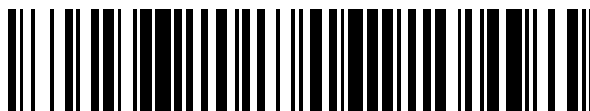


19



OFICINA ESPAÑOLA DE
PATENTES Y MARCAS

ESPAÑA



11 Número de publicación: **2 541 178**

51 Int. Cl.:

G01N 33/574 (2006.01)

C12Q 1/68 (2006.01)

12

TRADUCCIÓN DE PATENTE EUROPEA

T3

96 Fecha de presentación y número de la solicitud europea: **03.02.2010** **E 10702339 (2)**

97 Fecha y número de publicación de la concesión europea: **01.04.2015** **EP 2394170**

54 Título: **Método de detección de cáncer colorrectal**

30 Prioridad:

03.02.2009 US 149581 P

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

16.07.2015

73 Titular/es:

MDxHealth SA (100.0%)
CHU, Tour 5 GIGA, niveau 3 Avenue de L'Hôpital
11
4000 Sart-Tilman (Liege), BE

72 Inventor/es:

JOOST, LOUWAGIE

74 Agente/Representante:

UNGRÍA LÓPEZ, Javier

ES 2 541 178 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

Método de detección de cáncer colorrectal**5 Campo de la invención**

La presente invención se refiere al diagnóstico, la estadificación y el tratamiento de enfermedades, en particular cáncer y más específicamente cáncer colorrectal. La invención se refiere a métodos y kits para el diagnóstico del cáncer colorrectal basándose en la detección de modificaciones epigenéticas, típicamente en genes específicos. Los métodos y kits también pueden permitir la detección de sangre en una muestra fecal, demostrándose los ensayos combinados particularmente ventajosos.

Antecedentes de la invención

El cáncer colorrectal (CCR) es la principal causa de muerte por cáncer en todo el mundo, y es la segunda causa principal de muerte por cáncer en los Estados Unidos. El pronóstico de los pacientes es bueno si el cáncer se detecta a tiempo, cuando el sitio del cáncer está confinado a su lugar de origen. Sin embargo, las tasas de curación caen una vez que el cáncer se ha diseminado. La mayoría de los cánceres de colon surgen de pólipos adenomatosos convencionales (secuencia convencional de adenoma a carcinoma), mientras que algunos cánceres de colon parecen surgir del pólipo adenomatoso dentado reconocido recientemente (teoría de adenoma dentado a carcinoma). Debido a que los adenomas convencionales y adenomas serrados son generalmente asintomáticos, el escrutinio en masa de pacientes asintomáticos se ha convertido en la piedra angular para la detección y la eliminación de estas lesiones precursoras para reducir el riesgo de cáncer de colon.

Están disponibles varios métodos diferentes de escrutinio para CCR. Procedimientos tales como el examen rectal digital (DRE); la colonoscopia o la sigmoidoscopia son altamente invasivos, dolorosos y pueden causar una gran cantidad de molestias al paciente. Otros ensayos de escrutinio menos invasivos incluyen pruebas de sangre oculta en materia fecal (PSOMF); prueba inmunoquímica fecal (PFI); enema de bario con contraste de aire; colonoscopia virtual; biopsia (p. ej., biopsia con aguja guiada por TC); y técnicas de imágenes (p. ej., ecografía, barrido por TC, barrido mediante TEP, y MRI).

La colonoscopia se ha convertido en la prueba de escrutinio primario para CCR debido a su alta sensibilidad y especificidad, y capacidad de realizar polipectomía. Si bien sensible y específico, el procedimiento es invasivo, costoso, tiene disponibilidad limitada e incluye ciertos riesgos, como la inducción de infección y la perforación del intestino.

Un modo de escrutinio de CCR de uso común y menos costoso es una prueba de sangre oculta en materia fecal (PSOMF), que pone a prueba la presencia de sangre en las heces. La presencia de la hemoglobina como una proteína de la sangre representativa en las heces es un indicador de sangrado intestinal, que se asocia frecuentemente con el CCR. Sin embargo, puesto que oculta en una muestra fecal podría ser indicativo de una variedad de trastornos gastrointestinales, siguen siendo necesarios más exámenes médicos tales como la colonoscopia para identificar el cáncer colorrectal.

Las pruebas de sangre oculta en materia fecal se clasifican principalmente en dos categorías, las pruebas basadas en el uso de reactivos químicos cromogénicos tales como las pruebas con goma de guayaco e inmunoquímicas. Los métodos con guayaco basados químicamente determinan la presencia de sangre oculta mediante la detección de la actividad peroxidasa de la hemoglobina en la sangre presente en la muestra de materia fecal. Requieren la catálisis de peróxido a oxígeno y agua, y la posterior oxidación de un colorante incoloro (más a menudo a una forma coloreada). Sin embargo, también se encuentra actividad peroxidasa en carnes y verduras. Con el fin de producir resultados exactos, estas pruebas requieren restricción de la ingesta de ciertos alimentos, medicamentos, vitaminas y otras sustancias antes y durante el período de recogida de las muestras. La sensibilidad de la PSOMF con guayaco más comúnmente utilizada (Hemoccult) es de aproximadamente 50%. A pesar de una especificidad del 98%, el valor predictivo positivo para la PSOMF es bajo. Métodos de detección de sangre oculta basados en análisis de porfirina (hemo y protoporfirina IX) o ensayos inmunológicos utilizando anticuerpos anti-hemoglobina mejoran estos resultados. Los ensayos inmunoquímicos (PFI o iPSOMF) que utilizan anticuerpos anti-hemoglobina específicos para la sangre humana en extractos de heces no requieren restricciones dietéticas; sin embargo, son más complicados y más caros que los ensayos basados en peroxidasa. Además, la hemoglobina humana en muestras fecales se degrada con el tiempo, dando como resultado una pérdida de antigenicidad que puede producir resultados falsos negativos. La sensibilidad notificada de estas pruebas inmunológicas varía ampliamente, pero es típicamente de 60-80%, dependiendo de la población sometida a ensayo. La especificidad se estima en ~98%. Debido a la naturaleza intermitente del sangrado colorrectal, la sensibilidad de la PSOMF y la PFI es directamente proporcional al número de muestras tomadas y la frecuencia de las pruebas.

Los recientes desarrollos en los ensayos buscan específicamente mutaciones en los ADN característicos de la

neoplasia colorrectal que son detectables en las células epiteliales exfoliadas en las heces (Pignone, et al., 2002; Ahlquist, et al., 2002). Si bien el sangrado neoplásico es intermitente, el desprendimiento epitelial es continuo, lo que podría hacer los ensayos de ADN basados de heces (es decir, también conocidos como ensayos de ADN fecal [ADN-f] y de ADN en heces [DNA-h]) pruebas más sensibles que otros métodos. Los primeros estudios de escrutinio molecular fecal se centraron principalmente en las mutaciones individuales. Las mutaciones genéticas en P53, K-ras, y BAT 26, por ejemplo, se han relacionado con el cáncer colorrectal y siguen siendo detectables en muestras fecales. Las neoplasias colorrectales son variadas en la naturaleza y no se ha identificado que ninguna mutación única sea expresada universalmente. Por esta razón, se utilizan preferiblemente paneles de análisis de la diana múltiples (MTAP). PreGen-Plus™ (EXACT Sciences Corporation, Maynard, MA; Laboratory Corporation of America, Burlington, Carolina del Norte) es una única prueba que identifica la presencia de 23 mutaciones del microsátélites (MSI) diferentes que se sabe que están asociadas con el CCR, incluyendo mutaciones en BAT- 26. Además, otras 21 mutaciones puntuales en otros genes asociados con el CCR están incluidas en este ensayo APC, K-ras, y p53. Este ensayo está diseñado adicionalmente para detectar fragmentos de ADN largos, que han sido asociados específicamente con células llamadas colonocitos no apoptóticos, que son comunes en el CCR. Si bien este ensayo es más sensible que la prueba de sangre oculta en materia fecal, no es tan sensible como la colonoscopia y se perderá aproximadamente la mitad de los cánceres en un grupo de riesgo medio de personas sin síntomas.

El aumento de la metilación del ADN es una alteración epigenética que es común en los cánceres humanos y a menudo está asociado con el silenciamiento transcripcional. El ADN metilado aberrantemente también se ha propuesto como marcador tumoral potencial para el escrutinio del CCR. Genes tales como la vimentina, que son transcripcionalmente silenciosos en el epitelio normal, han sido considerados como dianas para la metilación aberrante asociada al cáncer y para su uso como marcadores del cáncer (JNCI Journal of the National Cancer Institute 2005 97(15): 1124-1132). Un ensayo combinado utilizando el gen de la vimentina (hV) hipermetilado y un análisis de integridad del ADN de dos sitios (DY), demostró una sensibilidad de 88% para el CCR con una especificidad de 82% (Am J Gastroenterol. 2008 Nov; 103(11): 2862-70). Adicionalmente, ColoSure® es un ensayo de ADN basado en heces, desarrollado en el laboratorio con un único marcador. Este método examina el ADN en las células del colon exfoliadas para determinar metilación aberrante asociada al cáncer del gen de la vimentina y alcanza un rango de sensibilidad de 72-77% y un rango de especificidad de 83-94% en individuos de riesgo medio.

Los ensayos de proteínas proporcionan un método alternativo para la detección de CCR. Se han descrito ensayos de evaluación de la presencia de enzimas derivadas de tumores tales como la piruvato quinasa M2 (M2-PK), y/o proteínas tales como calprotectina, antígeno carcinoembrionario (CEA), inhibidor tisular de la metaloproteínasa-1 (TIMP-1) y proteína de unión a calcio S100 A12 (S100A12). Un diagnóstico de cáncer colorrectal utilizando una combinación de sangre oculta en materia fecal y los marcadores de proteínas fecales novedosos S100A12 y TIMP-1 se ha descrito en Clin Gastroenterol Hepatol. 2008 Oct; 6(10): 1122-8. La isoenzima dimérica de piruvato quinasa, M2-PK, expresado por las células tumorales, también se ha propuesto como una herramienta de escrutinio de CCR. El rendimiento de materia fecal M2-PK se ha evaluado con iPSOMF y colonoscopia en Am J Gastroenterol. 2008 Jun; 103(6): 1496-504. En comparación con la PSOMF inmunoquímica, TuM2-PK no tiene valor complementario para el escrutinio de CCR a causa de una menor sensibilidad y especificidad (Eur J Gastroenterol Hepatol. 2007 Oct; 19(10): 878-82).

Aunque se han descrito análisis combinados para el escrutinio de CCR, su enfoque se dirige o bien a múltiples marcadores de proteínas o bien a múltiples alteraciones del ADN. Hasta la fecha, las pruebas inmunoquímicas y las pruebas de ADN para el escrutinio de CCR se han evaluado y comparado solo de forma separada.

El documento EP0308227 describe una prueba de sangre oculta en materia fecal química que emplea una matriz de guayaco.

El documento EP0032782 describe un método para el escrutinio de la hemoglobina o de productos de descomposición de la hemoglobina en las heces por medio de una reacción inmunológica utilizando un anticuerpo específico para hemoglobina humana.

El documento US7288413 describe los métodos que combinan una prueba de sangre oculta en materia fecal química y una prueba de sangre oculta en materia fecal inmunoquímica

El documento WO 04/092709 se refiere a un análisis de sangre fecal que implica la dispersión de un colorante en el agua del inodoro.

El documento EP0817968 describe recogidas de heces y métodos de ensayo y dispositivos adecuados diversos.

El documento WO 05/017207 describe que el gen de la vimentina puede ser una diana común para la metilación y el silenciamiento génico epigenético en la neoplasia de colon, y puede funcionar como un gen supresor de tumores candidato.

El documento WO 2008/084219 se refiere a la detección de cáncer colorrectal sobre la base de la determinación de la metilación de varios genes diferentes, incluyendo paneles de genes.

El documento WO 2006/113671 y WO 2008/010975 describe marcadores de metilación relevantes para el cáncer colorrectal.

El documento FR2919065 se refiere a un método para el diagnóstico *in vitro* de cáncer colorrectal mediante la determinación de la presencia del marcador tumoral apolipoproteína AI sobre la base de un inmunoanálisis de una muestra biológica tomada de un paciente.

Compendio de la invención

La invención proporciona un método para detectar una predisposición a, o la incidencia de, cáncer colorrectal en una muestra fecal que comprende:

(a) detectar la presencia de sangre en la muestra fecal, en donde la detección de la presencia de sangre es indicativa de una predisposición a, o la incidencia de, cáncer colorrectal,

(b) detectar una modificación epigenética en el ADN contenido dentro de la muestra fecal, en donde la modificación epigenética se detecta en al menos un gen seleccionado entre NDRG4, PHACTR3, FOXE1, GATA4, GPNMB, TFPI2, SOX17, SYNE1, LAMA, MMP2, OSMR, SFRP2 y CDO1 y en donde la detección de la modificación epigenética en al menos uno de los genes es indicativa de una predisposición a, o la incidencia de, cáncer colorrectal y sobre la base de un resultado positivo obtenido en (a) o (b) o tanto en (a) como en (b) detectar una predisposición a, o la incidencia de, cáncer colorrectal.

También se describe en la presente memoria un método de procesamiento de la muestra, antes de llevar a cabo un método de la invención, que comprende separar una porción de una muestra fecal recogida y añadir la porción separada de la muestra a un tampón que impide la desnaturalización o degradación de proteínas de la sangre encontradas en la muestra.

La invención también se refiere a un kit para la detección de una predisposición a, o la incidencia de, cáncer colorrectal en una muestra fecal comprende la combinación de:

(a) medios para detectar la presencia de sangre en la muestra fecal, en donde la detección de la presencia de sangre es indicativa de una predisposición a, o la incidencia de, cáncer colorrectal; y

(b) cebadores y/o sondas que permiten determinar directamente el estatus de metilación de al menos un gen seleccionado entre NDRG4, PHACTR3, FOXE1, GATA4, GPNMB, TFPI2, SOX17, SYNE1, LAMA, MMP2, OSMR, SFRP2 y CDO1 en el ADN, en donde la detección del estatus de metilación es indicativa de una predisposición a, o la incidencia de, cáncer colorrectal.

Descripción detallada de la invención

La invención, según se establece en las reivindicaciones, se basa en los intentos satisfactorios de mejorar la detección del cáncer colorrectal. En particular, la invención tiene como objetivo mejorar el valor predictivo positivo y negativo y también la sensibilidad y especificidad de la detección del cáncer colorrectal a través de medios no invasivos. Los métodos de la invención pueden permitir la detección eficaz del cáncer colorrectal sin el requisito de procedimientos relativamente costosos, altamente invasivos y dolorosos tales como el examen rectal digital, la colonoscopia y la sigmoidoscopia que se vayan a realizar. La invención se basa en una combinación de ensayos para la detección de proteínas y marcadores de modificación epigenética respectivamente en la misma muestra fecal, que se muestra por primera vez en la presente memoria para proporcionar una prueba general particularmente útil.

Así, según un primer aspecto, la invención proporciona un método para detectar una predisposición a, o la incidencia de, cáncer colorrectal en una muestra fecal que comprende, consiste esencialmente en o consiste en:

(a) detectar la presencia de sangre en la muestra fecal, en donde la detección de la presencia de sangre es indicativa de una predisposición a, o la incidencia de, cáncer colorrectal; y,

(b) detectar una modificación epigenética en el ADN contenido dentro de la muestra fecal, en donde la modificación epigenética se detecta en al menos un gen seleccionado entre NDRG4, PHACTR3, FOXE1, GATA4, GPNMB, TFPI2, SOX17, SYNE1, LAMA, MMP2, OSMR, SFRP2 y CDO1 y en donde la detección de la modificación epigenética en al menos uno de los genes es indicativa de una predisposición a, o la incidencia de, cáncer colorrectal y sobre la base de un resultado positivo obtenido en (a) o (b) o tanto en (una) como en (b) detectar una predisposición a, o la incidencia de, cáncer colorrectal.

Según se muestra en la presente memoria, la combinación del ensayo con marcador de metilación y la prueba de

sangre oculta en materia fecal (PSOMF) proporciona resultados muy específicos y sensibles.

Los métodos combinados de la invención mejoran el valor predictivo negativo de las pruebas individuales existentes. Al mejorar la sensibilidad, el número de resultados falsos negativos se reduce y esto mejora el valor predictivo negativo.

La etapa (a) de los métodos implica la detección de la presencia de sangre en la muestra fecal, en donde la detección de la presencia de sangre es indicativa de una predisposición a, o la incidencia de, cáncer colorrectal. La sangre en las heces es un indicador de sangrado intestinal, que se asocia frecuentemente con el cáncer colorrectal. Por lo tanto, la detección de sangre en la muestra fecal se considera un resultado "positivo" en la etapa (a). Se puede emplear cualquier método adecuado para detectar la presencia de sangre en la muestra. A menudo, los métodos para detectar sangre estarán basados en la detección de una proteína de la sangre representativa en la muestra fecal. En ciertas realizaciones, la detección de la presencia de sangre en la muestra fecal comprende, consiste esencialmente en o consiste en la detección de hemoglobina en la muestra fecal. La detección puede ser a través de cualquier medio adecuado, e incluye todas las variantes de análisis de sangre oculta en heces. La prueba puede ser cromogénica o inmunológica en ciertas realizaciones. La prueba se puede basar en la actividad peroxidasa de la hemoglobina. Las pruebas cromogénicas son bien conocidas y asequibles comercialmente y pueden depender de reactivos químicos tales como la goma de guayaco. En realizaciones específicas, la hemoglobina en la muestra fecal se detecta a través de medios inmunoquímicos. Esto puede implicar anticuerpos anti-hemoglobina en ciertas realizaciones. El término "anticuerpo" o "anticuerpos" en la presente memoria se refiere a un anticuerpo o a anticuerpos, o un derivado del mismo que conserva la actividad de unión específica. Por actividad de unión específica se entiende la capacidad de unirse específicamente a la hemoglobina. Por lo tanto, tal reactivo no se une o no se une en un grado significativo, a las proteínas no relacionadas que se encuentran en la muestra fecal. Se pueden emplear cualquier anticuerpo o derivado. Por lo tanto, el anticuerpo puede ser un anticuerpo monoclonal o policlonal. El derivado del anticuerpo que conserva la actividad de unión específica puede comprender, consistir esencialmente en o consistir en una versión humanizada de un anticuerpo no humano, un anticuerpo de cadena pesada, un anticuerpo de dominio único, un nanocuerpo, un fragmento Fab o scFv etc. en ciertas realizaciones. Están disponibles numerosas técnicas para la producción de anticuerpos y sus formas derivatizadas, como conocería un experto en la técnica.

Como se mencionó anteriormente, la combinación de técnicas maximiza la sensibilidad de detección, sin comprometer significativamente la especificidad. Por lo tanto, las concentraciones de detección umbral para la detección de sangre/hemoglobina en la etapa (a) pueden ser las normalmente empleadas en las pruebas de sangre oculta en las heces. La adición en la prueba de la etapa (b) mejora la sensibilidad general al recoger muestras positivas adicionales. Por ejemplo, en algunas realizaciones, el resultado en la etapa (a) se considera positivo si la concentración de hemoglobina detectada es más de entre (aproximadamente) 50 a (aproximadamente) 150 ng/ml. En realizaciones más específicas, el resultado en la etapa (a) se considera positivo si la concentración de hemoglobina detectada es más de (aproximadamente) 100 ng/ml.

Sin embargo, en otras realizaciones, se pueden emplear los métodos de la invención para mejorar la sensibilidad del método de la etapa (a), a la vez que se previene una pérdida resultante de especificidad. Al reducir la concentración umbral de sangre que va a ser detectada en la muestra fecal para dar un resultado positivo en la etapa (a), se aumenta la sensibilidad del método de la etapa (a). Con el fin de conservar la especificidad, el método de la etapa (b) se emplea en aquellas muestras en las que se detectaron niveles bajos de sangre, es decir, inferiores al umbral utilizado típicamente, en la etapa (a). Un resultado positivo del método de la etapa (b) es necesario para confirmar el resultado positivo en la etapa (a) para las muestras de "bajo nivel". Para aquellas muestras que tienen concentraciones de sangre (especialmente hemoglobina) superiores al umbral empleado típicamente en la etapa (a), no es necesario llevar a cabo el método de la etapa (b), ya que para estas muestras de la etapa (a) el método es suficientemente específico para que este no sea necesario. Esto tiene la ventaja de que no se requiere que la prueba de la etapa (b) para todas las muestras, reduciendo así los costes y aumentando el rendimiento. Por lo tanto, en ciertas realizaciones, el resultado en la etapa (a) se considera positivo si la concentración de hemoglobina detectada es menor que la empleada típicamente como concentración umbral de hemoglobina en las pruebas de detección de hemoglobina, pero para aquellas muestras en las que se detecta una concentración "inferior que el umbral típico" de hemoglobina, la etapa (b) se lleva a cabo en estas muestras. La detección de la modificación epigenética en la etapa (b) se utiliza en ese caso para confirmar el resultado positivo en la etapa (a). La prueba de la etapa (b) no se emplea para aquellas muestras en las que la concentración de hemoglobina detectada es mayor que el umbral típicamente empleado en las pruebas de escrutinio de hemoglobina.

En realizaciones específicas, el resultado en la etapa (a) se considera positivo si la concentración de hemoglobina detectada es más de o al menos (aproximadamente) 5 a (aproximadamente) 50 ng/ml, más específicamente más de o al menos (aproximadamente) 5 a (aproximadamente) 20 ng/ml y más concretamente más de o al menos (aproximadamente) 10 ng/ml. Al bajar el umbral, se aumenta la sensibilidad de la prueba. En tales realizaciones, la etapa (b) se lleva a cabo solo en el caso de que la concentración de hemoglobina sea detectada entre (aproximadamente) 5 ng/ml y (aproximadamente) 250 ng/ml, más específicamente entre (aproximadamente) 10

ng/ml y (aproximadamente) 200 ng/ml. La detección de la modificación epigenética en la etapa (b) se utiliza en ese caso para confirmar el resultado positivo en la etapa (a). Por lo tanto, un resultado positivo en la etapa (b) confirma el resultado en la etapa (a) como positivo. Si no se detecta ninguna modificación epigenética del ADN, el resultado de la etapa (a) se considera negativo. Para muestras en las que la concentración de hemoglobina detectada es más de o al menos (aproximadamente) 200 ng/ml (o (aproximadamente) 250 ng/ml), no es necesario realizar la etapa (b), ya que el resultado en la etapa (a) será de alta especificidad (es decir, es poco probable que sea un falso positivo).

La etapa (b) implica la detección de una modificación epigenética en el ADN contenido dentro de la muestra fecal, en donde la modificación epigenética se detecta en al menos un gen seleccionado entre NDRG4, PHACTR3, FOXE1, GATA4, GPNMB, TFPI2, SOX17, SYNE1, LAMA, MMP2, OSMR, SFRP2 y CDO1 y en donde la detección de la modificación epigenética en al menos uno de los genes es indicativa de una predisposición a, o la incidencia de, cáncer colorrectal. Por lo tanto, la detección de la modificación epigenética se considera un resultado "positivo" en la etapa (b).

En ciertas realizaciones, se detecta la modificación epigenética en al menos un gen seleccionado entre PHACTR3, NDRG4 y FOXE1, con detección de la modificación epigenética en al menos uno de los genes que proporciona una indicación de una predisposición a, o la incidencia de, cáncer colorrectal.

PHACTR3 es el símbolo génico aprobado por el Comité de Nomenclatura de genes HUGO. El gen se localiza en el cromosoma 20 (ubicación 20q13.32-q13.33) y la secuencia del gen aparece bajo el número de acceso AJ311122 y NM_080672. El gen codifica la fosfatasa y regulador de actina 3.

NDRG4 es el símbolo génico aprobado por el Comité de Nomenclatura de genes HUGO. El gen se localiza en el cromosoma 16 (ubicación q21-q22.3) y la secuencia del gen aparece bajo el número de acceso AB044947. El gen codifica miembro de la familia NDRG 4.

FOXE1 es el símbolo génico aprobado por el Comité de Nomenclatura de genes HUGO. El gen se localiza en el cromosoma 9 (ubicación 9q22) y la secuencia del gen aparece bajo el número de acceso U89995. El gen codifica la caja de la cabeza del tenedor E1 (factor de transcripción tiroideo 2).

GATA4 es el símbolo génico aprobado por el Comité de Nomenclatura de genes HUGO. El gen se localiza en el cromosoma 8 (ubicación 8p23.1-p22) y la secuencia del gen aparece bajo los números de acceso AK097060 y NM_002052. El gen codifica la proteína 4 de unión a GATA.

GPNMB es el símbolo génico aprobado por el Comité de Nomenclatura de genes HUGO. El gen se localiza en el cromosoma 7 (ubicación 7p) y la secuencia del gen aparece bajo los números de acceso X76534 y NM_001005340. El gen codifica la glicoproteína (transmembrana) nmb.

TFPI2 es el símbolo génico aprobado por el Comité de Nomenclatura de genes HUGO. El gen se localiza en el cromosoma 7 (ubicación 7q) y la secuencia del gen aparece bajo los números de acceso L27624 y NM_006528. El gen codifica inhibidor 2 de la ruta del factor tisular.

SOX17 es el símbolo génico aprobado por el Comité de Nomenclatura de genes HUGO. El gen se localiza en el cromosoma 8 (ubicación 8q11.23) y la secuencia del gen aparece bajo el número de acceso AB073988. El gen codifica SRY (región determinante del sexo Y)-Caja 17.

SYNE1 es el símbolo génico aprobado por el Comité de Nomenclatura de genes HUGO. El gen se localiza en el cromosoma 6 (6q24.2-q25.3 ubicación) y la secuencia del gen aparece bajo el número de acceso AB018339. El gen codifica la envoltura nuclear 1 que contiene la repetición de espectrina.

LAMA1 es el símbolo génico aprobado por el Comité de Nomenclatura de genes HUGO. El gen se localiza en el cromosoma 18 (18p11.3 ubicación) y la secuencia del gen aparece bajo los números de acceso X58531 y NM_005559. El gen codifica la laminina, alfa 1.

MMP2 es el símbolo génico aprobado por el Comité de Nomenclatura de genes HUGO. El gen se localiza en el cromosoma 16 (16q13-q21 ubicación) y la secuencia del gen aparece bajo el número de acceso NM_001127891. El gen codifica metalopeptidasa 2 de la matriz (gelatinasa A, gelatinasa de 72 kDa, colagenasa tipo IV de 72 kDa).

OSMR es el símbolo génico aprobado por el Comité de Nomenclatura de genes HUGO. El gen se localiza en el cromosoma 5 (ubicación 5p13.2) y la secuencia del gen aparece bajo los números de acceso U60805 y NM_003999. El gen codifica el receptor de la oncostatina M.

SFRP2 es el símbolo génico aprobado por el Comité de Nomenclatura de genes HUGO. El gen se localiza en el cromosoma 4 (localización 4q31.3) y la secuencia del gen aparece bajo el número de acceso AF017986. El gen

codifica la proteína relacionada con frizzled tipo 2 secretada.

CDO1 es el símbolo génico aprobado por el Comité de Nomenclatura de genes HUGO. El gen se localiza en el cromosoma 5 (ubicación 5q23.2) y la secuencia del gen aparece bajo el número de acceso NM_001801. El gen

Mediante "gen" se quiere significar el gen conocido específico en cuestión. También puede referirse a cualquier gen que se toma de la familia a la que pertenece el denominado "gen", en ciertas circunstancias, e incluye de acuerdo con todos los aspectos de la invención no solo las secuencias concretas que se encuentran en las entradas de bases de datos disponibles al público, sino también abarca transcritos y variantes de nucleótidos de estas secuencias, con la condición de que la metilación u otra modificación epigenética del gen están ligadas a la incidencia del cáncer colorrectal. Las secuencias variantes pueden tener al menos 90%, al menos 91%, al menos 92%, al menos 93%, al menos 94%, al menos 95%, al menos 96%, al menos 97%, al menos 98%, o al menos 99% de identidad de secuencia de nucleótidos con las secuencias de nucleótidos en las entradas de la base de datos. Los programas de ordenador para determinar el porcentaje de identidad de secuencia de nucleótidos están disponibles en la técnica, incluyendo Basic Local Alignment Search Tool (BLAST) disponible en el Centro Nacional para la Información Biotecnológica.

Los métodos de la invención son generalmente métodos in vitro llevados a cabo en una muestra de ensayo aislada. Los métodos se utilizan para diagnosticar el cáncer colorrectal. En ciertas realizaciones, los métodos también pueden incluir la etapa de obtención de la muestra. La muestra de ensayo es generalmente de un sujeto humano. El sujeto puede ser sospechoso de ser tumorigénico. Más específicamente, el sujeto puede ser sospechoso de padecer un cáncer colorrectal.

En realizaciones específicas de los métodos, la modificación epigenética se detecta en un panel de al menos dos genes seleccionados entre PHACTR3, NDRG4 y FOXE1, con detección de la modificación epigenética en al menos uno de los genes que proporcionan una indicación de una predisposición a, o la incidencia de, cáncer colorrectal. Los paneles específicos que pueden emplearse comprenden, consisten esencialmente en o consisten en PHACTR3, NDRG4 y FOXE1, NDRG4 y FOXE1, PHACTR3 y NDRG4 o PHACTR3 y FOXE1.

En otras realizaciones, la modificación epigenética se detecta en al menos un gen seleccionado entre LAMA1 y CDO1. En otras realizaciones, la modificación epigenética se detecta en al menos un gen seleccionado entre GPNMB y MMP2.

Los métodos de la invención pueden tener valor diagnóstico y pronóstico, y esto está incluido dentro de la definición del término "detectar una predisposición a, o la incidencia de, cáncer colorrectal". El valor pronóstico de los métodos de la invención se puede usar como un marcador potencial de la susceptibilidad al cáncer colorrectal o como un marcador para la progresión de adenoma a cáncer por ejemplo. Por lo tanto los pacientes en situación de riesgo pueden ser identificados antes de que la enfermedad tenga una oportunidad de manifestarse en términos de síntomas identificables en el paciente. La detección inicial, así como el seguimiento de la detección, por ejemplo, después del tratamiento, también se incluye dentro de la definición. El seguimiento de la detección se puede realizar después de cualquier tratamiento. Los ejemplos incluyen tras polipectomía (extirpación de pólipos) y después de la cirugía para extirpar un carcinoma colorrectal, neoplasia grave o adenoma avanzado.

Los métodos de la invención pueden llevarse a cabo sobre muestras que contienen ADN purificado o no purificado. Sin embargo, en realizaciones específicas, el ADN se aísla/extrae/purificado a partir de la muestra. Se puede utilizar cualquier técnica adecuada de aislamiento de ADN. Los ejemplos de técnicas de purificación se pueden encontrar en textos convencionales tales como Molecular Cloning - A Laboratory Manual (Tercera Edición), Sambrook y Russell (véanse en particular el Apéndice 8 y el Capítulo 5 en el mismo). En algunas realizaciones, la purificación implica precipitación con alcohol de ADN. Los alcoholes preferidos incluyen etanol e isopropanol. Las técnicas de purificación adecuadas incluyen también métodos de precipitación a base de sal. Por lo tanto, en realizaciones específicas la técnica de purificación de ADN comprende el uso de una alta concentración de sal para precipitar los contaminantes. La sal puede comprender, consistir esencialmente en o consistir de acetato de potasio y/o acetato de amonio, por ejemplo. El método puede incluir además las etapas de eliminación de contaminantes que han sido precipitados, seguido de la recuperación de ADN a través de precipitación con alcohol.

En realizaciones alternativas, la técnica de purificación de ADN se basa en el uso de disolventes orgánicos para extraer contaminantes de productos lisados celulares. Por lo tanto, en ciertas realizaciones, el método comprende el uso de fenol, cloroformo y alcohol isoamílico para extraer el ADN. Se emplean condiciones adecuadas para asegurar que los contaminantes se separan en la fase orgánica y que el ADN permanece en la fase acuosa.

En realizaciones específicas de estas técnicas de purificación, el ADN extraído se recupera a través de precipitación con alcohol, tal como precipitación con etanol o isopropanol.

La amplificación de ADN (utilizando PCR) a partir de fuentes naturales es a menudo inhibida por contaminantes co-

purificadas y diversos métodos adoptados para la extracción de ADN a partir de muestras ambientales están disponibles y proporcionan una alternativa para el aislamiento de ADN a partir de muestras fecales, de acuerdo con realizaciones específicas de la invención. Por ejemplo, el QIAamp DNA Stool Mini Kit de QIAGEN adsorbe sustancias que dañan el ADN e inhibidores de PCR presentes en la muestra mediante InhibitEX. Otros ejemplos para la aplicación a muestras fecales incluyen el Wizard Genomic DNA Purification Kit (Promega), el NucliSENS® easyMAG™ (Biomerieux) y kits de purificación de ácidos nucleicos fabricados por Macherey Nagel.

Los métodos de la invención pueden también, según sea apropiado, incorporar la cuantificación de ADN extraído/aislado/purificado en la muestra. La cuantificación del ADN en la muestra se puede lograr utilizando cualquier medio adecuado. La cuantificación de ácidos nucleicos puede estar basada, por ejemplo, en el uso de un espectrofotómetro, un fluorímetro o un transiluminador UV. Los ejemplos de las técnicas adecuadas se describen en textos convencionales tales como Molecular Cloning - A Laboratory Manual (Tercera Edición), Sambrook y Russell (véase en particular el Apéndice 8 en el mismo). En algunas realizaciones, se pueden emplear kits tales como el kit de cuantificación PicoGreen® dsDNA disponible de Molecular Probes, Invitrogen para cuantificar el ADN.

El autor de la presente invención ha determinado que las muestras fecales para su uso en la invención no tienen que estar necesariamente recién recogidas. Esto se aplica en particular para la realización de la etapa (b) y por lo tanto también los métodos adicionales de la invención comentados en la presente memoria, donde las modificaciones epigenéticas en genes específicos se determinan en muestras fecales. Por lo tanto, se pueden emplear muestras recogidas hace 1, 2, 3, 4, 5, 6 o más años. Las muestras históricas pueden haber sido congeladas para su almacenamiento. La congelación se lleva a cabo a una temperatura adecuada, tal como -20°C por ejemplo. La liofilización puede llevarse a cabo en ciertas realizaciones para permitir el almacenamiento de las muestras fecales. La muestra puede ser congelada sin la adición de un tampón estabilizante en ciertas realizaciones ya que se ha demostrado que esto no es necesario, cuando se congela la muestra, a fin de conservar la integridad del ADN en la muestra. En otras realizaciones, se puede añadir a la muestra antes y/o después del almacenamiento un tampón estabilizante adecuado como es conocido por los expertos en la técnica.

El autor de la presente invención también ha descubierto que se puede emplear con éxito una muestra de heces mínima, incluyendo una muestra mínima derivada de una muestra histórica como se comenta en la presente memoria, en los métodos de la invención. Esto es particularmente aplicable a la realización de la etapa (b) y por lo tanto también es aplicable a los aspectos adicionales de la invención descritos en la presente memoria donde se determinan las modificaciones epigenéticas en genes específicos, en muestras fecales. Por lo tanto, solo se necesita emplear una porción de una muestra fecal recogida en los métodos de la invención a fin de lograr resultados fiables. Se pueden lograr resultados fiables mediante el aislamiento, extracción o purificación de ADN de menos de 5 g de muestra fecal, en particular de aproximadamente 4, 3, 2, o 1 g de muestra fecal. La muestra fecal puede estar presente en un volumen apropiado de tampón de homogeneización para facilitar el aislamiento, extracción y purificación del ADN.

Como se comentó anteriormente, se pueden emplear kits disponibles comercialmente adecuados, tales como QIAamp DNA Stool Mini Kit, con el fin de extraer el ADN y eliminar los inhibidores potenciales encontrados en la muestra fecal. Esto puede implicar el procesamiento de volúmenes más pequeños de la muestra fecal total y el agrupamiento del ADN resultante en ciertas realizaciones. Por ejemplo, se pueden utilizar volúmenes de aproximadamente 1 ml o menos, tal como aproximadamente 750, 500, 250 o 100 µl para la extracción de ADN. El ADN resultante de 2, 3, 4, 5 o más extracciones se puede combinar para proporcionar una muestra de ADN total para evaluarla de acuerdo con los métodos de la invención. El ADN en la muestra, antes y/o después del agrupamiento se puede cuantificar según se requiera, como se comenta en la presente memoria.

La discusión detallada de la determinación de las modificaciones epigenéticas proporcionada en la presente memoria se aplica *mutatis mutandis* a este aspecto de la invención.

"El cáncer colorrectal", también denominado cáncer de colon o cáncer de intestino, se define para incluir tumores cancerosos, carcinomas, neoplasias graves y adenomas avanzados en el colon, el recto y el apéndice.

"Modificación epigenética" se define en la presente memoria para incluir cualquier alteración en el ADN, que da como resultado generalmente una disminución de la expresión génica, que está mediada por mecanismos distintos de alteraciones en la secuencia de nucleótidos primaria de un gen. Las modificaciones epigenéticas pueden, en determinadas circunstancias ser rasgos hereditarios estables. Están reconocidos varios mecanismos relacionados que causan alteración en la expresión génica e incluyen la metilación del ADN, cambios de histonas (p. ej., cambios en la acetilación de histonas) que pueden dar lugar a la remodelación de la cromatina y la interferencia de ARN, en muchos casos, la hipermetilación del ADN cambia incorrectamente genes críticos permitiendo que los cánceres se desarrollen y progresen. En realizaciones específicas, la modificación epigenética es metilación. En particular, se detecta metilación aberrante, que puede ser referida como hipermetilación, del gen o de los genes. Típicamente, el estatus de metilación se determina en las islas CpG adecuadas que se encuentran a menudo en la región promotora del gen o de los genes. El término "metilación", "estado de metilación" o "estatus de metilación" se refiere a la

presencia o ausencia de 5-metilcitosina en uno o en una pluralidad de dinucleótidos CpG dentro de una secuencia de ADN. Los dinucleótidos CpG se concentran típicamente en las regiones promotoras y exones de los genes humanos. Los dinucleótidos CpG sensibles a la metilación pueden encontrarse en la región promotora, exones e intrones de los genes humanos. Las regiones promotora, exónica e intrónica pueden todas ser evaluadas por lo tanto para determinar la metilación. Un "promotor" es una región que se extiende típicamente entre aproximadamente 1 Kb, 500 pb o 150 a 300 pb aguas arriba del sitio de inicio de la transcripción. En algunas realizaciones, la isla CpG circundante o situada alrededor del sitio de inicio de transcripción se analiza para determinar su estatus de metilación. Alternativamente, se puede determinar el estatus de metilación de las regiones exónicas e/o intrónicas según sea apropiado. La identificación de islas CpG, para evaluar para la determinación del estatus de metilación, es una cuestión de rutina para un experto en la técnica y están disponibles diversos mecanismos, incluyendo técnicas *in silico*.

Dado que la hipermetilación de un gen puede dar como resultado la disminución de la expresión génica, puede ser posible, en ciertas realizaciones, llevar a cabo los métodos de la invención mediante la determinación de la expresión génica del ADN en la muestra fecal, en lugar de investigar el estatus de metilación del ADN directamente. Están disponibles muchas técnicas adecuadas para la determinación de la expresión génica, ya sea a nivel de ARN o de proteína. En ciertas realizaciones, la expresión a nivel del ARN se determina mediante reacción en cadena de la polimerasa con transcriptasa inversa (RT-PCR). En realizaciones alternativas, la expresión se determina a nivel de proteína. Una vez más, se puede emplear cualquier técnica adecuada tal como la transferencia Western, ELISA etc.

La medición de la expresión del propio gen puede no indicar necesariamente de manera concluyente que el silenciamiento es epigenético, puesto que el mecanismo de silenciamiento genético podría ser, por ejemplo, por mutación somática. Por consiguiente, en ciertas realizaciones, los métodos de la invención incorporan un análisis de re-expresión apropiado que está diseñado para revertir silenciamiento epigenético. El tratamiento apropiado de la muestra utilizando un agente de desmetilación, tal como un inhibidor de ADN metiltransferasa (DMT) puede revertir el silenciamiento epigenético del gen relevante. Los reactivos adecuados incluyen, pero no se limitan a, DAC (5'-desazacitidina), TSA o cualquier otro tratamiento que afecte a los mecanismos epigenéticos presentes en las líneas celulares. Los reactivos adecuados se comentan en la presente memoria con respecto a la farmacogenética, el seguimiento del tratamiento y los aspectos de tratamiento de invención, cuya discusión se aplica *mutatis mutandis*. Típicamente, la expresión se reactiva o se invierte tras el tratamiento con tales reactivos, lo que indica que el silenciamiento es epigenético.

La determinación del estatus de metilación se puede lograr a través de cualquier medio adecuado. Los ejemplos adecuados incluyen la secuenciación genómica por bisulfito y/o la PCR específica de metilación. Diversos mecanismos para evaluar el estatus de metilación son conocidos en la técnica y se pueden utilizar en junto con la presente invención: secuenciación, PCR específica de metilación (MS-PCR), PCR específica de curva de fusión-metilación (McMS-PCR), MLPA con o sin tratamiento de bisulfito, QAMA (Zeschnig et al, 2004), MSRE-PCR (Melnikov et al, 2005), MethyLight (Eads et al., 2000), ConLight-MSP (Rand et al., 2002), PCR específica de metilación específica de conversión por bisulfito (BS-MSP) (Sasaki et al, 2003), COBRA (que se basa en el uso de enzimas de restricción para revelar diferencias en la secuencia dependientes de metilación en productos de PCR de ADN tratado con bisulfito de sodio), conformación de extensión del cebador de un solo nucleótido sensible a la metilación (MS-SNuPE), análisis de conformación de cadena sencilla sensible a la metilación (MS-SSCA), análisis de restricción por bisulfito combinado con la curva de fusión (McCOBRA) (Akey et al., 2002), PyroMethA, HeavyMethyl (Cottrell et al. 2004), MALDI-TOF, MassARRAY, análisis cuantitativo de alelos metilados (QAMA), análisis de metilación regional enzimática (ERMA), secuenciación QBSUPT, MethyQuant, PCR cuantitativa y sistemas de micromatrices basadas en oligonucleótidos, Pirosecuenciación, Meth-DOP-PCR. Una revisión de algunas técnicas útiles para el análisis de metilación del ADN se proporciona en Nucleic Acids Research, 1998, Vol. 26, Núm. 10, 2255-2264, Nature Reviews, 2003, Vol. 3, 253-266; Oral Oncology, 2006, vol. 42, 5-13.

Las técnicas para evaluar el estatus de metilación se basan en enfoques distintos. Algunos incluyen el uso de endonucleasas. Tales endonucleasas pueden escindir preferentemente sitios de reconocimiento metilados con respecto a sitios de reconocimiento no metilados o escindir preferentemente sitios de reconocimiento no metilados con respecto a metilados. Algunos ejemplos de los primeros son Acc III, Ban I, BstN I, Msp I y Xma I. Los ejemplos de los últimos son Acc II, Ava I, BssH II, BstU I, Hpa II, y Not I. Las diferencias en el patrón de escisión son indicativos de la presencia o ausencia de un dinucleótido CpG metilado. Los patrones de escisión se pueden detectar directamente, o después de una reacción adicional que crea productos que son fácilmente distinguibles. Los medios que detectan el tamaño y/o la carga alterada se pueden utilizar para detectar productos modificados, incluyendo, pero no limitados a electroforesis, cromatografía y espectrometría de masas.

Alternativamente, la identificación de los dinucleótidos CpG metilados puede utilizar la capacidad del dominio de unión a metilo (MBD) de la proteína MeCP2 para unirse selectivamente a secuencias de ADN metilado (Cross et al, 1994; Shiraishi et al, 1999). El MBD también se puede obtener de MBP, MBP2, MBP4, poli-MBD (Jorgensen et al., 2006) o a partir de reactivos tales como anticuerpos que se unen al ácido nucleico metilado. El MBD se puede inmovilizar en una matriz sólida y se utiliza para la cromatografía de columna preparativa para aislar secuencias de

ADN altamente metiladas. Las formas variantes tales como el dominio de unión metil-CpG marcado con His expresado se pueden utilizar para unirse selectivamente a secuencias de ADN metiladas. Eventualmente, se ponen en contacto ADN genómico digerido con endonucleasas de restricción con el dominio de unión metil-CpG marcado con His expresado. Otros métodos son bien conocidos en la técnica e incluyen, entre otros el análisis de recuperación de islas CpG metiladas (MIRA). Otro método, MB-PCR, utiliza un polipéptido de unión a metil-CpG bivalente, recombinante inmovilizado en las paredes de un recipiente de PCR para capturar ADN metilado y la posterior detección de ADN metilado unido mediante PCR.

Enfoques adicionales para detectar motivos de dinucleótidos CpG metilados utilizan reactivos químicos que modifican selectivamente la forma metilada o la forma no metilada de motivos de dinucleótidos CpG. Los reactivos químicos adecuados incluyen hidrazina e iones bisulfito. Los métodos de la invención utilizan preferiblemente iones bisulfito. La conversión de bisulfito se basa en el tratamiento de muestras de ADN con bisulfito sódico que convierte la citosina no metilada en uracilo, mientras que se mantienen las citosinas metiladas (Furuichi et al., 1970). Esta conversión finalmente da como resultado un cambio en la secuencia del ADN original. Es de conocimiento general que el uracilo resultante tiene el comportamiento de apareamiento de las bases de timidina que difiere del comportamiento apareamiento de las bases de citosina. Esto hace posible la discriminación entre citosinas metiladas y no metiladas. Los mecanismos convencionales útiles de la biología molecular y química de ácidos nucleicos para la evaluación de diferencias en las secuencias son bien conocidos en la técnica y se explican en la bibliografía. Véase, por ejemplo, Sambrook, J., et al, *Molecular cloning: A Laboratory Manual*, (2001) 3ª edición, Cold Spring Harbor, NY; Gait, M. J. (ed.), *Oligonucleotide Synthesis, A Practical Approach*, IRL Press (1984); Hames B. D., y Higgins, S. J. (eds.), *Nucleic Acid Hybridization, A Practical Approach*, IRL Press (1985); y la serie, *Methods in Enzymology*, Academic Press, Inc.

Algunas técnicas utilizan cebadores para evaluar el estatus de metilación de los dinucleótidos CpG. Son posibles dos enfoques para el diseño del cebador. En primer lugar, se pueden diseñar cebadores que no cubran los sitios potenciales de metilación del ADN. Las variaciones de secuencia en los sitios de metilación diferencial se encuentran entre los dos cebadores y la visualización de la variación de la secuencia requiere etapas de ensayo adicionales. Tales cebadores se utilizan en la secuenciación genómica por bisulfito, COBRA, Ms-SNuPE y varias otras técnicas. En segundo lugar, se pueden diseñar cebadores que hibridan específicamente con la versión metilada o no metilada de la secuencia tratada inicial. Después de la hibridación, se puede llevar a cabo una reacción de amplificación y analizar los productos de amplificación mediante cualquier sistema de detección conocido en la técnica. La presencia de un producto de amplificación indica que una muestra hibrida con el cebador. La especificidad del cebador indica si el ADN había sido modificado o no, lo que a su vez indica si el ADN había sido metilado o no. Si hay una suficiente región de complementariedad, por ejemplo, 12, 15, 18, o 20 nucleótidos, con la diana, en ese caso el cebador puede contener también residuos de nucleótidos adicionales que no interfieren con la hibridación, pero pueden ser útiles para otras manipulaciones. Los ejemplos de tales otros residuos pueden ser sitios para la escisión con endonucleasa de restricción, para la unión al ligando o para la unión a factores o conectores o repeticiones. Los cebadores de oligonucleótidos pueden ser o no tales que son específicos para los residuos metilados modificados.

Una manera adicional para distinguir entre ácido nucleico modificado y no modificado es utilizar sondas oligonucleotídicas. Tales sondas pueden hibridar directamente con el ácido nucleico modificado o a otros productos de ácido nucleico modificado, tales como productos obtenidos mediante amplificación. Los análisis basados en sondas explotan la hibridación de oligonucleótidos a secuencias específicas y la detección posterior del híbrido. También puede haber etapas de purificación adicionales antes de que se detecte el producto de amplificación, p. ej., una etapa de precipitación. Las sondas oligonucleotídicas pueden marcarse utilizando cualquier sistema de detección conocido en la técnica. Estos incluyen, pero no se limitan a radicales fluorescentes, radicales de radioisótopos marcados, radicales bioluminiscentes, radicales luminiscentes, radicales quimioluminiscentes, enzimas, sustratos, receptores, o ligandos.

En el enfoque de MSP, el ADN se puede amplificar utilizando pares de cebadores diseñados para distinguir ADN metilada de no metilado mediante el aprovechamiento de las diferencias de secuencia como resultado de tratamiento con bisulfito de sodio (Herman et al., 1996; y documento WO 97/46705). Por ejemplo, los iones bisulfito modifican bases de citosina no metiladas, cambiándolas a bases de uracilo. Las bases de uracilo hibridan con las bases de adenina en condiciones de hibridación. Así, un cebador oligonucleotídico que comprende bases de adenina en lugar de bases de guanina hibridaría con el ADN modificado por bisulfito, mientras que un cebador oligonucleotídico que contiene las bases de guanina hibridaría con los residuos de citosina no modificados (metilados) en el ADN. La amplificación utilizando una polimerasa de ADN y un segundo cebador proporciona productos de amplificación que pueden ser observados fácilmente, lo que a su vez indica si el ADN había sido metilado o no. Si bien la PCR es un método de amplificación preferido, las variantes de esta técnica básica tales como la PCR anidada y la PCR múltiple también se incluyen dentro del alcance de la invención.

Como se mencionó anteriormente, una realización preferida para evaluar el estatus de metilación del gen relevante requiere amplificación para producir productos de amplificación. La presencia de productos de amplificación puede

evaluarse directamente utilizando métodos bien conocidos en la técnica. Estos simplemente pueden ser visualizados en un gel adecuado, tal como un gel de agarosa o de poliacrilamida. La detección puede implicar la unión de colorantes específicos, tales como bromuro de etidio, que se intercalan en el ADN de doble cadena y la visualización de las bandas de ADN bajo un iluminador de UV, por ejemplo. Otro medio para detectar productos de amplificación comprende la hibridación con sondas oligonucleotídicas. Alternativamente, la transferencia de fluorescencia o de energía se puede medir para determinar la presencia del ADN metilado.

Un ejemplo específico de la técnica de MSP se denomina MSP cuantitativa en tiempo real (QMSP), y permite la cuantificación fiable de ADN metilado en tiempo real o en el punto final. Los métodos en tiempo real se basan generalmente en el seguimiento óptico continuo de un procedimiento de amplificación y utilizan reactivos marcados fluorescentemente cuya incorporación a un producto se puede cuantificar y cuya cuantificación es indicativa del número de copias de esa secuencia en el molde. Uno de tales reactivos es un colorante fluorescente, llamado SYBR Green I que se une preferentemente ADN de doble cadena y cuya fluorescencia aumenta sumamente por la unión de ADN de doble cadena. Alternativamente, los cebadores marcados y/o las sondas marcadas se pueden utilizar para la cuantificación. Representan una aplicación específica de las técnicas de amplificación en tiempo real bien conocidos y disponibles comercialmente, tales como TAQMAN®, MOLECULAR BEACONS®, AMPLIFLUOR® y SCORPION DzyNA®, Plexor™ etc. En los sistemas de PCR en tiempo real, es posible controlar la reacción de PCR durante la fase exponencial en la que el primer aumento significativo de la cantidad de producto de PCR se correlaciona con la cantidad inicial de molde diana.

En realizaciones específicas, se utiliza PCR/amplificación específica de metilación. Esto puede llevarse a cabo en tiempo real o en el punto final. La PCR/amplificación en tiempo real o de punto final pueden implicar el uso de cebadores en horquilla (Amplifluor), sondas en horquilla (Molecular Beacons), sondas hidrolíticas (Taqman), pares de sondas FRET (Lightcycler), cebadores que incorporan una sonda de horquilla (Scorpion), colorantes fluorescentes (SYBR Green etc.), cebadores que incorporan la secuencia complementaria de una ADNzima y un sustrato de ADNzima fluorescente escindible o bloqueadores de oligonucleótidos, por ejemplo.

La PCR en tiempo real detecta la acumulación de amplicones durante la reacción. Sin embargo no se necesita utilizar los métodos en tiempo real. Muchas aplicaciones no requieren la cuantificación y la PCR en tiempo real solo se utiliza como una herramienta para obtener presentación y almacenamiento convenientes de resultados, y al mismo tiempo para evitar la manipulación post-PCR. Por lo tanto, los análisis solo se pueden realizar para confirmar si el ADN diana está presente o no en la muestra. Dicha verificación de punto final se lleva a cabo después de que la reacción de amplificación ha finalizado. Este conocimiento puede ser utilizado en un laboratorio de diagnóstico médico para detectar una predisposición a, o la incidencia de cáncer en un paciente. Las técnicas de detección de fluorescencia por PCR de punto final pueden utilizar los mismos enfoques tan ampliamente utilizado para la PCR en tiempo real. Por ejemplo, detector «génico» permite la medición de la fluorescencia directamente en tubos de PCR.

En las realizaciones en tiempo real, la cuantificación puede ser sobre una base absoluta, o puede ser relativa a un patrón de ADN metilado constitutivamente, o puede ser relativa a nivel de ADN no metilado. El estatus de metilación puede ser determinado mediante el uso de la razón entre la señal del marcador bajo investigación y la señal de un gen de referencia donde que el estatus de metilación es conocido (tal como β -actina por ejemplo), o mediante el uso de la razón entre el marcador metilado y el suma del marcador metilado y el no metilado. Alternativamente, se puede determinar el número de copias absoluto del gen marcador metilado.

Se puede necesitar incorporar controles adecuados con el fin de asegurar que el método elegido está funcionando correctamente y de forma fiable. Los controles adecuados pueden incluir la evaluación del estatus de metilación de un gen conocido que vaya a ser metilado. Este experimento actúa como un control positivo para asegurar que no se obtienen resultados falsos negativos. El gen puede ser uno que se sabe que está metilado en la muestra bajo investigación o puede haber sido metilado artificialmente, por ejemplo mediante el uso de una enzima metiltransferasa adecuada, tal como SssL metiltransferasa.

Adicional o alternativamente, se pueden emplear controles negativos adecuados con los métodos de la invención. Aquí, los controles adecuados pueden incluir evaluar el estatus de metilación de un gen que se sabe que no está metilado o un gen que ha sido desmetilado artificialmente. Este experimento actúa como un control negativo para asegurar que no se obtienen resultados falsos positivos.

Mientras que la PCR es la técnica de amplificación de ácido nucleico preferida, también se pueden utilizar otras técnicas de amplificación para detectar el estatus de metilación del gen en cuestión. Tales mecanismos de amplificación son bien conocidos en la técnica, e incluyen métodos tales como NASBA (Compton, 1991), 3SR (Fahy et al., 1991) y amplificación mediada por transcripción (TMA). Otros métodos de amplificación adecuados incluyen la reacción en cadena de la ligasa (LCR) (Barringer et al., 1990), la amplificación selectiva de secuencias de polinucleótidos diana (Patente de los Estados Unidos Núm. 6.410.276), reacción en cadena de la polimerasa cebada con secuencia consenso (Patente de los Estados Unidos Núm. 4.437.975), reacción en cadena de la polimerasa cebada arbitrariamente (documento WO 90/06995), tecnología invasora, tecnología de desplazamiento de la hebra,

y amplificación por desplazamiento de mella (documento WO 2004/067726). Esta lista no pretende ser exhaustiva; se puede utilizar cualquier técnica de amplificación de ácido nucleico siempre que se amplifique específicamente el producto de ácido nucleico apropiado. Por lo tanto, estas técnicas de amplificación pueden estar vinculados a MSP y/o a técnicas de secuenciación por bisulfito, por ejemplo.

En realizaciones específicas, los métodos utilizan cebadores seleccionados a partir de cebadores que comprenden, que consisten esencialmente en o que consisten en las secuencias de nucleótidos expuestas en la Tabla 1. Los pares de cebadores adecuados pueden seleccionarse a partir de los cebadores enumerados en la tabla basándose en el gen o los genes de interés. En realizaciones específicas, los métodos utilizan cebadores seleccionados a partir de cebadores que comprenden, que consisten esencialmente en o que consisten en las secuencias de nucleótidos expuestas como SEC ID NO: 1 y 2 (PHACTR3), 4 y 5 (FOX1), y 7 y 8 (NDRG4) con el fin de detectar el estatus de metilación en el ADN. Estos cebadores son particularmente útiles en los métodos de detección basados en MSP. Cada uno de los cebadores cubre uno o más sitios de metilación y es específico para la secuencia metilada después del tratamiento con bisulfito.

En ciertas realizaciones, los métodos utilizan sondas seleccionadas a partir de las sondas que comprenden, que consisten esencialmente en o que consisten en las secuencias de nucleótidos expuestas en la Tabla 1. Las sondas adecuadas se pueden seleccionar a partir de las sondas enumeradas en la tabla basada en el gen o genes de interés. En realizaciones específicas, los métodos utilizan sondas seleccionadas a partir de las sondas que comprenden, que consisten esencialmente en o que consisten en las secuencias de nucleótidos expuestas como SEC ID NO: 3 (PHACTR3), 6 (FOX1), y 9 (NDRG4) con el fin de detectar el estatus de metilación en el ADN. Cada una de las sondas cubre uno o más sitios de metilación y es específica para la secuencia metilada después del tratamiento con bisulfito. Las sondas se pueden utilizar combinadas con los cebadores enumerados anteriormente en las realizaciones específicas. Las sondas pueden ser marcadas fluorescentemente, en particular con un fluoróforo donador y un aceptor (o extintor) para permitir que se produzca FRET y permitir la detección en tiempo real o de punto final. Un ejemplo de un radical donador es FAM y un ejemplo de un radical aceptor o extintor es DABCYL.

Los métodos de la invención se realizan utilizando una muestra fecal. En ciertas realizaciones, una sola muestra fecal se utiliza como la fuente de la muestra para (a) y (b). Sin embargo, puede ser necesario dividir la muestra para permitir llevar a cabo (a) y (b). Por lo tanto puede ser necesario tratar la muestra en diferentes grados con el fin de permitir llevar a cabo las etapas separadas. Como resultado, después de obtener la muestra fecal, la muestra puede ser repartida adecuadamente para permitir que se lleven a cabo las pruebas de ADN y de proteína por separado.

En el contexto de estos métodos de la invención, existe el requisito del procesamiento apropiado de la muestra, ya que se pueden realizar en una sola muestra dos técnicas de detección separadas. Para cumplir este requisito, la invención proporciona un método de procesamiento de la muestra, antes de llevar a cabo un método de la invención (pruebas (a) y (b)), que comprenden la separación de una porción de una muestra fecal recogida y la adición de la porción separada de la muestra a un tampón que evita la desnaturalización o degradación de las proteínas de la sangre que se encuentran en la muestra. La muestra fecal se puede recoger en el domicilio por el sujeto. Esto puede implicar la defecación en un recipiente adecuado. A partir de esta muestra se separa una porción suficiente de la muestra. Esta porción separada se añade a continuación a un recipiente adecuado, que ya puede contener un tampón. Alternativamente, el tampón se puede añadir a la porción eliminada de la muestra o (poco) después. Así pues, la porción eliminada se prepara para la realización de la etapa (a), a saber, la detección de la presencia de sangre en la muestra fecal, en donde la detección de la presencia de sangre es indicativa de una predisposición a, o la incidencia de, cáncer colorrectal, en esta muestra. El tampón evita la desnaturalización o degradación de proteínas de la sangre encontradas en la muestra. Los tampones adecuados para la preservación de la proteína son conocidos en la técnica y están disponibles comercialmente. La porción restante de la muestra puede permanecer en el recipiente en el que se recogió originalmente, antes de llevar a cabo la etapa (b), es decir, la detección de una modificación epigenética en el ADN contenido dentro de la muestra fecal, en donde la detección de la modificación epigenética es indicativa de una predisposición a, o la incidencia de, cáncer colorrectal. Los tampones adecuados para mantener la integridad del ADN se pueden añadir a la porción restante de la muestra, en ciertas realizaciones. Las muestras separadas se pueden marcar de forma adecuada para garantizar que se están emparejadas correctamente durante el posterior procesamiento, incluyendo el análisis y la comparación de datos.

Tras la recogida de la muestra y el procesamiento adecuado, el método puede comprender adicionalmente el envío o la entrega de otro modo de la porción eliminada de la muestra fecal recogida a un laboratorio para realizar la etapa (a) del método, como se define aquí, sobre la porción separada de la muestra fecal recogida. El envío o la entrega de otro modo puede ocurrir dentro de cualquier marco temporal adecuado después de la recogida de la muestra. En ciertas realizaciones, el envío o la entrega de otro modo puede ocurrir en el plazo de 6, 12, 24, 48 o 72 horas desde la recogida de la muestra. El método puede comprender adicionalmente a continuación, realizar la etapa (a) del método sobre la porción separada de la muestra fecal recogida una vez que ha sido entregada. Según se ha descrito en la presente memoria, la etapa (b) solamente se puede realizar en un subconjunto específico de muestras en las que se detecta sangre a bajos niveles. Por lo tanto, los métodos de procesamiento de la muestra pueden

implicar la clasificación aquellas muestras con detección de bajos niveles de sangre detectados en la etapa (a) (como se define en la presente memoria) para someterlas a ensayo en la etapa (b). Las porciones restantes apropiadas de las muestras recogidas en las que no requiere la etapa (b) (es decir, cuando no se requiere una confirmación del resultado en la etapa (a) - ya sea porque no se detecta sangre o el nivel de la sangre está por encima de la normalmente umbral empleado (tal como 200 ng/ml)) pueden en ese caso ser desechadas según sea apropiado.

Del mismo modo, después de la recogida de la muestra y el procesamiento adecuado, el método puede comprender adicionalmente el envío o la entrega de otro modo de la porción restante de la muestra fecal recogida a un laboratorio para realizar la etapa (b) del método, como se define en la presente memoria, sobre la porción restante de la muestra fecal recogida. El envío o la entrega de otro modo se puede producir dentro de cualquier marco temporal adecuado después de la recogida de la muestra. En ciertas realizaciones, el reenvío o la entrega de otro modo se puede producir en el plazo de 6, 12, 24, 48 o 72 horas desde la recogida de la muestra. El método puede comprender adicionalmente, a continuación, realizar la etapa (b) del método sobre la porción restante de la muestra fecal recogida una vez que ha sido entregada.

En ciertas realizaciones, el reenvío o la entrega de otro modo de las porciones separadas y restantes de la muestra fecal recogida pueden llevarse a cabo en la misma ubicación, opcionalmente al mismo tiempo. Este es el caso en el que el mismo laboratorio está llevando a cabo ambas etapas (a) y (b) que puede ser el caso en el que el laboratorio tiene la capacidad para llevar a cabo ambos tipos de prueba

Como se comenta en la presente memoria, las muestras fecales para su uso en la invención no tienen que estar necesariamente recién recogidas. La discusión anterior se aplica aquí *mutatis mutandis*. Del mismo modo, se puede emplear con éxito una muestra de heces mínima, incluyendo una muestra mínima derivada de una muestra histórica como se discute en la presente memoria en los métodos de la invención. Esto es particularmente aplicable a la realización de la etapa (b) (es decir, en la porción restante de la muestra fecal). Una vez más, la discusión anterior se aplica aquí *mutatis mutandis*, incluyendo en relación con la puesta en común de las muestras durante el procedimiento de extracción de ADN. El requisito de muestras mínimas o porcionadas para la etapa (b) puede ser ventajoso al permitir utilizar más muestra para llevar a cabo la etapa (a), mejorando potencialmente la sensibilidad de la etapa (a).

Como se muestra en la presente memoria, la determinación estatus de metilación basado en un panel de al menos dos genes seleccionados de PHACTR3, NDRG4 y FOXE1 puede proporcionar la detección sensible y específica de cáncer colorrectal.

También se muestra en la presente memoria que la metilación de LAMA1 y CDO1 está vinculada a la incidencia del cáncer colorrectal. Estos genes no han sido previamente relacionado con el cáncer colorrectal.

También se presenta evidencia en la presente memoria de que la metilación de GPNMB y MMP2 está relacionada con el cáncer colorrectal, en particular, sobre la base de muestras fecales.

En realizaciones específicas, se utiliza PCR/amplificación específica de metilación. Esto puede llevarse a cabo en tiempo real o en el punto final. La PCR/amplificación en tiempo real o de punto final puede implicar el uso de cebadores en horquilla (Amplifluor), sondas de horquilla (Molecular Beacons), sondas hidrolíticas (Taqman), pares de sondas FRET (Lightcycler), cebadores que incorporan una sonda en horquilla (Scorpion), colorantes fluorescentes (SYBR Green etc.), cebadores que incorporan la secuencia complementaria de una ADNzima y un sustrato de ADNzima fluorescente escindible o bloqueadores de oligonucleótidos, por ejemplo. Los métodos pueden aplicar cebadores y sondas adecuados seleccionados de la tabla 1. En realizaciones específicas, los métodos utilizan cebadores seleccionados a partir de cebadores que comprenden, que consisten esencialmente en o que consisten en las secuencias de nucleótidos expuestas como SEC ID NO: 1 y 2 (PHACTR3), 4 y 5 (FOXE1), y 7 y 8 (NDRG4). En realizaciones adicionales, los métodos utilizan sondas seleccionadas entre las sondas que comprenden, que consisten esencialmente en o que consisten en las secuencias de nucleótidos expuestas como SEC ID NO: 3 (PHACTR3), 6 (FOXE1), y 9 (NDRG4). En otras realizaciones, los métodos utilizan cebadores seleccionados a partir de cebadores que comprenden las secuencias de nucleótidos expuestas como SEQ ID NOS: 28 y 29 (LAMA1) y 34 y 35 (CDO1). En realizaciones relacionadas adicionales, los métodos utilizan sondas seleccionadas entre las sondas que comprenden las secuencias de nucleótidos expuestas como SEC ID NO: 30 (LAMA1) y 36 (CDO1). En otras realizaciones, los métodos utilizan cebadores seleccionados a partir de cebadores que comprenden las secuencias de nucleótidos expuestas como SEQ ID NOS: 22 y 23 (GPNMB) y 31 y 32 (MMP2). En realizaciones relacionadas, los métodos utilizan sondas seleccionadas a partir de las sondas que comprenden las secuencias de nucleótidos expuestas como SEC ID NO: 24 (GPNMB) y 33 (MMP2).

Estos métodos de la invención pueden ser métodos *ex vivo* o *in vitro* llevados a cabo en una muestra de ensayo. Los métodos pueden ser no invasivos. Los métodos pueden ser utilizados para identificar cualquier estadio del cáncer colorrectal, incluyendo pre-tumores malignos, tales como adenomas que pasan a carcinomas (véase la definición de

cáncer colorrectal en la presente memoria).

La "muestra" en la que se detecta la modificación epigenética puede comprender, consistir esencialmente en o consistir en una muestra de tejido, una muestra fecal o una muestra de sangre. En realizaciones preferidas, la muestra es una muestra fecal. Las muestras históricas (tales como las recogidas hace al menos aproximadamente 1 año) y las muestras pequeñas (como las de aproximadamente 1 g) pueden ser útiles en los métodos de la invención, como se discute en la presente memoria (cuya discusión se aplica *mutatis mutandis*). En realizaciones específicas, la muestra de tejido comprende, consiste esencialmente en o consiste en una muestra de colon y/o recto y/o apéndice. Sin embargo, la muestra puede ser de cualquier muestra representativa de tejido, fluido corporal, precipitado de fluido corporal o muestra de lavado, según se requiera, siempre que la detección de la modificación epigenética en la muestra proporcione un indicador fiable de cáncer colorrectal. La muestra puede ser obtenida de un sujeto humano. Las muestras de ensayo para usos medicinales de diagnóstico, pronóstico, o personalizados se pueden obtener a partir de muestras quirúrgicas, tales como biopsias o aspirados con aguja fina, a partir de tejidos embebidos en parafina, a partir de muestras de tejido tumoral congelado, a partir de muestras de tejido tumoral fresco, a partir de un fluido corporal fresco o congelado, por ejemplo. Los ejemplos no limitantes incluyen sangre completa, médula ósea, fluido espinal cerebral, fluido peritoneal, fluido pleural, fluido linfático, suero, plasma, orina, quilo, heces, eyaculado, esputo, aspirado de pezón, saliva, especímenes de hisopos, especímenes lavado o líquido de lavado y/o cepillo.

Estos métodos también pueden incluir la etapa de obtención de la muestra de ensayo, en ciertas realizaciones. La muestra de tejido o muestra líquida que comprende el ácido nucleico pueden ser lisadas o necesitan ser concentradas para crear una mezcla de compuestos biológicos que comprenden ácidos nucleicos y otros componentes. Alternativamente, se puede necesitar limpiar el ácido nucleico de proteínas u otros contaminantes, por ejemplo, por medio de tratamiento con proteinasa K. Los procedimientos para lisar o concentrar muestras biológicas son conocidos por el experto en la técnica y pueden ser de naturaleza química, enzimática o física. También puede ser aplicable una combinación de estos procedimientos. Por ejemplo, la lisis se puede realizar utilizando ultrasonidos, alta presión, fuerzas de cizallamiento, álcali, detergentes o disoluciones salinas caotrópicas, o proteasas o lipasas. Para el procedimiento de lisis para obtener ácidos nucleicos, o la concentración de ácido nucleico a partir de las muestras, se puede hacer referencia a Sambrook, J., et al., *Molecular cloning: A Laboratory Manual*, (2001) 3ª edición, Cold Spring Harbor Laboratory Press, Cold Spring Harbor, Nueva York Ausubel, F.M., et al., *Current Protocols in Molecular Biology* (1987), J. Wiley and Sons, Nueva York.

La muestra de ensayo se obtiene generalmente de un sujeto (humano) sospechoso de ser tumorigénico. Alternativamente, la muestra de ensayo se obtiene a partir de un sujeto sometido a examen de rutina y que no necesariamente es sospechoso de tener una enfermedad. Por lo tanto los pacientes en situación de riesgo pueden ser identificados antes de que la enfermedad tenga una oportunidad de manifestarse en términos de síntomas identificables en el paciente. Alternativamente, la muestra se obtiene a partir de un sujeto que está experimentando tratamiento, o de pacientes que están siendo revisados para determinar la recurrencia de la enfermedad.

Los cánceres caracterizados por la hipermetilación de genes supresores de tumores pueden ser tratados mediante la reducción de la metilación dentro de las células tumorales. Se pueden emplear diversos agentes para este propósito, incluyendo agentes de desmetilación de ADN, inhibidores de la ADN metiltransferasa e inhibidores de HDAC.

Para cada uno de estos aspectos adicionales, las realizaciones y características opcionales de los métodos de la invención se aplican *mutatis mutandis* y no se repiten por razones de concisión. Por lo tanto, se pueden emplear adecuadamente todos los métodos para detectar una modificación epigenética en el ADN, en particular en los genes especificados, incluyendo análisis basados en la expresión y re-expresión.

La invención también se refiere a kits correspondientes para llevar a cabo los métodos de la invención. Por lo tanto, la invención proporciona un kit para detectar una predisposición a, o la incidencia de, cáncer colorrectal en una muestra fecal que comprende:

- (a) medios para detectar la presencia de sangre en la muestra fecal, en donde la detección de la presencia de sangre es indicativa de una predisposición a, o la incidencia de, cáncer colorrectal, y
- (b) cebadores y/o sondas que permitan que se determine directamente el estatus de metilación de al menos un gen seleccionado entre NDRG4, PHACTR3, FOXE1, GATA4, GPNMB, TFPI2, SOX17, SYNE1, LAMA, MMP2, OSMR, SFRP2 y CDO1 en el ADN, en donde la detección del estatus de metilación es indicativo de una predisposición a, o la incidencia de, cáncer colorrectal.

En otras realizaciones, se detecta el estatus de metilación en al menos un gen seleccionado entre PHACTR3, NDRG4 y FOXE1. El estatus de metilación puede ser detectado en un panel de al menos dos genes seleccionados entre PHACTR3, NDRG4 y FOXE1, con detección del estatus de metilación en al menos uno de los genes que

proporcionan una indicación de una predisposición a, o la incidencia de, cáncer colorrectal. El estatus de metilación puede ser detectado en un grupo de genes que comprenden, que consisten esencialmente en o que consisten en PHACTR3, NDRG4 y FOXE1, NDRG4 y FOXE1, PHACTR3 y NDRG4 o PHACTR3 y FOXE1. En algunas realizaciones, los cebadores y/o sondas que permiten detectar el estatus de metilación en el panel de genes permiten llevar a cabo la detección en una sola reacción. Así, los medios pueden permitir la multiplexación.

En realizaciones adicionales, se detecta el estatus de metilación en al menos un gen seleccionado entre LAMA1 y CDO1. Los cebadores y sondas adecuados se exponen en la tabla 1.

En realizaciones adicionales, se detecta el estatus de metilación en al menos un gen seleccionado entre GPNMB y MMP2. Los Cebadores y sondas adecuados se exponen en la tabla 1.

En realizaciones específicas, los cebadores se seleccionan entre cebadores que comprenden, consisten esencialmente en o consisten en las secuencias de nucleótidos expuestas en la Tabla 1. Los pares de cebadores adecuados pueden ser seleccionados entre los cebadores mostrados en la tabla basándose en el gen o genes de interés. En realizaciones específicas, los kits incorporan cebadores seleccionados entre cebadores que comprenden, que consisten esencialmente en, o que consisten en las secuencias de nucleótidos expuestas como SEC ID NO: 1 y 2 (PHACTR3), 4 y 5 (FOXE1), y 7 y 8 (NDRG4). En otras realizaciones específicas, las sondas se seleccionan entre sondas que comprenden, que consisten esencialmente en o que consisten en las secuencias de nucleótidos expuestas en la Tabla 1. Las sondas adecuadas se pueden seleccionar entre las sondas enumeradas en la tabla basándose en el gen o genes de interés. En realizaciones específicas, los kits incorporan sondas seleccionadas entre las sondas que comprenden, que consisten esencialmente en o que consisten en las secuencias de nucleótidos expuestas como SEC ID NO: 3 (PHACTR3), 6 (FOXE1), y 9 (NDRG4).

El kit puede contener cualquier medio adecuado para permitir la detección de sangre en una muestra fecal. En realizaciones concretas, los medios para detectar la presencia de sangre en la muestra fecal comprenden medios para la detección de hemoglobina en la muestra fecal. Estos pueden ser medios cromogénicos o inmunoquímicos. Por lo tanto, se puede incorporar goma de guayaco a los kits para la detección cromogénica. Los anticuerpos anti-hemoglobina alternativamente adecuados, como se discute en la presente memoria, se pueden incorporar a los kits de la invención. Estos componentes pueden ser proporcionados junto con tampones adecuados etc. Como sería fácilmente apreciado por un experto en la técnica.

Los kits de la invención también pueden contener otros elementos para facilitar la recolección y procesamiento de la muestra. Así, en ciertas realizaciones, el kit comprende adicionalmente un recipiente sellable para la recogida de una muestra fecal. Este recipiente puede ser de un tamaño y construcción que permitan que un sujeto defeque directamente en el recipiente. También se puede proporcionar un recipiente adicional al que puede añadir una porción separada de la muestra para permitir que la etapa (a) se realice sobre esta muestra separada. Como se mencionó en la sección de métodos, este recipiente puede contener o ser suministrado con un tampón apropiado para la conservación de la proteína (para evitar la desnaturalización o degradación de las proteínas). El kit también puede contener medios adecuados para la transferencia de la porción separada de la muestra al segundo recipiente. En vista del hecho de que la invención se puede realizar utilizando solo una pequeña porción de la muestra fecal (recogida total), como se discute en la presente memoria (p. ej., utilizando tan poco como aproximadamente 1 g de heces para llevar a cabo la extracción de ADN), el segundo recipiente puede ser dimensionado adecuadamente para contener tal muestra mínima/porcionada. El segundo recipiente puede estar provisto de un dispositivo de recogida adecuado, adaptado para recuperar y/o depositar una muestra mínima/porcionada apropiada (como se describe en la presente memoria, de aproximadamente 5, 4, 3, 2 o 1 g o menos). Los tubos y cucharas adecuados para su inclusión en tal kit son conocidos en la técnica y están disponibles comercialmente. Las cucharas pueden ser cucharas medidoras y pueden estar integradas en los tubos en ciertas realizaciones. El recipiente puede estar dimensionado de tal manera que se puede añadir un volumen adecuado de tampón de homogeneización (como se discute en la presente memoria, cuya discusión se aplica *mutatis mutandis*) a la muestra mínima/porcionada añadida al recipiente.

En realizaciones adicionales, el kit, o más específicamente los medios para detectar una modificación epigenética en el ADN, comprende además medios para procesar una muestra fecal. Los medios para el procesamiento de una muestra fecal comprenden un tampón de homogeneización en ciertas realizaciones. Los tampones de homogeneización adecuados son conocidos en la técnica y están disponibles comercialmente. En realizaciones relacionadas, los medios para el procesamiento de una muestra fecal comprenden reactivos para la extracción/aislamiento/concentración/purificación del ADN. Como ejemplo, el kit QIAamp DNA para heces disponible de Qiagen incluye componentes adecuados para la purificación de ADN total a partir de muestras fecales frescas o congeladas.

Con el fin de permitir la determinación del estatus de metilación del ADN, los kits pueden comprender adicionalmente un reactivo que modifica selectivamente los residuos de citosina no metilados en el ADN contenido en la muestra para producir residuos modificados detectables, pero que no modifica residuos de citosina metilados. Como se

discutió anteriormente, esto permite diferencias en la secuencia que va a ser detectada como una indicación del estatus de metilación del ADN. Se puede emplear cualquier reactivo adecuado. Muchos ejemplos son conocidos en la técnica y están disponibles comercialmente. En ciertas realizaciones, el reactivo comprende un reactivo de bisulfito. Más específicamente, el reactivo de bisulfito puede comprender, consistir esencialmente en o consistir en bisulfito de sodio.

En realizaciones específicas, los cebadores se seleccionan de cebadores seleccionados entre cebadores que comprenden, que consisten esencialmente en o que consisten en las secuencias de nucleótidos expuestas como SEC ID NO: 28 y 29 (LAMA1) y 34 y 35 (CDO1). En realizaciones adicionales, las sondas se seleccionan entre sondas que comprenden, que consisten esencialmente en o que consisten en las secuencias de nucleótidos expuestas como SEC ID NO: 30 (LAMA1) y 36 (CDO1).

En cuanto a los métodos, los kits se emplean preferiblemente en el contexto de las muestras fecales. Por lo tanto, el kit comprende adicionalmente medios para procesar una muestra fecal en ciertas realizaciones. En vista del hecho de que la invención se puede realizar utilizando solo una pequeña porción de la muestra fecal (recogida total), como se discute en la presente memoria (p. ej., utilizando tan poco como aproximadamente 1 g de heces para llevar a cabo la extracción de ADN), los kits pueden incorporar una recipiente adecuadamente dimensionado para contener tal muestra mínima/porcionada. El recipiente puede estar provisto de un dispositivo de recogida adecuado, adaptado para recuperar y/o depositar muestras mínimas/porcionadas apropiadas (como se describe en la presente memoria, de aproximadamente 5, 4, 3, 2 o 1 g o menos). Los tubos y cucharas adecuados para inclusión en tal kit son conocidos en la técnica y están disponibles comercialmente. Las cucharas pueden ser cucharas medidoras y pueden estar integradas en los tubos en ciertas realizaciones. El recipiente puede estar dimensionado de tal manera que se puede añadir un volumen adecuado de tampón de homogeneización (como se discute en la presente memoria, cuya discusión se aplica *mutatis mutandis*) a la muestra mínima/porcionada añadida al recipiente.

En realizaciones específicas, los cebadores se seleccionan de cebadores seleccionados entre cebadores que comprenden, que consisten esencialmente en o que consisten en las secuencias de nucleótidos expuestas como SEC ID NO: 22 y 23 (GPNMB) y 31 y 32 (MMP2). En realizaciones adicionales, las sondas se seleccionan entre sondas que comprenden, que consisten esencialmente en o que consisten en las secuencias de nucleótidos expuestas como SEC ID NO: 24 (GPNMB) y 33 (MMP2).

En realizaciones específicas de estos kits de la invención que implican medios para procesar una muestra fecal, los medios para el procesamiento de una muestra fecal comprenden un recipiente sellable para la recogida de una muestra fecal. Este recipiente puede ser de un tamaño y construcción para permitir que un sujeto defeque directamente en el recipiente. En vista del hecho de que la invención se puede realizar utilizando solo una pequeña porción de la muestra fecal (recogida total), como se discute en la presente memoria (p. ej., utilizando tan poco como aproximadamente 1 g de heces para llevar a cabo la extracción de ADN), los kits pueden incorporar un recipiente adecuadamente dimensionado para contener tal muestra mínima/porcionada. El recipiente puede estar provisto de un dispositivo de recogida adecuado, adaptado para recuperar y/o depositar una muestra mínima/porcionada apropiada (como se describe en la presente memoria, de aproximadamente 5, 4, 3, 2 o 1 g o menos). Los tubos y cucharas adecuados para su inclusión en tal kit son conocidos en la técnica y están disponibles comercialmente. Las cucharas pueden ser cucharas medidoras y pueden ser integradas en los tubos en ciertas realizaciones. El recipiente puede estar dimensionado de tal manera que se puede añadir un volumen adecuado de tampón de homogeneización (como se discute en la presente memoria, cuya discusión se aplica *mutatis mutandis*) a la muestra mínima/porcionada añadida al recipiente.

En realizaciones adicionales, los medios para el procesamiento de una muestra fecal comprende un tampón de homogeneización en ciertas realizaciones. Los tampones de homogeneización adecuados son conocidos en la técnica y están disponibles comercialmente. En realizaciones relacionadas, los medios para el procesamiento de una muestra fecal pueden comprender (adicionalmente) reactivos para la extracción/aislamiento/concentración/purificación del ADN de la muestra fecal. Como ejemplo, el kit QIAamp DNA para heces disponible de Qiagen incluye componentes adecuados para la purificación del ADN total a partir de muestras fecales frescas o congeladas.

Con el fin de permitir la determinación del estatus de metilación del panel de genes, los kits pueden comprender adicionalmente un reactivo que modifica selectivamente los residuos de citosina no metilados en el ADN contenido en la muestra para producir residuos modificados detectables, pero que no modifica residuos de citosina metilados. Como se discutió anteriormente, esto permite diferencias en la secuencia que va a ser detectada como una indicación de la situación metilación del ADN. Se puede emplear cualquier reactivo adecuado. Muchos ejemplos son conocidos en la técnica y están disponibles comercialmente. En ciertas realizaciones, el reactivo comprende un reactivo de bisulfito. Más específicamente, el reactivo de bisulfito puede comprender, consistir esencialmente en o consistir en bisulfito de sodio.

Sección experimental

Ejemplo 1

Recogida y tratamiento de la muestra

5 En 2006 se inició una prueba de escrutinio multicéntrico estandarizado (Países Bajos). En esta prueba, sujetos no sintomáticos de 50 años o por encima son examinados con colonoscopia, PSOMF y MSP en tiempo real utilizando el ADN de heces y sangre. Además, se utilizaron muestras de heces recogidas prospectivamente de varios centros (Alemania y Países Bajos). En estos ensayos, los pacientes sintomáticos, que asisten a una clínica de Gastroenterología y finalmente diagnosticados de CCR, proporcionaron una muestra de heces para su uso en MSP

10 en tiempo real. A partir de las pruebas en curso estuvieron disponibles 111 muestras de heces para el presente estudio. Se han utilizado 3 categorías principales de muestras de materia fecal: 38 muestras sin hallazgos sospechosos, 10 adenomas y 63 muestras de pacientes que cubren todas las etapas de CCR.

15 Después de la defecación en un cubo especial, se tomó una muestra de iPSOMF (dispositivo de Eiken) y los pacientes añadieron con posterioridad 250 ml de tampón de homogeneización de heces (Amresco, Solon, Ohio, EE.UU.) a la muestra. Las muestras fueron enviadas al laboratorio y se procesaron adicionalmente en el plazo de 72 horas después de la defecación. Se añadió tampón de homogeneización de heces a una razón de 1:7, y las muestras se homogeneizaron y se dividieron en alícuotas en porciones de 32 ml.

20 iPSOMF

Se utilizó OC-hemodiafiltración 'Eiken' para detectar sangre oculta en materia fecal cuando se escrutaba la identificación precoz de cáncer de colon.

25 Extracción del ADN de las heces

Se centrifugaron alícuotas individuales (32 ml que contenían el equivalente de 4 g de heces) durante 5 minutos a 2540 fcr a 20°C. El sobrenadante se retuvo y se centrifugó una segunda vez (10 minutos a 16.500 fcr a 4°C). Se incubaron 22 ml del sobrenadante obtenido después de la segunda etapa de centrifugación con 5 µl de ARNasa A

30 durante 60 minutos a 37°C. El ADN total se precipitó a continuación con acetato sódico (pH 5,2) - isopropanol y se lavó con etanol del 70%. Este "ADN bruto" se resuspendió en 4 ml de 1x TE (pH 7,4).

Para el conjunto A (QIAamp DNA Stool Mini Kit): Añadir 1,6 ml de Tampón ASL a 300 µl de "ADN bruto" y someter a vórtice. Las muestras se centrifugaron para sedimentar las partículas de heces restantes. Se transfirieron 1,4 ml de este sobrenadante a un nuevo tubo de microcentrífuga. Se disolvió una pastilla Inhibitex en cada muestra antes de una etapa de incubación de 1 min para permitir que los inhibidores se adsorban a la matriz Inhibitex. Las muestras se centrifugaron a continuación para sedimentar todas las partículas de heces restantes y los inhibidores unidos a la matriz Inhibitex. El sobrenadante se transfirió a un nuevo tubo de microcentrífuga. Se añadieron 25 µl de proteinasa K a 600 µl de muestra de sobrenadante antes de añadir 600 µl de tampón AL. Los tubos se incubaron a 70°C

35 durante 10 min. Se añadieron 600 µl de etanol (96-100%) al producto lisado, y se mezcló mediante vórtice. Aplicar cuidadosamente 3x600 µl de producto lisado a columnas de centrifugación QIAamp, centrifugar y desechar el tubo que contenía el producto filtrado. Abrir con cuidado la columna de centrifugación QIAamp y añadir 500 µl de Tampón AW1, centrifugar y desechar el tubo de recogida que contenía el producto filtrado. Abrir con cuidado la columna de centrifugación QIAamp y añadir 500 µl de Tampón AW2, centrifugar, desechar el tubo de recogida que contenía el producto filtrado. Transferir la columna de centrifugación QIAamp a un nuevo tubo de microcentrífuga, abrir la columna de centrifugación QIAamp, añadir 50 µl de Tampón AE sobre la membrana, incubar durante 1 min a temperatura ambiente, y a continuación centrifugar para eluir el ADN.

40

45

Para el conjunto B (ADN QIAamp Stool Midi Kit): Añadir 1,5 ml de tampón ASL a 2 ml de "ADN Bruto". Añadir 1 Pastilla de Inhibitex a cada muestra y someter a vórtice INMEDIATAMENTE y continuamente durante 1 min o hasta que la pastilla está completamente suspendida. Incubar la suspensión durante 1 min a temperatura ambiente para permitir a los inhibidores de adsorban a la matriz InhibitEX. Centrifugar la muestra para sedimentar las partículas de heces y los inhibidores unidos a la matriz Inhibitex.

50

Recoger el sobrenadante y transferirlo a un nuevo tubo de centrífuga de 15 ml, desechar el sedimento. Añadir 150 µl de proteinasa K a 2 ml del sobrenadante, mezclar bien, añadir 2,4 ml de Tampón AL y agitar durante 15 s. Incubar a 70°C durante 10 min. Añadir 2 ml de etanol (96-100%) a la muestra, y mezclar invirtiendo el tubo 10 veces, seguido de agitación vigorosa adicional. Con el fin de asegurar una unión eficaz, es esencial que la muestra se mezcle a fondo después de la adición de etanol para producir una disolución homogénea.

55

Transferir cuidadosamente 3,3 ml de la muestra a la columna QIAamp Midi colocado en un tubo de centrífuga de 15 ml y centrifugar a 1.850 xg (3.000 rpm) durante 3 min, y desechar el producto filtrado.

60

Colocar de nuevo la columna QIAamp midi en el tubo de centrífuga de 15 ml. Cargar el resto de la muestra en la

columna QIAamp Midi, centrifugar de nuevo a 1850 xg (3000 rpm) durante 3 minutos, y desechar el producto filtrado. Colocar de nuevo la columna QIAamp Midi en el tubo de centrifuga de 15 ml, añadir 2 ml de Tampón AW1, centrifugar a 4500 xg (5.000 rpm) durante 1 minuto, añadir 2 ml de Tampón AW2 a la columna QIAamp Midi, centrifugar a 4500 xg (5.000 rpm) durante 15 min, y desechar el producto filtrado. Colocar la columna QIAamp Midi en un tubo de centrifuga de 15 ml limpio, centrifugar durante 1 minuto para secar la columna, colocar la columna QIAamp Midi en un tubo de centrifuga de 15 ml limpio, y desechar el tubo de recogida que contiene el producto filtrado.

Añadir 200 µl de Tampón AE directamente sobre la membrana de la columna QIAamp Midi, incubar a temperatura ambiente durante 5 min, y centrifugar a 4500 xg (5000 rpm) durante 2 min. Volver a cargar los mismos 200 µl sobre la membrana, incubar a temperatura ambiente durante 5 min, y centrifugar a 4500 xg (5000 rpm) durante 2 min para eluir el ADN.

Modificación del ADN

Se sometieron 1,5 µg de ADN a modificación con bisulfito en el formato de 96 pocillos en un robot de pipeteado (Tecan), utilizando el kit de metilación EZ-96DNA (Zymo Research), de acuerdo con el protocolo del fabricante. Básicamente, se mezclaron alícuotas de 45 µl con 5 µl de Tampón de Dilución M y se incubaron a 37°C durante 15 minutos agitando a 1100 rpm. A continuación se añadieron 100 µl de Reactivo de Conversión CT diluido y las muestras se incubaron a 70°C durante 3 horas, agitando a 1100 rpm en la oscuridad. Después de la conversión, las muestras se desalaron mediante incubación en hielo durante 10 minutos y adición de 400 µl de Tampón de Unión M. Las muestras se cargaron en una Columna Zymo-Spin I en un tubo de recogida y después de la centrifugación se lavaron con 200 µl de Tampón de Lavado M. Se pusieron en la columna 200 µl de Tampón de Desulfonación M y se incubaron a temperatura ambiente durante 15 minutos. Después de la centrifugación de las columnas, éstas se lavaron dos veces con 200 µl de Tampón de Desulfonación M. Finalmente, el ADN se lavó de la columna en 50 µl de Tris-HCl 1 mM pH 8,0 y se almacenó a -80°C, hasta su procesamiento posterior.

Amplificación de ADN

Se aplicó MSP en tiempo real en un sistema de PCR rápida en tiempo real 7900HT (Applied Biosystems). Se añadieron 5 µl o 10 µl del ADN modificado a una mezcla de PCR (volumen total 25 o 50 µl) que contenía tampón (16,6 mM (NH₄)₂SO₄, Tris 67 mM (pH 8,8), MgCl₂ 6,7 mM, β-mercaptoetanol 10 mM), dNTPs (5 mM), cebador directo (6 ng), cebador inverso (18 ng), baliza molecular (0,16 mM), BSA (0,1 µg), y ADN polimerasa Taq Jumpstart (0,4 unidades; Sigma Aldrich). Las secuencias de los cebadores y secuencias de las baliza moleculares utilizadas para cada uno de los genes se resumen en la tabla 1. El programa de ciclos utilizado fue el siguiente: 5 minutos a 95°C, seguido de 45 ciclos de 30 segundos a 95°C, 30 segundos a 57°C (51°C para APC), 30 segundos y 72°C, seguido de 5 minutos a 72°C. Se incluyó una curva patrón (2x10⁶ - 20 copias) para determinar el número de copias de muestras desconocidas por medio de la interpolación de sus valores Ct para la curva patrón.

Resultados

Tabla 1: Secuencias de cebadores y secuencias de balizas (por ejemplo conjuntos A y B)

Gen	Cebador o sonda	Secuencia de nucleótidos (incluyendo marcas de la sonda)	SEQ ID NO:
PHACTR	cebador directo	5'-TTATTTTTCGAGCGGTTTC - 3'	1
	cebador inverso	5' - GAATACTCTAATTCCACGCGACT - 3'	2
	baliza	5'-FAM-CGACATGCGGGTrCGGTCGGCGCGGGGCATGTCG-3'-DABCYL	3
FOX1	cebador directo	5' - TTTGTTTCGTTTTTCGATTGTTC - 3'	4
	cebador inverso	5' - TAACGCTATAAACTCCTACCGC - 3'	5
	baliza	5'-FAM- CGTCTCGTCGGGGTTCGGGCGTATTTTTTAGGTAGGCGAGACG -3'-DABCYL	6
NDRG4	cebador directo	5'-GTATTTTAGTCGCGTAGAAGGC - 3'	7

ES 2 541 178 T3

Gen	Cebador o sonda	Secuencia de nucleótidos (incluyendo marcas de la sonda)	SEQ ID NO:
	cebador inverso	5'-AATTAAACGAATATAAACGCTCGAC - 3'	8
	baliza	5'-FAM-CGACATGCCCCGAACGAACCGCGATCCCTGCATGTCG-3'-DABCYL	9
GALA4	Cebador directo	5'-AGGTTAGTTAGCGTTTTAGGGTC-3'	10
	Cebador inverso	5'-ACGACGACGAAACCTCTCG-3'	11
	baliza	5'-FAM-CGACATGCCTCGCGACTCGAATCCCCGACCCAGCATGTCG-DABCYL-3'	12
OSMR	Cebador directo	5'-TTTGGTCGGGGTAGGAGTAGC - 3'	13
	Cebador inverso	5'-CGAACTTTACGAACGAACGAAC - 3'	14
	baliza	5'-FAM-CGACATGCCCCGTACCCGCGCGCAGCATGTCG-3'-DABCYL	15
SYNE1	Cebador directo	5'-GTTGGGTTTTCTAGTTTTGTAGATCGC-3'	16
	Cebador inverso	5'-CTACGCCCAAACCTCGACG-3'	17
	baliza	5'-FAM-CGACATGCCCCGCCCTATCGCCGAAATCGCATGTCG-DABCYL-3'	18
SFRP2	Cebador directo	5'-GGGTCGGAGTTTTTCGGAGTTGCGC - 3'	19
	Cebador inverso	5'-CCGCTCTCTTCGCTAAATACGACTCG - 3'	20
	baliza	<u>5'-FAM-CGACATGCGGTGTTTCGTTTTTCGCGTTTTAGTCGTCGGGCATGTCG-DABCYL-3'</u>	21
GPNMB	Cebador directo	5'-GGTCGTAGTCGTAGTCGGG-3'	22
	Cebador inverso	5'-CCGCAAAAACCTAAACGTAA-3'	23
	baliza	5'-FAM-CGACATGCGGTTTTTGGGTCGGGGCGGGGCATGTCG-DABCYL-3'	24
SOX17	Cebador directo	5'-GAGATGTTTCGAGGGTTGC-3'	25
	Cebador inverso	5'-CCGCAATATCACTAAACCGA-3'	26
baliza	baliza	<u>5'-FAM-CGACATGCGTTCTGTTTGGTTTGTGCGGTTTGGCATGTCG-DABCYL-3'</u>	27
LAMA1	Cebador directo	5'-TTTTTAGATTTATCGAGTGGCG-3'	28
	Cebador inverso	5'-CGAACTCACCTCTCTACCGAC-3'	29
	baliza	5'-CGACATGCCAAAAACACGCCCCCGCGCATGTCG3'	30
MMP2	Cebador directo	5'-TTCGGGTTATTAGCGTTTTTATC-3'	31

Gen	Cebador o sonda	Secuencia de nucleótidos (incluyendo marcas de la sonda)	SEQ ID NO:
	Cebador inverso	5'-ACTCCAACCAAACGACGAA-3'	32
	baliza	5'-FAM-CGACATCGTTGGTTCGGTGCCTGTGGTTCGATGTCG-DABCYL-3'	33
CDO1	Cebador directo	5'-AATTTGATTTGTGTGTGTATCGC-3'	34
	Cebador inverso	5'-GAAACGTAAAAATATCGTCGCA-3'	35
	baliza	5'-FAM-CGACATGCGCGATTTCGGATTATTGCGTTGTTAGGGCATGTCG-DABCYL-3'	36
TFPI2	Cebador directo	5'-GTTTCGTTGGGTAAGGCGTTC-3'	37
	Cebador inverso	5'-CATAAAACGAACACCCGAACCG-3'	38
	Baliza	5'-FAM-CGACATGCACCGCGCACCTCCTCCCGCCAAGCATGTCG-DABCYL-3'	39

Rendimiento de los marcadores de metilación individuales en muestras fecales (conjunto A)

5 Se evaluaron doce marcadores de metilación (GATA4, GPNMB, TFPI2, FOXE1, SOX17, SYNE1, NDRG4, LAMA, MMP2, PHACTR, OSMR y CDO1) en muestras fecales. Las copias de estos genes metilados se cuantificaron en las muestras de heces disponibles mediante MSP en tiempo real en un sistema de PCR rápida en tiempo real 7900HT (Applied Biosystems).

10 Los funcionamientos individuales de los doce genes en muestras fecales se muestran en la Tabla 2. El mejor funcionamiento del gen en muestras fecales de pacientes con CCR correspondió a NDRG4 con 61% de sensibilidad con una especificidad correspondiente de 100%.

Tabla 2:Funcionamiento de los marcadores de metilación individuales en el conjunto A muestras fecales utilizando un cierto punto de corte (copias de genes).

Gen	corte	Espec. (n = 21)	Sens. (n = 23)
GATA4	10	90%	52%
GPNMB	100	100%	39%
TFPI2	100	100%	48%
FOXE1	5	100%	39%
SOX17	10	90%	35%
SYNE1	3	90%	43%
NDRG4	2	100%	61%
LAMA	40	100%	30%
MMP2	10	95%	39%
PHACTR	100	100%	43%
OSMR	1	95%	22%
CDO1	10	95%	13%

15 Funcionamiento de la combinación de los 3 marcadores metilación en el conjunto A muestras fecales

También se investigó el funcionamiento de combinaciones de tres marcadores de metilación. Las copias de los genes metilados se cuantificaron en las muestras de heces disponibles mediante MSP en tiempo real en un sistema

de PCR rápida en tiempo real 7900HT (Applied Biosystems). La Tabla 3 muestra los resultados y enumera el corte (copias) aplicado. Las mejores combinaciones tuvieron 100% de especificidad, 70% de sensibilidad para CCR.

- 5 Tabla 3: Rendimiento de 3 combinaciones de marcadores de metilación en el conjunto A (las 3 filas superiores proporcionan los cortes, las celdas vacías indican que no se utilizó el gen). Una muestra se califica como positiva si cualquier marcador es positivo.

NDRG4 (copias)	2	2		2
FOXE1 (copias)	0	0	0	
PHACTR (copias)	100		100	100
Espec. (n = 21)	100%	100%	100%	100%
Sens. (n = 23)	70%	70%	52%	65%

Rendimiento de PFI en muestras fecales (conjunto A)

- 10 La PFI se evaluó en las mismas muestras fecales. El rendimiento en las muestras fecales se muestra en la Tabla 4. Se obtuvo una especificidad de 95% y una sensibilidad de 78%.

Tabla 4: Rendimiento de la PFI en muestras fecales conjunto A

	PFI
Corte (ng/ml)	100
Espec. (n = 21)	95%
Sens. (n = 23)	78%

- 15 Funcionamiento de la combinación de 3 marcadores de metilación y PFI en el conjunto A de muestras fecales

Se investigó el funcionamiento de la combinación de los marcadores de metilación con PFI. Las copias de los genes metilados se cuantificaron en las muestras de heces disponibles mediante MSP en tiempo real en un sistema de PCR rápida en tiempo real 7900HT (Applied Biosystems). La Tabla 5 muestra los resultados y enumera el corte (copias) aplicado.

- 20

Tabla 5: Funcionamiento de las combinaciones de marcadores de metilación en el conjunto A. Una muestra se marcó como positiva si cualquier marcador es positivo.

Gen	cortes (copias)	Marcador de metilación solo		Marcadores de metilación más PFI (corte a 100 ng/ml)	
		Espec. (n = 21)	Sens. (n = 23)	Espec. (n = 21)	Sens. (n = 23)
GATA4	10	90%	52%	86%	87%
GPNUMB	100	100%	39%	95%	87%
TFPI2	100	100%	48%	95%	91%
FOXE1	5	100%	39%	95%	87%
SOX17	10	90%	35%	86%	87%
SYNE1	3	90%	43%	86%	91%
NDRG4	2	100%	61%	95%	87%
LAMA	40	100%	30%	95%	83%
MMP2	10	95%	39%	90%	87%
PHACTR	100	100%	43%	95%	87%
OSMR	1	95%	22%	90%	83%
CDO1	10	95%	13%	90%	83%

Funcionamiento de la combinación de marcadores de metilación y PFI en el conjunto A de muestras fecales

Se investigó el funcionamiento de una combinación de los marcadores de metilación con PFI, los resultados se muestran en la Tabla 6.

Tabla 6: Funcionamiento de 3 combinaciones de marcadores de metilación en el conjunto A (las 4 filas superiores proporcionan los cortes, las celdas vacías indican que no se utilizó el gen). Una muestra se califica como positiva si cualquier marcador es positivo.

PFI (ng/ml)	100	100	100	100
NDRG4 (copias)	2	2		2
FOXE1 (copias)	0	0	0	
PHACTR (copias)	100		100	100
Espec. (n = 21)	95%	95%	95%	95%
Sens. (n = 23)	96%	96%	91%	91%

Funcionamiento de los marcadores de metilación en muestras fecales (conjunto B)

Se evaluaron siete marcadores de metilación (NDRG4, FOXE1, PHACTR, GATA4, OSMR, SYNE1, SFRP2) en muestras fecales. Las copias de estos genes metilados se cuantificaron en las muestras de heces disponibles mediante MSP en tiempo real en un sistema de PCR rápida en tiempo real 7900HT (Applied Biosystems). Los funcionamientos individuales de los 7 genes se muestran en la Tabla 7. El mejor funcionamiento de los genes en muestras fecales de pacientes con CCR correspondió a PHACTR con 68% de sensibilidad con una especificidad correspondiente de 100%.

Tabla 7: Rendimiento de los marcadores de metilación individuales en el conjunto B de muestras fecales

Gen	NDRG4	FOXE1	PHACTR	GATA4	OSMR	SYNE1	SFRP2
corte	2	0	100	10	1	3	2
Especificidad	100%	94%	100%	100%	88%	100%	100%
Sensibilidad para adenoma avanzado	0%	0%	10%	10%	20%	10%	10%
Sensibilidad para CCR	35%	55%	68%	43%	45%	65%	58%

Rendimiento del PFI en muestras fecales (conjunto B)

La PFI se evaluó en las mismas muestras fecales. El rendimiento de las muestras fecales se muestra en la Tabla 8.

Tabla 8: Rendimiento de la PFI en el conjunto B de muestras fecales

	PFI
Corte (ng/ml)	100
Especificidad	100%
Sensibilidad para adenoma avanzado	10%
Sensibilidad para CCR	78%

La PFI obtuvo una sensibilidad de 78% y una especificidad correspondiente de 100%.

Funcionamiento de los marcadores de metilación y combinaciones de los mismos con o sin PFI en el conjunto B de muestras fecales

El funcionamiento de la combinación de 3 marcadores de metilación fue investigado con o sin PFI. Las copias de los genes metilados se cuantificaron en las muestras de heces disponibles mediante MSP en tiempo real en un sistema de PCR rápida en tiempo real 7900HT (Applied Biosystems). La Tabla 9 muestra los resultados y enumera el corte (copias) aplicado.

Tabla 9: Rendimiento de las combinaciones de 3 marcadores de metilación en el conjunto B

PFI (ng/ml)	100	100	100	100				
NDRG4 (copias)	2	2		2	2	2		2
FOXE1 (copias)	0	0	0		0	0	0	
PHACTR (copias)	100		100	100	100		100	100
Espec. (n = 17)	94%	94%	94%	100%	94%	94%	94%	100%
Sens. adenoma av. (n = 10)	20%	20%	20%	20%	10%	0%	10%	10%
Sens. CCR (n = 40)	95%	88%	95%	95%	70%	58%	70%	68%

Utilización de PFI como escrutinio de línea de primera y metilación como análisis de confirmación de segunda línea

- 5 Se realizó una simulación en la que la prueba de PFI se utilizaría como prueba de escrutinio y por medio de la cual se utilizaría un corte bajo de 10 ng/ml para maximizar la sensibilidad. Para muestras con más de 10 ng/ml de hemoglobina y menos de 200 ng/ml la prueba de metilación se puede utilizar para aumentar la especificidad para este subgrupo. Las muestras se puntuaron como positivas si el valor de PFI es mayor de 200 ng/ml o si uno de los marcadores de metilación es positivo.
- 10 La Tabla 10 muestra la sensibilidad y especificidad de la prueba PFI como prueba de primera línea, así como la sensibilidad y la especificidad totales de la combinación de PFI como primera línea y confirmación con "PFI > 200 OR un resultado positivo en un panel de metilación que consiste en tres genes".
- 15 Resultados para el panel A, cuando solo se aplica la combinación de PFI y marcadores de metilación a las muestras que tienen más de 10 y menos de 200 ng de hemoglobina/ml.

Número total sometido a ensayo con PFI = 44	Número de pacientes que se van a someter a ensayo con el panel de metilación = 5	FOXE1 (copias)	0
		NDRG4 (copias)	0
		PHACTR (copias)	50
		Espec. (n = 21)	95%
		Sens. (n = 23)	83%

- 20 Los resultados para el panel B cuando solo se aplica la combinación de PFI y marcadores de metilación a las muestras que tienen más de 10 y menos de 200 ng de hemoglobina/ml.

Número total de sometido a ensayo con PFI = 67	Número de pacientes que se van a someter ensayo con el panel de metilación = 12	FOXE1 (copias)	0
		NDRG4 (copias)	0
		PHACTR (copias)	50
		Espec. (n = 17)	94%
		Sens. adenoma av. (n = 10)	20%
		Sens. CCR (n = 40)	88%

Ejemplo 2

5 Pruebas PFI y de metilación en muestras de heces parciales

En el Ejemplo 1 se investigaron los productos homogeneizados de material de muestra de heces completo. En este ejemplo, el autor de la presente invención evaluó si se podría retirar material de ADN suficiente de las muestras de heces parciales que permitiera el análisis de metilación subsiguiente.

10

Recogida de muestras y el aislamiento de ácidos nucleicos

Para el presente estudio estuvieron disponibles 82 muestras históricas de heces, recogidas entre 2003 y 2008. Las muestras se congelaron en el momento de la recogida sin la adición de tampón estabilizante y se almacenaron a -20°C hasta su uso posterior.

15

En este estudio solo se investigó una porción de la muestra de heces (= 1 g) para las pruebas de metilación posteriores. En primer lugar, las muestras históricas se descongelaron en el lugar de almacenamiento y se tomaron muestras parciales (~1 g) utilizando tubos para heces de diseño especial con cucharas de medición integradas (Sarstedt). Cada muestra fue pesada y 2 se añadieron volúmenes de tampón de estabilización (Diagn Mol Pathol Volumen 14, Número 3, Septiembre de 2005). Las muestras se almacenaron a -80°C hasta que el conjunto de la muestra completa estuvo listo para su transferencia al sitio de procesamiento.

20

El ADN de estas muestras se preparó utilizando el minikit para heces QiaAmp DNA (Qiagen) siguiendo el mismo procedimiento que se ha detallado en el ejemplo 1, conjunto de muestras A. Se utilizaron volúmenes adaptados para el material de partida y la elución; se realizaron 3 aislamientos de ADN por muestra de heces, procesando 250 µl de material de heces homogeneizado cada uno, y eluyeron en 75 µl de tampón AE. Al final, los productos eluidos de la misma muestra se agruparon y el ADN se cuantificó utilizando el kit de cuantificación PicoGreen® dsDNA (Molecular Probes, Núm. P7589) siguiendo las instrucciones del fabricante.

25

Modificación del ADN y amplificación

Las muestras se sometieron a modificación con bisulfito utilizando un kit disponible comercialmente (es decir, Zymo, Núm. D5002) como se comenta en el ejemplo 1. Una vez más, el material de entrada y el volumen de elución se adaptaron ligeramente para este estudio: se utilizaron hasta 2 µg de ADN de entrada y la elución se realizó en 30 µl de Tris-HCl (1 mM, pH 8,0); las muestras se almacenaron a -80°C, hasta su procesamiento posterior.

35

Se realizó MSP en tiempo real como se establece en el ejemplo 1. Los patrones de metilación de ADN del gen PHACTR3 se determinaron mediante modificación química de citosinas no metilada, pero no de las metiladas a uracilo y posterior PCR utilizando cebadores específicos para la versión metilada, los detalles de las secuencias se proporcionan en la Tabla 1.

40

Resultados

El estatus de metilación para los pacientes se estudió en el ADN extraído de muestras de heces parciales derivadas de colecciones fecales históricas. El rendimiento medio de ADN fue de 7 µg (oscilando de 0,3 a 27 µg, SD 5 µg), dando como resultado material de ADN suficiente para la modificación de bisulfito subsiguiente y el procedimiento de MSP en tiempo real. Las copias metiladas de los genes PHACTR3 se cuantificaron en las porciones de heces disponibles. El funcionamiento de este marcador de metilación y la combinación con o sin PFI fueron comparables con los datos anteriores referidos a partir del conjunto de muestras de heces completo recogido de forma prospectiva.

45

50

Lista de Secuencias

	<110> OncoMethylome Sciences SA	
	<120> Métodos de detección de cáncer colorrectal	
	<130> P104653WO00	
5	<150> US 61/149,581	
	<151> 2009-02-03	
	<160> 39	
	Versión <170> PatentIn 3.5	
	<210> 1	
10	<211> 19	
	<212> ADN	
	<213> Secuencia Artificial	
	<220>	
	<223> Cebador	
15	<400> 1	
	ttattttgcg agcggtttc	19
	<210> 2	
	<211> 23	
	<212> ADN	
20	<213> Secuencia Artificial	
	<220>	
	<223> Cebador	
	<400> 2	
	gaataactcta attccacgcg act	23
25	<210> 3	
	<211> 34	
	<212> ADN	
	<213> Secuencia Artificial	
	<220>	
30	<223> Sonda	
	<400> 3	
	cgacatgcgg gttcggtcgg cgcggggcat gtcg	34
	<210> 4	
	<211> 22	
35	<212> ADN	
	<213> Secuencia Artificial	
	<220>	
	<223> Cebador	
	<400> 4	
40	ttgttcggtt tc ttgcgattgt	22
	<210> 5	
	<211> 23	
	<212> ADN	
	<213> Secuencia Artificial	
45	<220>	
	<223> Cebador	
	<400> 5	
	taacgctata aaactcctac cgc	23
	<210> 6	
50	<211> 44	
	<212> ADN	
	<213> Secuencia Artificial	
	<220>	
	<223> Sonda	
55	<400> 6	
	cgtctcgtcg ggggtcgggc gtatttttt aggtaggcga GACG	44
	<210> 7	
	<211> 22	
	<212> ADN	
60	<213> Secuencia Artificial	
	<220>	
	<223> Cebador	
	<400> 7	
	gtattttagt cgcgtagaag gc	22

	<210> 8	
	<211> 25	
	<212> ADN	
	<213> Secuencia Artificial	
5	<220>	
	<223> Cebador	
	<400> 8	
	aatttaacga atataaacgc tcgac	25
	<210> 9	
10	<211> 36	
	<212> ADN	
	<213> Secuencia Artificial	
	<220>	
	<223> Sonda	
15	<400> 9	
	cgacatgccc gaacgaaccg cgatccctgc atgtcg	36
	<210> 10	
	<211> 23	
	<212> ADN	
20	<213> Secuencia Artificial	
	<220>	
	<223> Cebador	
	<400> 10	
	aggttagtta gcgttttagg gtc	23
25	<210> 11	
	<211> 19	
	<212> ADN	
	<213> Secuencia Artificial	
	<220>	
30	<223> Cebador	
	<400> 11	
	acgacgacga aacctctcg	19
	<210> 12	
	<211> 40	
35	<212> ADN	
	<213> Secuencia Artificial	
	<220>	
	<223> Sonda	
	<400> 12	
40	cgacatgcct cgcgactcga atccccgacc cagcatgtcg	40
	<210> 13	
	<211> 21	
	<212> ADN	
	<213> Secuencia Artificial	
45	<220>	
	<223> Cebador	
	<400> 13	
	tttggtcggg gtaggagtag c	21
	<210> 14	
50	<211> 22	
	<212> ADN	
	<213> Secuencia Artificial	
	<220>	
	<223> Cebador	
55	<400> 14	
	cgaactttac gaacgaacga ac	22
	<210> 15	
	<211> 32	
	<212> ADN	
60	<213> Secuencia Artificial	
	<220>	
	<223> Sonda	
	<400> 15	
	cgacatgccc gtaccccgcg cgcagcatgt cg	32

	<210> 16	
	<211> 28	
	<212> ADN	
	<213> Secuencia Artificial	
5	<220>	
	<223> Cebador	
	<400> 16	
	gttgggtttt cgtagtttg tagatcgc	28
10	<210> 17	
	<211> 18	
	<212> ADN	
	<213> Secuencia Artificial	
	<220>	
	<223> Cebador	
15	<400> 17	
	ctacgcccaa actcgacg	18
	<210> 18	
	<211> 36	
	<212> ADN	
20	<213> Secuencia Artificial	
	<220>	
	<223> Sonda	
	<400> 18	
	cgacatgccc cgccctatcg ccgaaatcgc atgtcg	36
25	<210> 19	
	<211> 25	
	<212> ADN	
	<213> Secuencia Artificial	
	<220>	
30	<223> Cebador	
	<400> 19	
	gggtcggagt ttctcggagt tgcgc	25
	<210> 20	
	<211> 26	
35	<212> ADN	
	<213> Secuencia Artificial	
	<220>	
	<223> Cebador	
	<400> 20	
40	ccgctctctt cgtaaatac gactcg	26
	<210> 21	
	<211> 48	
	<212> ADN	
	<213> Secuencia Artificial	
45	<220>	
	<223> Sonda	
	<400> 21	
	cgacatgcgg tgttcggtt ttccgcgtt tagtcgctgg gcatgctg	48
	<210> 22	
50	<211> 19	
	<212> ADN	
	<213> Secuencia Artificial	
	<220>	
	<223> Cebador	
55	<400> 22	
	ggtcgtagtc gtagtcggg	19
	<210> 23	
	<211> 21	
	<212> ADN	
60	<213> Secuencia Artificial	
	<220>	
	<223> Cebador	
	<400> 23	
	ccgcaaaaac ctaaaacgta a	21

	<210> 24	
	<211> 37	
	<212> ADN	
	<213> Secuencia Artificial	
5	<220>	
	<223> Sonda	
	<400> 24	
	cgacatgctgg tttttgggt cggggcgctg catgtcg	37
10	<210> 25	
	<211> 19	
	<212> ADN	
	<213> Secuencia Artificial	
	<220>	
	<223> Cebador	
15	<400> 25	
	gagatgtttc gaggggtgc	19
	<210> 26	
	<211> 20	
	<212> ADN	
20	<213> Secuencia Artificial	
	<220>	
	<223> Cebador	
	<400> 26	
	ccgcaatgc actaaaccga	20
25	<210> 27	
	<211> 43	
	<212> ADN	
	<213> Secuencia Artificial	
	<220>	
30	<223> Sonda	
	<400> 27	
	cgacatgctg tcgtgtttg gttgtcgcg gttggcatg tcg	43
	<210> 28	
	<211> 22	
35	<212> ADN	
	<213> Secuencia Artificial	
	<220>	
	<223> Cebador	
	<400> 28	
40	tttttagatt tatcgagtgg cg	22
	<210> 29	
	<211> 21	
	<212> ADN	
	<213> Secuencia Artificial	
45	<220>	
	<223> Cebador	
	<400> 29	
	cgaactcacc tctctaccga c	21
	<210> 30	
50	<211> 33	
	<212> ADN	
	<213> Secuencia Artificial	
	<220>	
	<223> Sonda	
55	<400> 30	
	cgacatgcca aaaacacgcc cccgcgcag tcg	33
	<210> 31	
	<211> 23	
	<212> ADN	
60	<213> Secuencia Artificial	
	<220>	
	<223> Cebador	
	<400> 31	
	ttcgggttat tagcgtttt atc	23

	<210> 32	
	<211> 19	
	<212> ADN	
	<213> Secuencia Artificial	
5	<220>	
	<223> Cebador	
	<400> 32	
	actccaacca aacgacgaa	19
	<210> 33	
10	<211> 35	
	<212> ADN	
	<213> Secuencia Artificial	
	<220>	
	<223> Sonda	
15	<400> 33	
	cgacatcggtt gggtcggtgc gtgtggcga tgtcg	35
	<210> 34	
	<211> 23	
	<212> ADN	
20	<213> Secuencia Artificial	
	<220>	
	<223> Cebador	
	<400> 34	
	aatttgattt gtgtgttat cgc	23
25	<210> 35	
	<211> 22	
	<212> ADN	
	<213> Secuencia Artificial	
	<220>	
30	<223> Cebador	
	<400> 35	
	gaaacgtaaa aatatcgatg ca	22
	<210> 36	
	<211> 44	
35	<212> ADN	
	<213> Secuencia Artificial	
	<220>	
	<223> Sonda	
	<400> 36	
40	cgacatgcgc gatttcggat ttattgcgtt gtagggcat gtcg	44
	<210> 37	
	<211> 20	
	<212> ADN	
	<213> Secuencia Artificial	
45	<220>	
	<223> Cebador	
	<400> 37	
	gttcgttggg taaggcggtc	20
	<210> 38	
50	<211> 22	
	<212> ADN	
	<213> Secuencia Artificial	
	<220>	
	<223> Cebador	
55	<400> 38	
	cataaaacga acacccgaac cg	22
	<210> 39	
	<211> 38	
	<212> ADN	
60	<213> Secuencia Artificial	
	<220>	
	<223> Sonda	
	<400> 39	
	cgacatgcac cgcgcacctc ctcccgcaa gcatgtcg	38

REIVINDICACIONES

1. Un método para detectar una predisposición a, o la incidencia de, cáncer colorrectal en una muestra fecal, que comprende:
 - (a) detectar la presencia de sangre en la muestra fecal, en donde la detección de la presencia de sangre es indicativa de una predisposición a, o la incidencia de, cáncer colorrectal; y
 - (b) detectar una modificación epigenética en el ADN contenido dentro de la muestra fecal, en donde la modificación epigenética es detectada en al menos un gen seleccionado entre NDRG4, PHACTR3, FOXE1, GATA4, GPNMB, TFPI2, SOX17, SYNE1, LAMA, MMP2, OSMR, SFRP2 y CDO1 y en donde la detección de la modificación epigenética en al menos uno de los genes es indicativa de una predisposición a, o la incidencia de, cáncer colorrectal y sobre la base de un resultado positivo obtenido en (a) o (b) o tanto en (a) como en (b) detectar una predisposición a, o la incidencia de, cáncer colorrectal.
2. El método de la reivindicación 1, en donde la detección de la presencia de sangre en la muestra fecal comprende la detección de la hemoglobina en la muestra fecal opcionalmente en donde la hemoglobina en la muestra fecal se detecta a través de medios inmunoquímicos.
3. El método de la reivindicación 2 en donde:
 - (i) el resultado en la etapa (a) se considera positivo si la concentración de hemoglobina detectada está al menos entre aproximadamente 50 a 150 ng/ml; o
 - (ii) en donde el resultado en la etapa (a) se considera positivo si la concentración de hemoglobina detectada es al menos aproximadamente 100 ng/ml.
4. Un método para detectar una predisposición a, o la incidencia de, cáncer colorrectal en una muestra fecal que comprende:
 - (a) detectar la presencia de sangre en la muestra fecal, que comprende la detección de la hemoglobina en la muestra fecal opcionalmente en donde la hemoglobina en la muestra fecal se detecta a través de medios inmunoquímicos en donde la detección de la presencia de sangre es indicativa de una predisposición a, o la incidencia de, colorrectal cáncer; y
 - (b) detectar una modificación epigenética en el ADN contenido dentro de la muestra fecal, en donde la modificación epigenética se detecta en al menos un gen seleccionado entre NDRG4, PHACTR3, FOXE1, GATA4, GPNMB, TFPI2, SOX17, SYNE1, LAMA, MMP2, OSMR, SFRP2 y CDO1 y en donde la detección de la modificación epigenética en al menos uno de los genes es indicativo de una predisposición a, o la incidencia de, cáncer colorrectal en donde:
 - (i) el resultado en la etapa (a) se considera positivo si la concentración de hemoglobina detectada es mayor que un nivel umbral predeterminado, cuyo nivel umbral es más bajo que el empleado típicamente como concentración umbral de hemoglobina en otras pruebas de detección de hemoglobina, pero para aquellas muestras en las que se detecta una menor concentración de hemoglobina, que se consideraría un resultado negativo en dichas otras pruebas, la etapa (b) se realiza solo sobre estas muestras y la detección de la modificación epigenética en la etapa (b) se utiliza en ese caso para confirmar el resultado positivo en la etapa (a); o
 - (ii) en donde el resultado en la etapa (a) se considera positivo si la concentración de hemoglobina detectada es al menos aproximadamente 10 ng/ml y en donde la etapa (b) se realiza solo en el caso de que la concentración de hemoglobina detectada esté entre aproximadamente 10 ng/ml y aproximadamente 200 ng/ml y la detección de la modificación epigenética en la etapa (b) se utiliza en ese caso para confirmar el resultado positivo en la etapa (a).
5. El método de cualquier reivindicación precedente, en donde la modificación epigenética se detecta en al menos un gen seleccionado entre PHACTR3, NDRG4 y FOXE1, con detección de la modificación epigenética en al menos uno de los genes que proporcionan una indicación de una predisposición a, o la incidencia de, cáncer de colon; opcionalmente en donde la modificación epigenética se detecta en un panel de al menos dos genes seleccionados entre PHACTR3, NDRG4 y FOXE1, con detección de la modificación epigenética en al menos uno de los genes que proporcionan una indicación de una predisposición a, o la incidencia de, cáncer colorrectal; opcionalmente en donde el panel de genes comprende, consiste esencialmente en o consiste en PHACTR3, NDRG4 y FOXE1, NDRG4 y FOXE1, PHACTR3 y NDRG4 o PHACTR3 y FOXE1.
6. El método de cualquier reivindicación precedente, en donde la modificación epigenética es la metilación.
7. El método de cualquier reivindicación precedente, que utiliza cebadores seleccionados entre cebadores que comprenden las secuencias de nucleótidos expuestas en la Tabla 1, preferiblemente que utiliza cebadores seleccionados entre cebadores que comprenden las secuencias de nucleótidos expuestas como SEC ID NO: 1 y 2 (PHACTR3), 4 y 5 (FOXE1), y 7 y 8 (NDRG4) con el fin de detectar el estatus de metilación en el ADN y/o que utiliza sondas seleccionadas entre las sondas que comprenden las secuencias de nucleótidos expuestas en la Tabla 1, preferiblemente que utiliza sondas seleccionadas entre las sondas que comprenden las secuencias de nucleótidos

expuesta como SEC ID NO: 3 (PHACTR3), 6 (FOXE1), y 9 (NDRG4) con el fin de detectar el estatus de metilación en el ADN y/o en donde una única muestra fecal se utiliza como la fuente de la muestra para (a) y (b) opcionalmente en donde la muestra fecal se divide para permitir que se lleven a cabo (a) y (b).

- 5 8. Un método de procesamiento de la muestra que comprende la eliminación de una porción de una muestra fecal recogida y la adición de la porción separada de la muestra a un tampón que impide la desnaturalización o degradación de proteínas de la sangre encontradas en la muestra, seguido de las etapas de detección (a) y (b) de cualquiera de las reivindicaciones 1 a 7.
- 10 9. El método de la reivindicación 8, que comprende adicionalmente:
 - (i) enviar o entregar de otro modo la porción restante de la muestra fecal recogida a un laboratorio para realizar la etapa (b) del método de la reivindicación 1, opcionalmente como se define adicionalmente en una cualquiera de las reivindicaciones 5 a 7, sobre la porción restante de la muestra fecal recogida; y/o
 - 15 (ii) enviar o entregar de otro modo la porción separada de la muestra fecal recogida a un laboratorio para realizar la etapa (a) del método de la reivindicación 1, opcionalmente como se define adicionalmente en cualquiera de las reivindicaciones 2 a 4, sobre la porción separada de la muestra; y/o
 - (iii) realizar la etapa (b) del método de la reivindicación 1, opcionalmente como se define adicionalmente en una cualquiera de las reivindicaciones 5 a 7, sobre la porción restante de la muestra fecal recogida; y/o
 - 20 (iv) realizar la etapa (a) del método de la reivindicación 1, opcionalmente como se define adicionalmente en cualquiera de las reivindicaciones 2 o 4, sobre la porción separada de la muestra.
10. El método de cualquier reivindicación precedente en donde la muestra fecal utilizada para realizar la etapa (b) pesa no más de aproximadamente 4 gramos.
- 25 11. Un kit para la detección de una predisposición a, o la incidencia de, cáncer colorrectal en una muestra fecal que comprende la combinación de:
 - (a) medios para detectar la presencia de sangre en la muestra fecal, en donde la detección de la presencia de sangre es indicativa de una predisposición a, o la incidencia de, cáncer colorrectal; y
 - 30 (b) cebadores y/o sondas que permitan determinar directamente el estatus de metilación de al menos un gen seleccionado entre NDRG4, PHACTR3, FOXE1, GATA4, GPNMB, TFPI2, SOX17, SYNE1, LAMA, MMP2, OSMR, SFRP2 y CDO1 en el ADN, donde la detección del estatus de metilación es indicativo de una predisposición a, o la incidencia de, cáncer colorrectal.
- 35 12. El kit de la reivindicación 11, que comprende cebadores y/o sondas que permiten determinar directamente el estatus de metilación de al menos un gen seleccionado entre PHACTR3, NDRG4 y FOXE1.
- 40 13. El kit de la reivindicación 12, que comprende cebadores y/o sondas que permiten determinar directamente el estatus de metilación en un panel de al menos dos genes seleccionados entre PHACTR3, NDRG4 y FOXE1, proporcionando la detección de la modificación epigenética en al menos uno de los genes una indicación de una predisposición a, o la incidencia de, cáncer colorrectal.
- 45 14. El kit de la reivindicación 13, en donde los cebadores se seleccionan entre cebadores que comprenden las secuencias de nucleótidos expuestas como SEC ID NO: 1 y 2 (PHACTR3), 4 y 5 (FOXE1), y 7 y 8 (NDRG4) y/o en donde las sondas se seleccionan entre sondas que comprenden las secuencias de nucleótidos expuestas como SEC ID NO: 3 (PHACTR3), 6 (FOXE1), y 9 (NDRG4).
- 50 15. El kit de cualquiera de las reivindicaciones 11 a 14, en donde el medio para detectar la presencia de sangre en la muestra fecal comprende medios para la detección de hemoglobina en la muestra fecal, opcionalmente en donde la hemoglobina en la muestra fecal se detecta a través de medios inmunoquímicos.