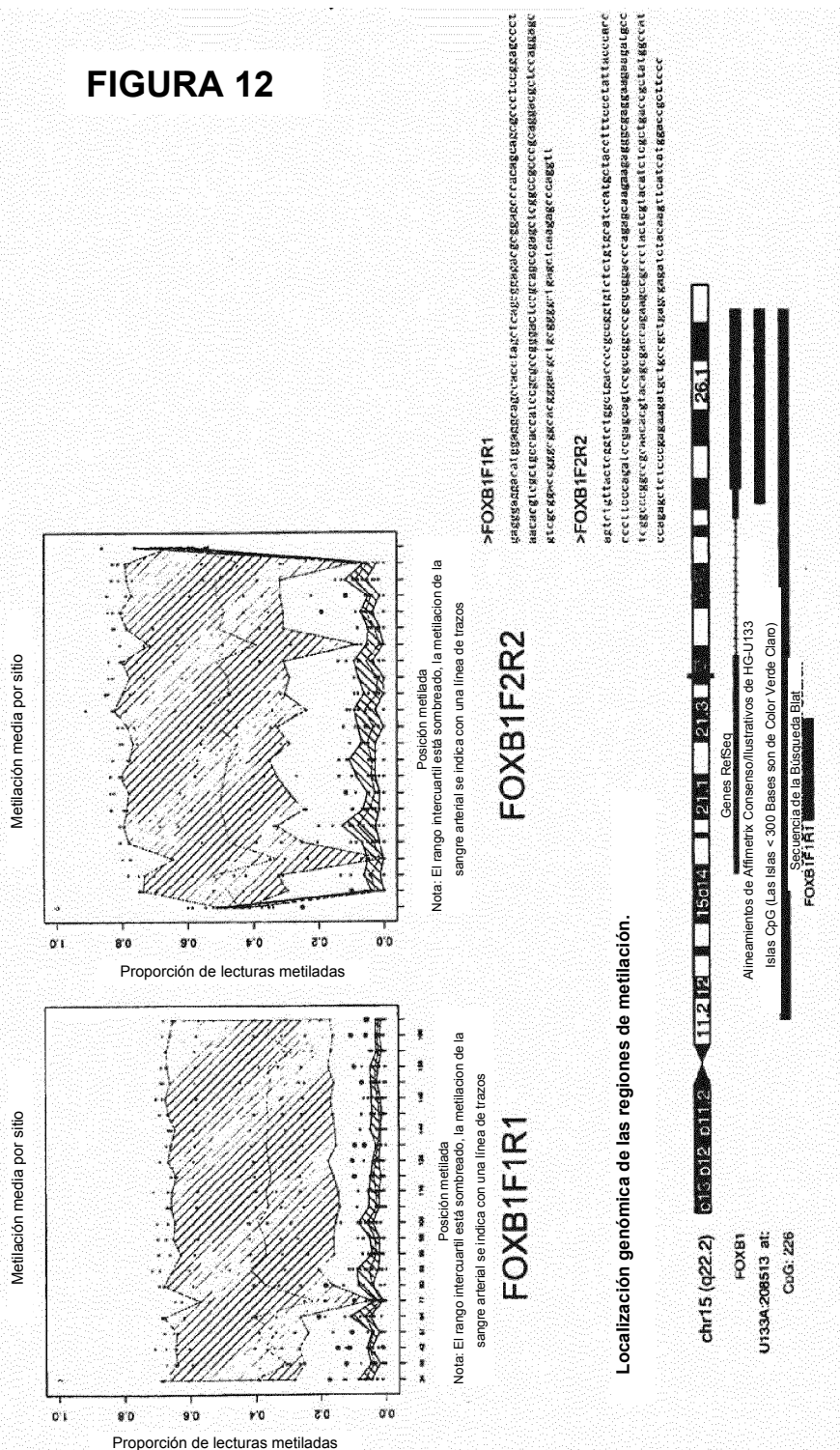
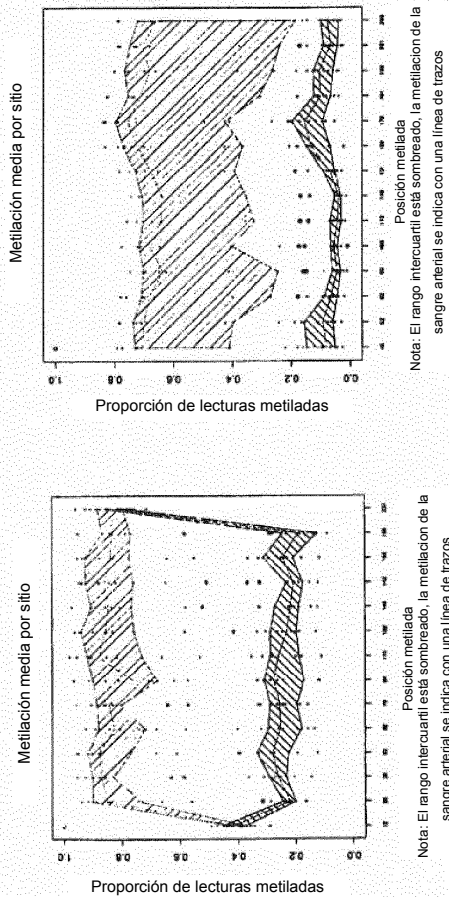


FIGURA 13

Gen	Banda	Coordenadas del Gen	ID Cebador de Secuenciación	Sitios de metilación identificados coordenadas Hg19
FOXO2	1p33	chr1:47901689-47906363	F1 (J) F2	47898091-47899337 47909944-47910172



Posición metilada

Posición metilada

FOXD2F2R2

FOXD2F1R1

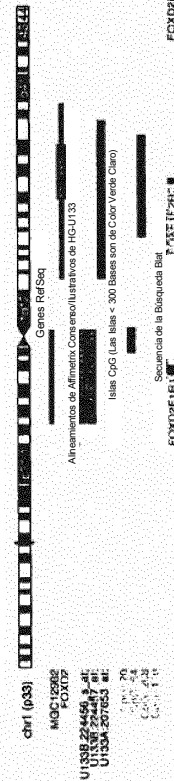
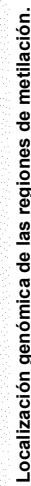
>FOXD2F1R1

ccctaccacatccaggaactctgcatcttcaggagccggggatctcaggaggcgtgttttcggctctctctc
gggtgtgcacccctctccacggagacacagccacaggctccgcagctcgccttggctctacacacagcgc
agctattgggttccttgcgcgactccctaccacatagtcctcatttggggccggggagatggggctgggag
gggacatctgcacaggatagcggagagaga

>FOXD2F2R2

[illegible]

PLATELYMPHOC



.....
 Secuencia de la Búsqueda Blat

100

Localización genómica de las regiones de metilación.

Gen	Banda	Coordenadas del Gen	ID Cebador de Secuenciación	Sitios de metilación identificados coordinados Hg19
GRASP	12a13.13	chr12:52400748-52409671	F1 F2 F3	52399872-52399822 52400821-52401119 52401407-52401854

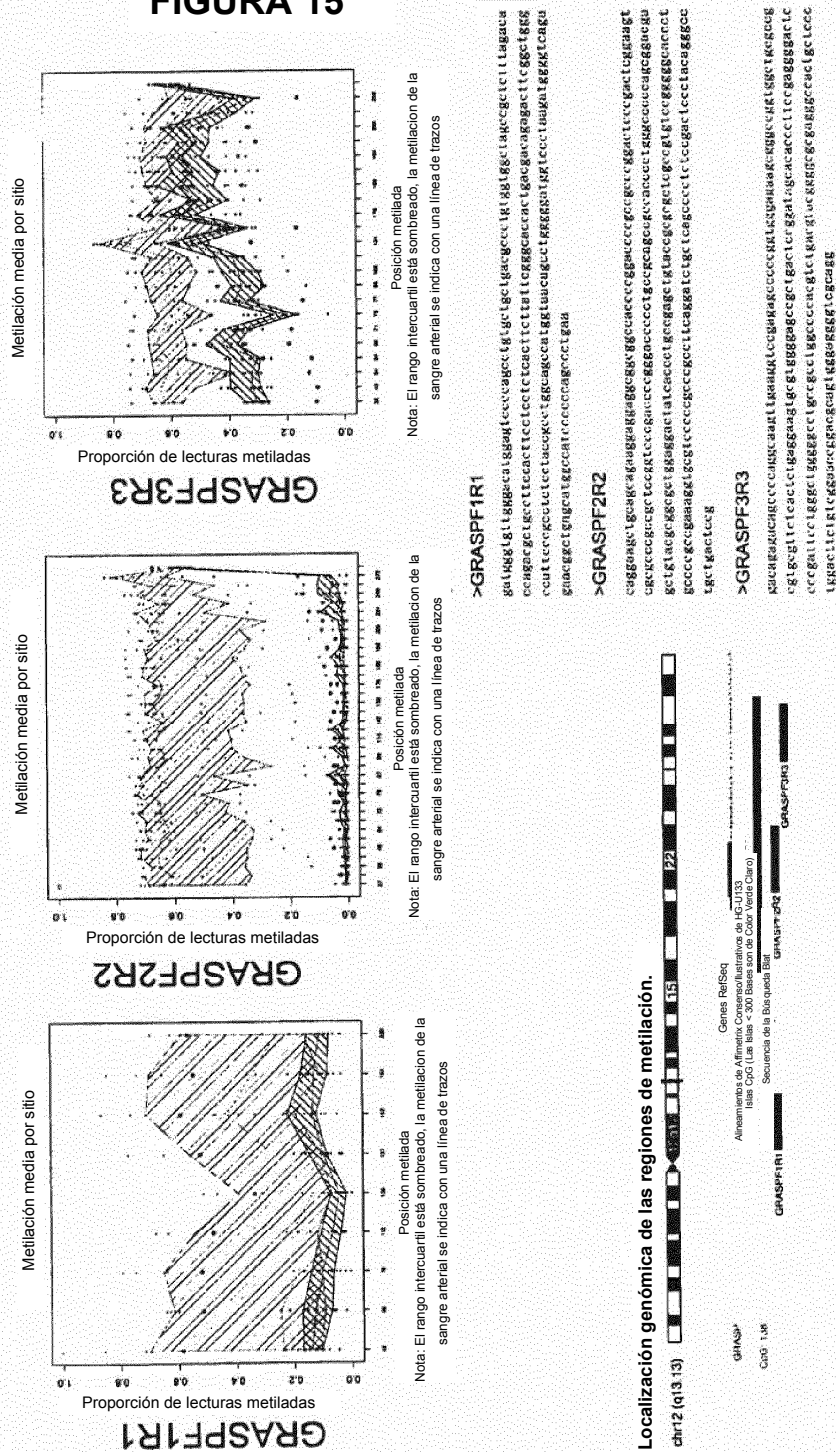


FIGURA 16

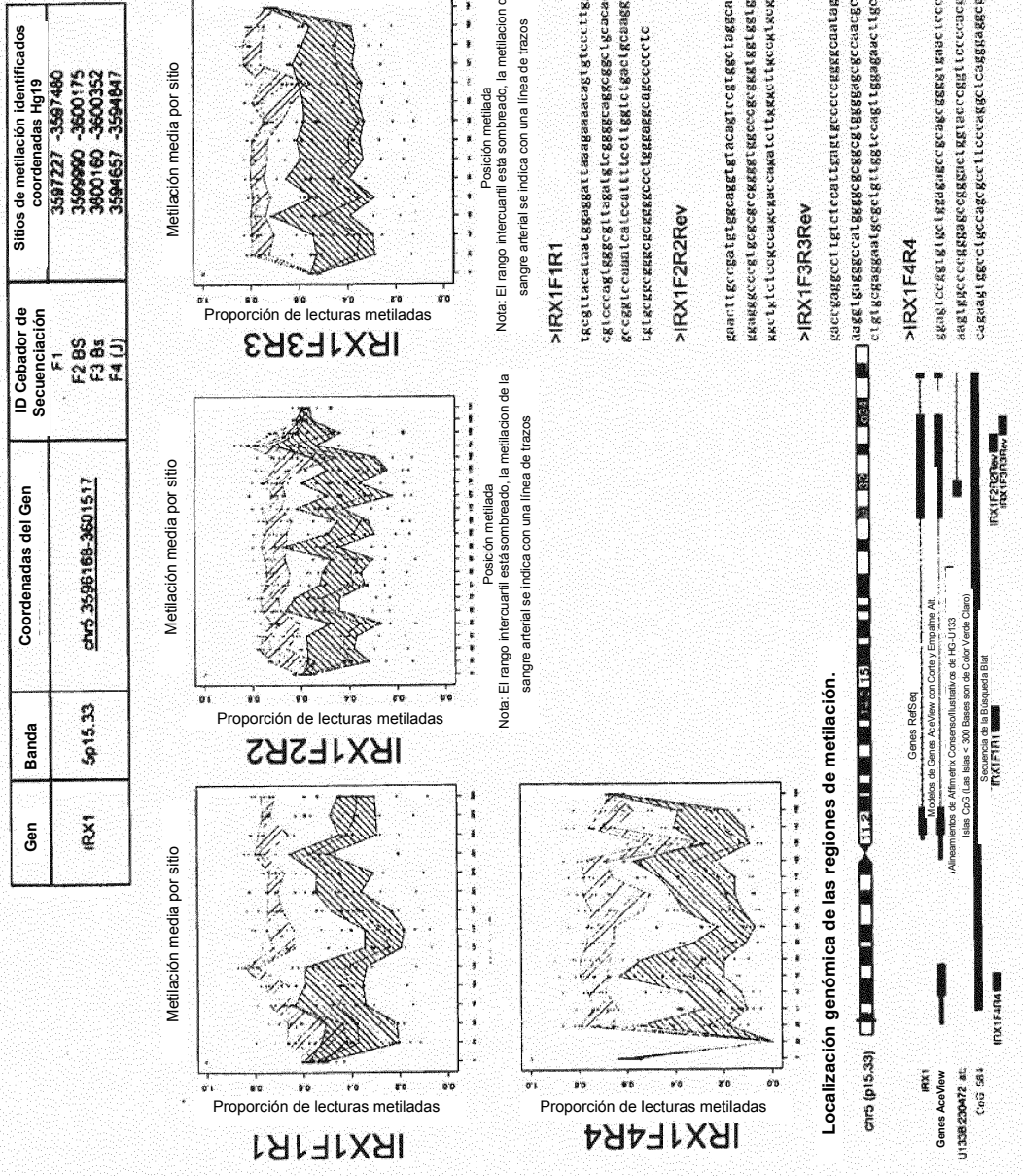


FIGURA 18

Gen	Banda	Coordenadas del Gen	ID Cebador de Secuenciación	Sitios de metilación identificados coordenadas Hg19
MNP2	19q12.2	chr16:55513081-55540566	MNP2 F1 BS. MNP2 F3	55312682-55512656 55513916-55514215

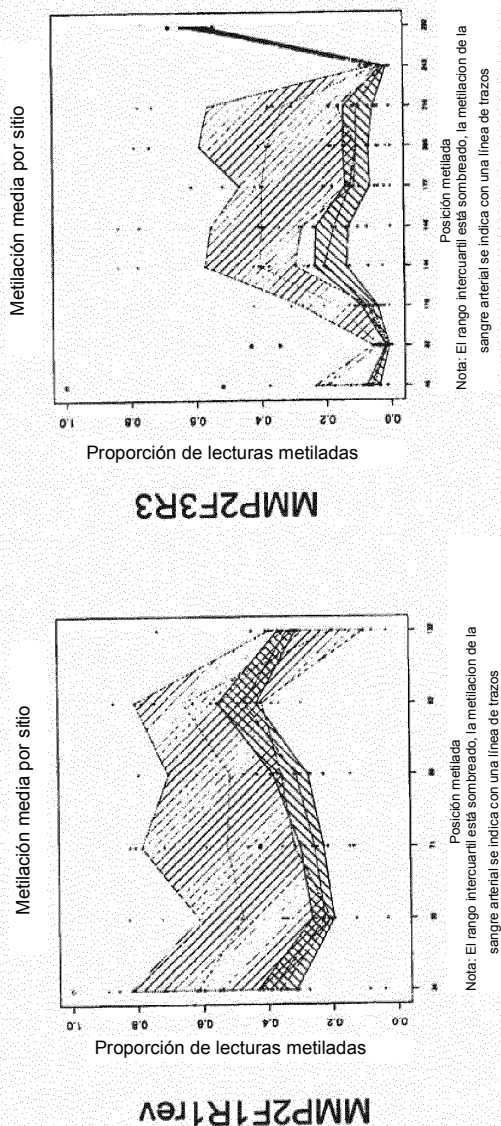
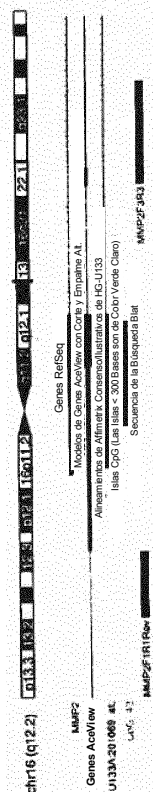
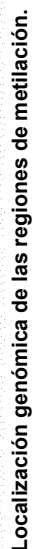
[illegible]

FIGURA 19

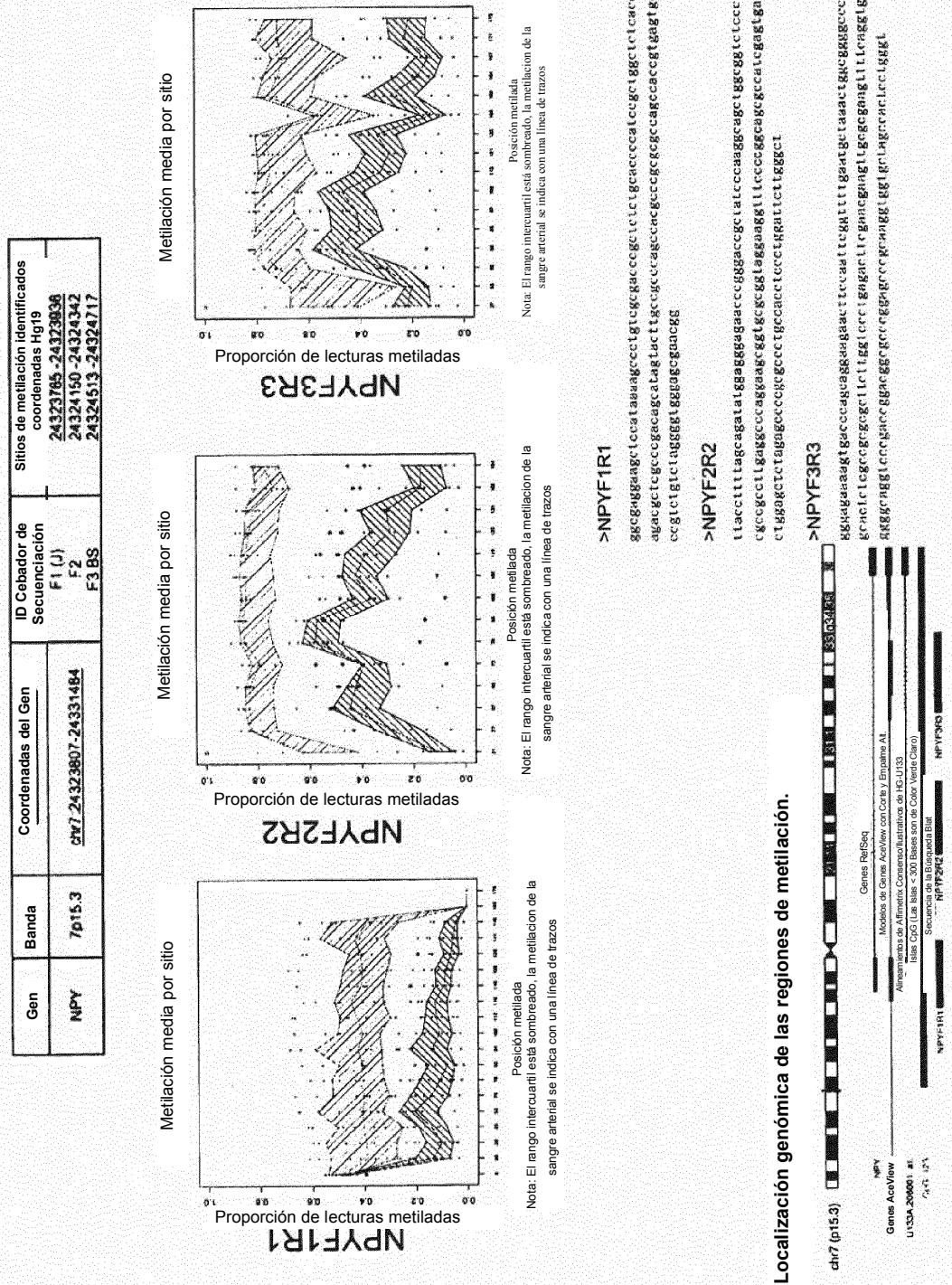
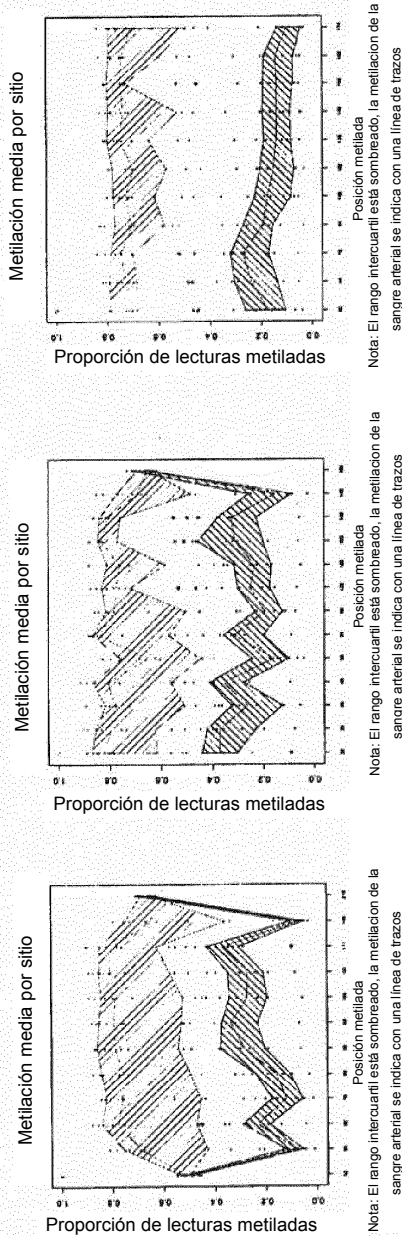


FIGURA 20

Gen	Banda	Coordenadas del Gen	ID Cebador de Secuenciación	Sitios de metilación identificados coordenadas hg19
PDX1	13q12.2	chr13:28494168-28500451	F1 F2 F3 BS	28502100-28502311 28502417-28502603 28503006-28503210



PDX1F1R1

PDX1F2R2

PDX1F3R3rev

>PDX1F1R1

gggtggggccggggtcagagcttggcttggaggtctctgggtggcagagactcgggcaaccggagagccctggg
ccctcccggggagagagcgcggactccgggggtcgccgccctgggctccaccagctccgggagccgggagccctccg
tcgtggcttggcttaccatcttaccctccatctctgtctatacagtgggctcctacagggagggcgg

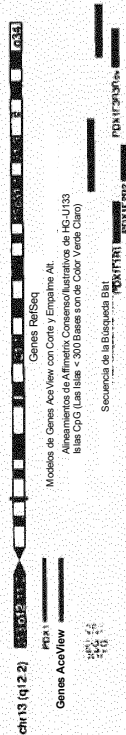
>PDX1F2R2

cttccaggggggcccccggggggagcagcggagagagcgaagtcctggctggcggagagacccctggagggagagtagtgg
ggagagggaatgaatgcctgcggagcgcctctgggctccaccagctccgggagccgggagccgggagccctccg
tccggaccccttagggcagcgggacccataccctcctggatcaga

>PDX1F3R3rev

ggagggatccctcagggggaatgggagggatgggttctgggtccagctcgggagcgggtctcggggcaggagggcagggag
ctggctgttgggttctctctgggggtggagcagggcccggggctgctcggggctctggagcggcgtatagcga
ggcagggcgacctgggtgagggctaaccttgggttggagcttggcagggagctctgctctctct

Localización genómica de las regiones de metilación.



PPP1R14F4bR4

Metilación media por sitio



Metilación media por sitio



Posición metilada

Posición metilada

>PPP1R14F3R3Rev

[illegible]

>PPP1R14F4bR4

ctgtctctctgtgcatcaccaggttggtcgttgcaacagcagtagtgatccacagagaccccaaggggcgtggggactc
ccggcgccgggggtctatctgttccgacacaccacccaggtcccccgggtctacatctgcgcggtatcacctc
ctccaggggcgcctggtatccattctccactccagcgcgcgttgagctccgcggtctacttgacggt
gacgcgcgttggtggtcttgagccccccgggactggccccctg

Localización genómica de las regiones de metilación.

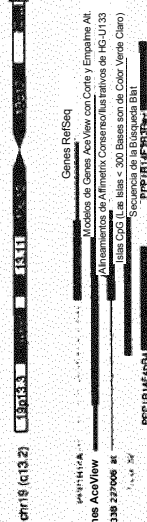
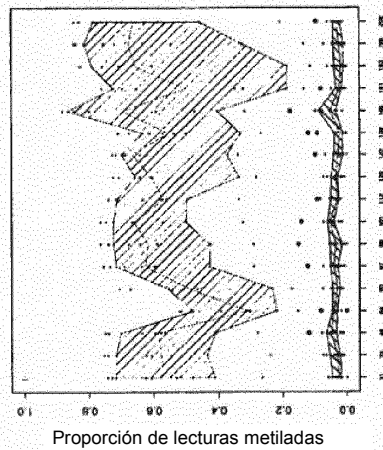


FIGURA 22

Gen	Banda	Coordenadas del Gen	ID Cebador de Secuenciación	Sitios de metilación identificados coordenadas Hg19
SDC2	8q22.1	g16.97505882-97624037	SDSC F1 BS	97506813-97507045
			SDC2 F2 BS	97507037-97507257

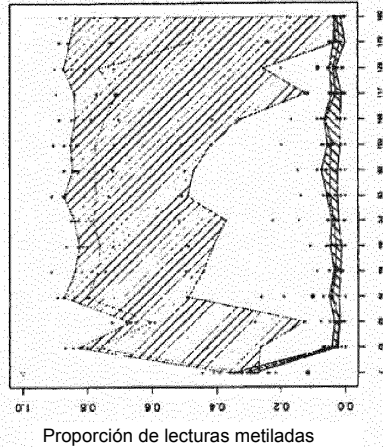
Metilación media por sitio



Nota: El rango intercuartil está sombreado, la metilación de la sangre arterial se indica con una línea de trazos

SDC2F1R1rev

Metilación media por sitio



Nota: El rango intercuartil está sombreado, la metilación de la sangre arterial se indica con una línea de trazos

SDC2F2R2

Localización genómica de las regiones de metilación.

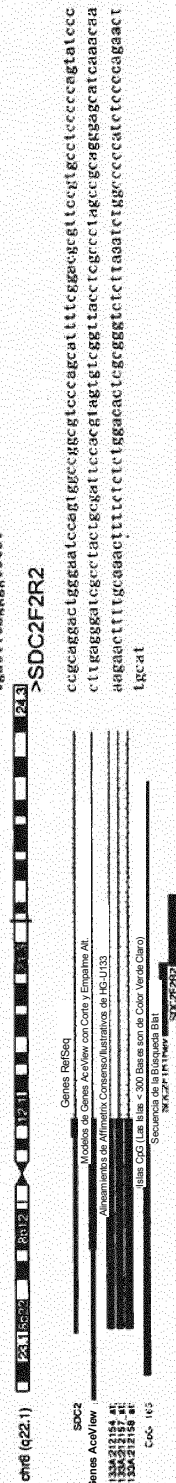
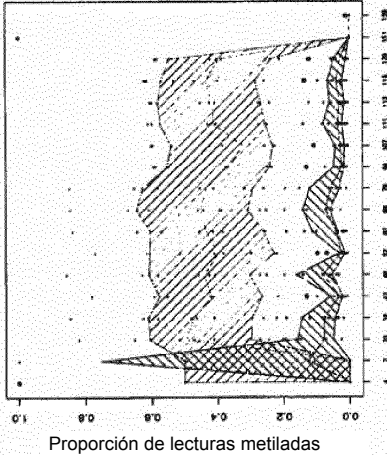


FIGURA 23

Gen	Banda	Coordenadas del Gen	ID Cebador de Secuenciación	Sitios de metilación identificados coordenadas Hg19
SOX21	13q32.1	chr13:95361879-95364389	F1 BS F2 BS	95364013-9536417 95364515-95364784

SOX21F1R1rev

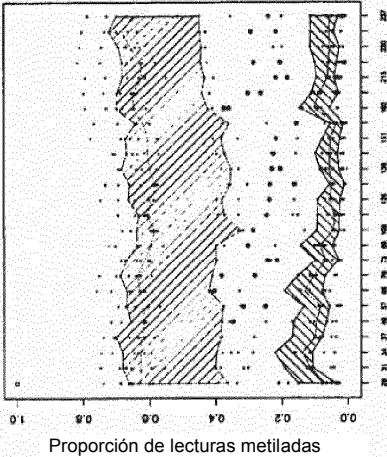
Metilación media por sitio



Nota: El rango intercuartil está sombreado, la metilación de la sangre arterial se indica con una línea de trazos

SOX21F2R2rev

Metilación media por sitio



Nota: El rango intercuartil está sombreado, la metilación de la sangre arterial se indica con una línea de trazos

>SOX21F1R1Rev

```
gagcgcgggtgggaactgtctacagatctggagagggccgttcacgacgagccaaaggtctacgcgc  
catgacatgagggagcaccacccctacagctaccaggcggcggcggagcccaagcgtgtcaagagga  
cagctcgccttcccgtgccc
```

>SOX21F2R2Rev

```
tggagggcccttgggcacttggcagcgcggggggggtccctcggcctcaacttcaggagttctccgcga  
cgcaacttttggggacgttttgatttaagagagagacacccggagagagagagagccttgcgcggcgcgc  
tacctggcgggagcctcaccagcaaacgcccacgtgcagcgaagagagacgtataagggcgaacaggccg  
cgcgggggggggagccgcggaggttagaggttctcagagagacacctcgtc
```

Localización genómica de las regiones de metilación.

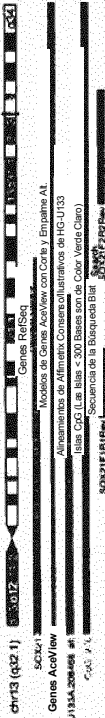


FIGURA 24

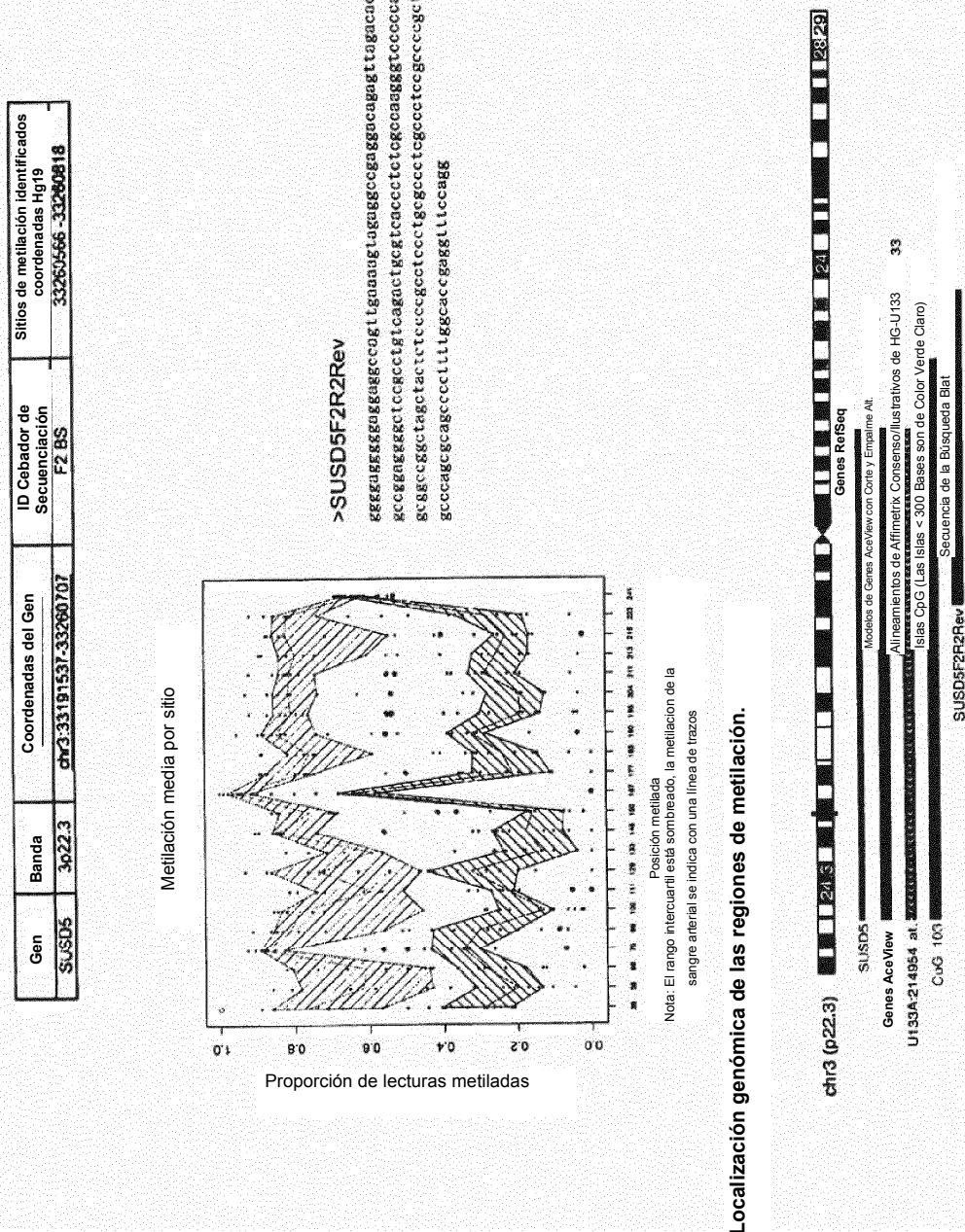


FIGURA 25

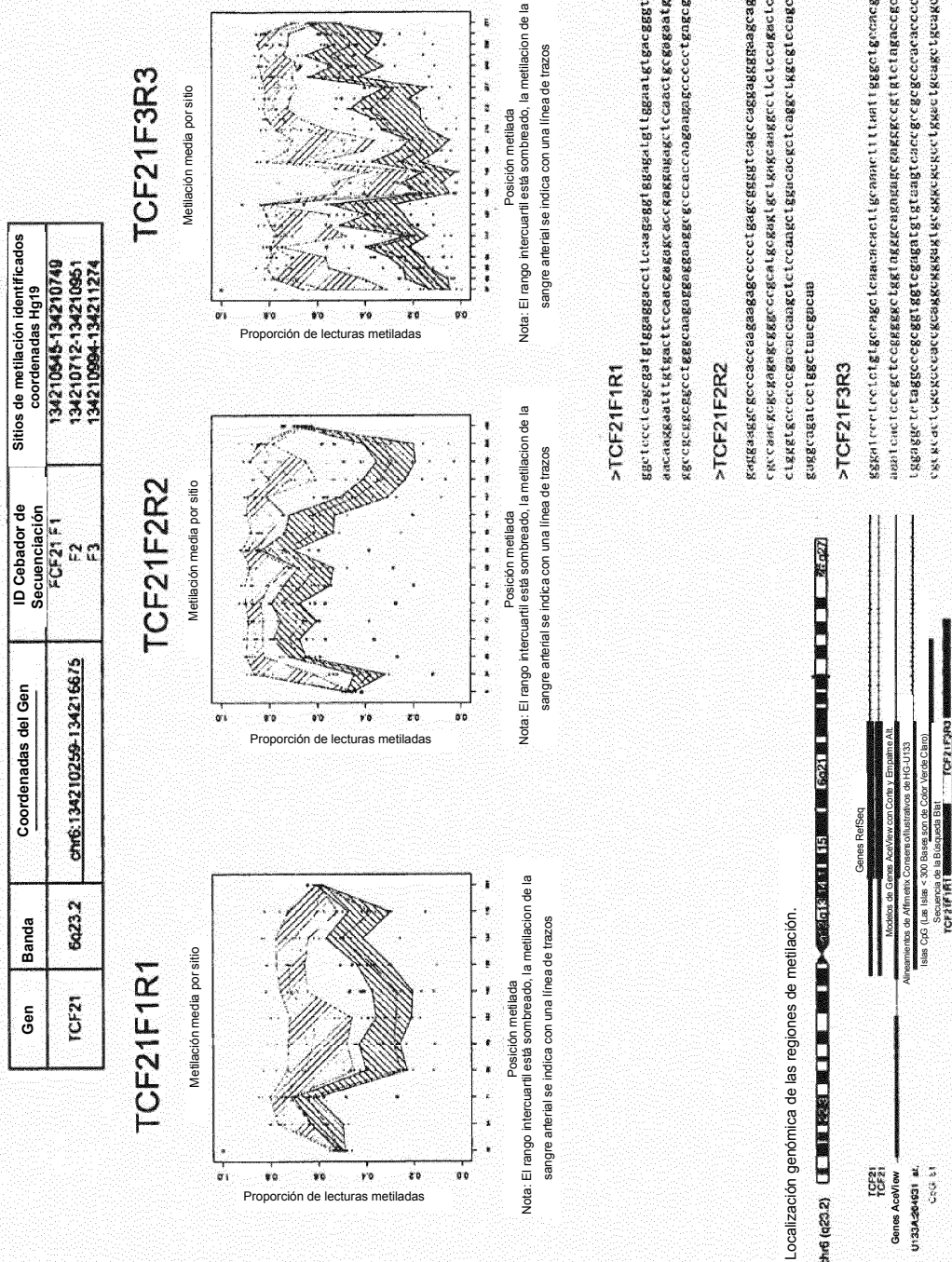
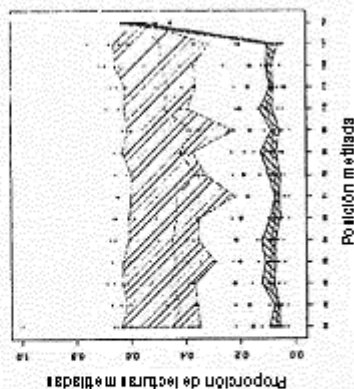


FIGURA 26

Gen	Banda	Coordenadas del Gen	ID cebador secuenciación	Sitio de metilación identificado Coordenada Hg 19
ZNF471	19c13.43	chr19:57019212-5704269	FTBS R2	57018955-57019135 57019204-57019573

ZNF471F1R1rev

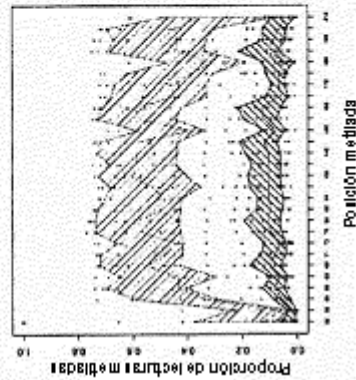
Metilación media por sitio



Nota: El rango intercuartil está sombreado, la metilación de la sangre arterial se indica con una línea de trazo.

ZNF471F2R2

Metilación media por sitio



Nota: El rango intercuartil está sombreado, la metilación de la sangre arterial se indica con una línea de trazo.

Localización genómica de las regiones de metilación

