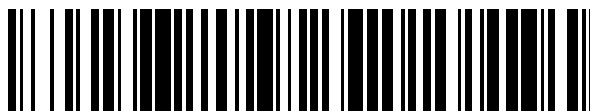


19



OFICINA ESPAÑOLA DE
PATENTES Y MARCAS

ESPAÑA



11 Número de publicación: **2 686 309**

51 Int. Cl.:

C12Q 1/6827 (2008.01)

C12Q 1/6858 (2008.01)

C12Q 1/6886 (2008.01)

12

TRADUCCIÓN DE PATENTE EUROPEA

T3

86 Fecha de presentación y número de la solicitud internacional: **02.02.2012 PCT/US2012/023646**

87 Fecha y número de publicación internacional: **09.08.2012 WO12106525**

96 Fecha de presentación y número de la solicitud europea: **02.02.2012 E 12742758 (1)**

97 Fecha y número de publicación de la concesión europea: **27.06.2018 EP 2670893**

54 Título: **Análisis digital de secuencia de la metilación de ADN**

30 Prioridad:

02.02.2011 US 201161438649 P

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

17.10.2018

73 Titular/es:

**EXACT SCIENCES DEVELOPMENT COMPANY,
LLC (50.0%)**

441 Charmany Drive

Madison, Wisconsin 53719, US y

**MAYO FOUNDATION FOR MEDICAL EDUCATION
AND RESEARCH (50.0%)**

72 Inventor/es:

AHLQUIST, DAVID A.;

TAYLOR, WILLIAM R.;

ZOU, HONGZHI y

LIDGARD, GRAHAM P.

74 Agente/Representante:

CARPINTERO LÓPEZ, Mario

ES 2 686 309 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

Análisis digital de secuencia de la metilación de ADN

Referencia a solicitudes relacionadas

5 La presente solicitud reivindica el beneficio de prioridad de la Solicitud de Patente Provisional de EE. UU. con el Número de Serie 61/438.649, presentada el 2 de febrero de 2011.

Campo de la invención

10 La presente invención se refiere a procedimientos para la determinación y usos de patrones de metilación específicos indicativos de adenoma y carcinoma de acuerdo con las reivindicaciones. En particular, la invención se refiere a análisis de loci CpG definidos que están metilados coordinadamente en los ADN de muestras de cáncer y adenoma, y procedimientos de utilización de análisis de loci metilados coordinadamente o más regiones marcadoras en el diseño de ensayo para adenomas y cánceres que tienen una sensibilidad y especificidad mejoradas.

Antecedentes de la invención

15 En el orden superior de eucariotas, el ADN se puede metilar en las citosinas localizadas 5' a la guanosina en los dinucleótidos CpG. Esta modificación tiene importantes efectos reguladores sobre la expresión genética, especialmente cuando se implican áreas ricas en CpG, conocidas como islas CpG, que se encuentran a menudo en las regiones de promotor de los genes. Mientras que aproximadamente un 75 % de los sitios CpG a lo largo del genoma humano están metilados, los sitios CpG en las islas CpG normalmente o están metilados, y se ha asociado una metilación aberrante de las islas CpG con ciertas enfermedades, incluyendo los cánceres. Por ejemplo, se asocia una hipermetilación de islas CpG con la inactivación transcripcional de genes supresores tumorales definidos en cánceres humanos, por ejemplo, en cáncer colorrectal. Por lo tanto, la detección de un ácido nucleico hipermetilado podría indicar una susceptibilidad o aparición de distintas formas de cánceres.

25 A pesar de las indicaciones que sugieren una relación entre el fenotipo metilador de islas CpG (CIMP) y los cánceres (véase, por ejemplo, Baylin SB, y col., Adv Cancer Res 1998;72:141-196 y Jones PA, y col., Nat Rev Genet 2002;3:415-428), la idea de que el análisis del estado de metilación solo podría ser una herramienta diagnóstica o pronóstica útil ha sido controvertida. Como expone Issa, y col. en una editorial en Gastroenterology 179(3):2005, los investigadores habían mezclado resultados en la confirmación de la relación entre CIMP y cánceres. Aunque se ha demostrado supuestamente en otras múltiples enfermedades malignas (Shen, I., y col. J Natl Cancer Inst 2002;94:755-761; Garcia-Manero G, y col., Clin Cancer Res 2002;8:2217-2224; Toyota M, y col., Blood 2001;97:2823-2829; Ueki T, y col., Cancer Res 2000;60:1835-1839; Toyota M, y col., Cancer Res 1999;59:5438-5442; Strathdee G, y col., Am J Pathol 2001;158:1121-1127; Abe M, y col., Cancer Res 2005;65:828-834) y varios grupos confirmaron los hallazgos originales utilizando marcadores y tecnologías similares (Whitehall VL, y col., Cancer Res 2002;62:6011-6014; van Rijnsoever M, y col., Gut 2002;51:797-802) otros grupos no fueron capaces de establecer dichas relaciones (Eads CA, y col., Cancer Res 2001;61:3410-3418; Esteller M, y col., Cancer Res 2000;60:129-133). Últimamente en 2003, una publicación concluía que todos los casos de metilación en el cáncer colorrectal se relacionaban con la vejez más que con una neoplasia (Yamashita K, y col., Cancer Cell 2003;4:121-131).

40 Los resultados discrepantes se habían atribuido en parte al hecho de que se había demostrado que el 70 % a 80 % de los eventos de metilación aberrante de ADN en el cáncer colorrectal están relacionados con la edad (Toyota M, y col., Proc Natl Acad Sci U S A 1999;96:8681-8686) y que los fenotipos relacionados con el cáncer solo están claros cuando se filtran. También se ha señalado que los procedimientos demasiado sensibles, no cuantitativos pueden sobre-estimar la metilación y enmascarar las distinciones entre la metilación que se asocia con el cáncer y la que no. Issa establece que los "eventos de metilación (solos) pueden no proporcionar el marcador de cáncer universal ideal se pensó una vez que era debido a que los genes diana CIMP no serán útiles para explorar todos los cánceres colorrectales (se prevén muchos falsos negativos), y los genes diana no CIMP probablemente darán una alta tasa de falsos positivos debido a que también están metilados en la mucosa de apariencia normal de individuos ancianos sin tumores" (Issa, y col., supra).

50 Una estrategia para aumentar la especificidad clínica de los análisis de metilación en la detección del cáncer es mirar múltiples genes marcadores. Por ejemplo, Zou y col., examinaron el estado de metilación de BMP3, EYA2, ALX4, y vimentin en muestras de cáncer. Mientras que los niveles de metilación eran significativamente más altos tanto en cáncer como en adenoma que en el epitelio normal, para cada uno de los cuatro genes, la sensibilidad, según se determinó por las curvas operadoras de receptor, no mejoraba significativamente combinando cualquiera o todos los marcadores en comparación con el mejor marcador sencillo (Zou, y col., Cancer Epidemiol Biomarkers Prev 2007;16(12):2686).

55 Zou también miró las neoplasias que presentan metilación en más de uno de los genes marcadores y descubrió que era frecuente la co-metilación, presentando un 72 % de los cánceres y un 84 % de los adenomas ensayados una hipermetilación en dos o más genes. Zou informó que la metilación de uno o más de cuatro (al menos uno), dos o más de cuatro, tres o más de cuatro, o cuatro de cuatro de estos genes marcadores se apreciaba en un 88 %, 72 %,

53 %, y 41 % de 74 cánceres y un 98 %, 84 %, 60 % y 39 % de 62 adenomas, en comparación con el 24 %, 7 %, 3 % y 0 % de 70 epitelios normales, respectivamente, demostrando que, aunque el ensayo se hace progresivamente más específico cuantos más genes se incluyen en el conjunto de co-metilación, la sensibilidad declina vertiginosamente.

- 5 El documento WO 2010/118016 A2 se refiere al uso del análisis de secuencia digital para determinar la fracción de moléculas metiladas en una muestra.

El documento WO 03/064701 A2 desvela un procedimiento para la identificación sistemática de posiciones de dinucleótidos CpG metilados diferencialmente en secuencias de ADN genómico para su uso como marcadores diagnósticos, pronósticos y/o de estado fiables.

- 10 El documento WO 03/044232 A1 desvela procedimientos y kits útiles para detectar neoplasias midiendo el nivel de metilación de biomarcadores, especialmente la región promotora de GSTP1 para la detección de adenocarcinoma de próstata.

- 15 Ahlquist y col., *Gastroenterology*, 138(6), 2010, 2127-2139, está interesado en la detección molecular de neoplasia colorrectal e *inter alia* expone la detección de neoplasia colorrectal por ensayo del ADN fecal con respecto a varios marcadores diferentes.

Zou y col., *Clinical Chemistry*, 56(6), 2010, Supplement, abstract nº D-144, A199, desvela un procedimiento para detectar vimentina metilada y no metilada basándose en una estrategia que combina una PCR con química Invader.

El documento US 2010/273164 A1 desvela procedimientos y composiciones para la determinación de un perfil de citosina metilada de una secuencia de ácido nucleico diana.

- 20 Weisenberg y col., *Nucleic Acid Research*, 36(14), 2008, 4689-4698, se refiere a un análisis de metilación de ADN por secuenciación digital genómica con bisulfitos y MethylLight digital.

El documento US 2010/0124747 A1 se refiere a composiciones y procedimientos para el diagnóstico o pronóstico de cáncer testicular o derivado de células germinales masculinas.

Sumario de la invención

- 25 La presente invención se expone en las reivindicaciones adjuntas. Los casos y realizaciones de la descripción que no se encuentran en el ámbito de dichas reivindicaciones se proporcionan solo con fines ilustrativos, y no forman parte de la presente invención. La divulgación se refiere a procedimientos de identificación de regiones de genes específicos y regiones específicas de ácido nucleico genómico útil en la detección de la metilación asociada con el cáncer colorrectal. Los procedimientos comprenden, por ejemplo, la detección de secuencias metiladas, por ejemplo, en biopsias tisulares, extractos fecales, u otros fluidos corporales con una sensibilidad y especificidad mejoradas. La presente divulgación proporciona procedimientos de análisis de metilación que comprende la identificación de los loci de metilación que presentan relaciones de metilación ventajosas cuando la metilación en células no normales, por ejemplo, células cancerosas o de adenoma se comparan con la metilación de fondo en células normales. La divulgación se refiere a procedimientos de análisis de la metilación en cada uno de varios loci en un conjunto de sitios posibles de metilación en una secuencia marcadora, en la que la presencia de metilación en todos los loci del conjunto de sitios definidos se produce más frecuentemente en células cancerosas y de adenoma que en células normales, dicho hallazgo de metilación en todos los loci del subconjunto de loci definidos de una muestra es indicativo de adenoma o cáncer.

- 40 La divulgación proporciona un procedimiento de identificación de un conjunto de loci CpG metilados en un ácido nucleico marcador en el que la metilación es indicativa de adenoma. que comprende:

a) determinación del estado de metilación de un conjunto de loci CpG definido en cada uno de una pluralidad de copias individuales de un ácido nucleico marcador de una pluralidad de muestras normales;

- 45 b) determinación del estado de metilación de dicho conjunto de loci CpG definido en cada una de una pluralidad de copias individuales de dicho ácido nucleico marcador de una pluralidad de muestras no normales (por ejemplo, de adenoma o cáncer) para identificar un subconjunto de loci CpG definido de dicho conjunto definido,

- 50 en el que el porcentaje de copias individuales de dicho ácido nucleico marcador de dicha pluralidad de muestras normales que están metiladas en todos dichos loci CpG en dicho subconjunto definido es menor que el porcentaje de copias individuales de dicho ácido nucleico marcador de dicha pluralidad de muestras no normales que están metiladas en todos los dichos loci CpG en dicho subconjunto definido, y en el que la metilación en todos los dichos loci CpG de dicho subconjunto definido de dicho ácido nucleico marcador es indicativo de un estado no normal, por ejemplo, un adenoma y/o cáncer. El porcentaje medio de copias individuales del ácido nucleico marcador metilado en todos los loci en dicho conjunto de loci CpG definido en dicha pluralidad de muestras no normales puede ser mayor que la media de porcentaje de copias individuales del ácido nucleico marcador metilado en todos los loci de dicho conjunto de loci CpG definido en la pluralidad de muestras normales. El porcentaje medio de copias

individuales del ácido nucleico marcador metilado en todos los loci de dicho conjunto de loci CpG definido en la pluralidad de muestras no normales puede ser al menos una desviación típica, preferentemente dos desviaciones típicas, más preferentemente tres desviaciones típicas mayor que la media de porcentaje de copias individuales de dicho ácido nucleico marcador metilado en todos los loci de dicho conjunto definido de loci CpG en dicha pluralidad de muestras normales.

En algunas realizaciones, el subconjunto de loci CpG definido consiste en los mismos loci que el conjunto de loci CpG definido.

La determinación del estado de metilación del conjunto de loci CpG puede conseguirse por cualquier procedimiento conocido por los expertos en la técnica. En algunas realizaciones, el procedimiento comprende el tratamiento del ADN de las muestras con bisulfito. El tratamiento de modificación con bisulfito se describe, por ejemplo, en la Pat. de EE. UU. N.º 6.017.704, cuya divulgación completa se incorpora en el presente documento por referencia. En algunas realizaciones, la determinación del estado de metilación del conjunto de loci CpG definido comprende el análisis digital de cada uno de una pluralidad de loci CpG en una pluralidad de copias individuales de un ácido nucleico marcador. En algunas realizaciones preferidas, el análisis digital comprende la secuenciación digital, y/o la PCR digital.

En ciertas realizaciones preferidas, la muestra no normal comprende una muestra de adenoma, y en realizaciones preferidas particulares, comprende una muestra de adenoma colorrectal. En algunas realizaciones preferidas, una muestra no normal comprende una muestra de cáncer, y en ciertas realizaciones preferidas comprenden una muestra de cáncer colorrectal.

La presente invención proporciona procedimientos para la detección del cáncer o adenoma en una muestra, por ejemplo, de un sujeto. En algunas realizaciones, la presente invención proporciona procedimientos que comprende la determinación del estado de metilación de cada locus CpG en un subconjunto de loci CpG definido en al menos una molécula de ácido nucleico marcador de adenoma o cáncer, en el que la metilación de cada uno de los loci CpG del subconjunto de loci CpG definido en la molécula de ácido nucleico marcador de cáncer o adenoma es indicativa de cáncer o adenoma en la muestra. El subconjunto definido comprende al menos tres loci CpG mientras que en realizaciones preferidas, el subconjunto definido comprende al menos cuatro loci CpG o al menos cinco loci CpG.

En ciertas realizaciones, la determinación comprende el análisis de un ensayo de detección de los loci CpG en un ácido nucleico, configurado para determinar el estado de metilación de cada uno de los loci en un ensayo de detección en un único ácido nucleico. En algunas realizaciones preferidas, la determinación comprende el análisis de los loci CpG en un ensayo de detección de ácido nucleico configurado para determinar el estado metilación de cada uno de dichos loci en una única mezcla de reacción. En algunas realizaciones, el ensayo de detección de ácido nucleico comprende un ensayo de extensión por cebador. En ciertas realizaciones preferidas, el ensayo de detección de ácido nucleico puede comprender uno o más de entre un ensayo de amplificación de ácido nucleico, un ensayo de secuenciación de ácido nucleico, un ensayo de escisión específico de la estructura, un ensayo de escisión de 5' nucleasa, un ensayo de escisión invasiva y/o un ensayo de unión.

Los procedimientos de la presente invención no se limitan al análisis de un único ácido nucleico marcador de cáncer o adenoma. Por ejemplo, en algunas realizaciones, el estado de metilación de cada locus CpG en un subconjunto de loci CpG definido en al menos una molécula de ácido nucleico marcador de cáncer o adenoma que comprende el análisis de las moléculas de un ácido nucleico de una pluralidad de marcadores de cáncer o adenoma. En algunas realizaciones, la pluralidad de los marcadores de cáncer o adenoma comprende al menos tres marcadores de cáncer o adenoma, mientras que, en algunas realizaciones, la pluralidad comprende al menos cuatro marcadores de cáncer o adenoma. En algunas realizaciones preferidas, los marcadores de cáncer o adenoma y las moléculas de ácido nucleico se seleccionan de entre el grupo que comprende los marcadores Vimentin, BMP3, Septin 9, TFP12, 2 regiones de LRAT, y EYA4 y moléculas de ácido nucleico. En algunas realizaciones, los procedimientos de ensayo de la invención se combinan con el análisis de uno o más marcadores de cáncer, tales como marcadores de sangre oculta en heces (por ejemplo, hemoglobina, alfa-defensina, calprotectina, α 1-antitripsina, albúmina, MCM2, transferrina, lactoferrina, y lisozima.

En ciertas realizaciones preferidas del procedimiento descrito en el presente documento, una molécula de ácido nucleico marcador de cáncer o adenoma comprende una molécula de ácido nucleico de vimentin, y en algunas realizaciones particularmente preferidas, el subconjunto de loci CpG definido en la molécula de ácido nucleico de vimentin comprende los loci 37, 40 y 45.

En ciertas realizaciones preferidas del procedimiento descrito en el presente documento, una molécula de ácido nucleico marcador de cáncer o adenoma comprende una molécula de ácido nucleico de BMP3, y en algunas realizaciones particularmente preferidas, el subconjunto de loci CpG definido en la molécula de ácido nucleico de BMP3 comprende los loci 34, 53 y 61.

En ciertas realizaciones preferidas del procedimiento descrito en el presente documento, una molécula de ácido nucleico marcador de cáncer o adenoma comprende una molécula de ácido nucleico de Septin 9, y en algunas realizaciones particularmente preferidas, el subconjunto de loci CpG definido en la molécula de ácido nucleico de

Septin 9 comprende los loci 59, 61, 68 y 70.

5 En ciertas realizaciones preferidas del procedimiento descrito en el presente documento, una molécula de ácido nucleico marcador de cáncer o adenoma comprende una molécula de ácido nucleico de TFPI2, y en algunas realizaciones particularmente preferidas, el subconjunto de loci CpG definido en la molécula de ácido nucleico de TFPI2 comprende los loci 55, 59, 63 y 67.

En ciertas realizaciones preferidas del procedimiento descrito en el presente documento, una molécula de ácido nucleico marcador de cáncer o adenoma comprende una molécula de ácido nucleico de EYA4, y en algunas realizaciones particularmente preferidas, el subconjunto de loci CpG definido en la molécula de ácido nucleico de EYA4 comprende los loci 31, 34, 37, y 44.

10 En ciertas realizaciones preferidas del procedimiento descrito en el presente documento, el al menos un marcador de cáncer o adenoma o molécula de ácido nucleico comprende una pluralidad de marcadores o moléculas de ácido nucleico que comprende marcadores o moléculas de ácido nucleico de Vimentin, BMP3, Septin 9, y TFPI2.

15 La presente invención proporciona adicionalmente procedimientos de selección de un subconjunto de loci CpG definido en un ácido nucleico marcador para su uso en un ensayo de detección de ácido nucleico detectando la metilación coordinada del subconjunto de loci CpG definido en el que la metilación coordinada del subconjunto de loci CpG definido es indicativo de un estado no normal, por ejemplo, adenoma o cáncer, comprendiendo el procedimiento A) la determinación del estado de metilación de una pluralidad de loci CpG en cada una de una pluralidad de copias de un ácido nucleico marcador de una pluralidad de muestras normales; b) la determinación del estado de metilación de una pluralidad de loci CpG encada una de una pluralidad de copias individuales de dicho ácido nucleico marcador de una pluralidad de muestras no normales (por ejemplo, adenoma o cáncer), en el que la pluralidad de copias individuales de un ácido nucleico marcador analizado en cada una de dichas muestras de adenoma o cáncer comprende al menos 1.000; c) la determinación de las relaciones de metilación para cada locus de la pluralidad de dichos loci CpG en el ácido nucleico marcador; en el que la determinación de las relaciones de metilación comprende la determinación de la relación entre la media de metilación de cada uno de la pluralidad de loci CpG en las muestras normales respecto a la media de metilación de cada locus CpG correspondiente en dicha pluralidad de loci CpG en las muestras no normales; d) la selección de un conjunto de loci CpG definido en el ácido nucleico marcador, en el que el conjunto de loci CpG definido comprende una pluralidad de loci CpG que tiene relaciones de metilación ventajosas que se correlacionan con el estado no normal (por ejemplo, adenoma o cáncer) y seleccionar un subconjunto de loci CpG definida de dicho conjunto definido, en el que dicho subconjunto de loci CpG definido comprende al menos tres loci CpG, y en el que dicho subconjunto definido se selecciona de manera que el porcentaje de copias individuales de dicho ácido nucleico marcador de dicha pluralidad de muestras normales que están metiladas en todos los dichos menos tres loci CpG de dicho subconjunto definido es menor que el porcentaje de copias individuales de dicho ácido nucleico marcador de dicha pluralidad de muestras de adenoma o dichas muestras de cáncer que están metiladas en todos los dichos al menos tres loci CpG en dicho subconjunto definido.

35 En realizaciones preferidas, la pluralidad de copias individuales de un ácido nucleico marcador que se analiza en muestras normales y no normales (por ejemplo, adenoma o cáncer) comprende preferentemente al menos 10.000 y más preferentemente al menos 100.000 copias. El número de copias analizadas no se limita a estos números completos, sino que puede ser cualquier entero por encima de 10. El número de copias de diferentes tipos de muestra, por ejemplo, normales y no normales no tiene por qué ser igual.

40 En ciertas realizaciones preferidas de los procedimientos de selección de un conjunto de loci CpG definido en un ácido nucleico marcador que se describe en el presente documento, la pluralidad de muestras normales y no normales (por ejemplo, de adenoma o cáncer) que se comparan comprende al menos 10, preferentemente al menos 25, más preferentemente al menos 100 muestras. El número de muestras analizadas no se limita a estos números enteros, sino que puede ser cualquier entero por encima de aproximadamente 10. El número de muestras diferentes de los diferentes tipos de muestra, por ejemplo, normales y no normales, no tiene por qué ser igual.

En ciertas realizaciones el conjunto de loci CpG definido comprende al menos cuatro loci CpG, preferentemente al menos cinco loci CpG.

50 La determinación del estado de metilación de la pluralidad de loci CpG se puede conseguir por cualquier procedimiento conocidos por los expertos en la técnica, incluyendo los descritos como más detalle posteriormente. En algunas realizaciones, el procedimiento comprende el tratamiento del ADN de las muestras con bisulfito. En algunas realizaciones, la determinación del estado de metilación del conjunto de loci CpG definido comprende el análisis digital de cada uno de una pluralidad de loci CpG en una pluralidad de copias individuales de un ácido nucleico marcador. En algunas realizaciones preferidas, el análisis digital comprende la secuenciación digital, y/o la PCR digital. Los procedimientos para preparar las muestras, por ejemplo, muestras fecales, para el análisis también se conocen en la técnica. Véase, por ejemplo, los documentos US7005266; 6.303.304; 5.741.650; 5.952.178; y 6.268.136.

Definiciones

Para facilitar el entendimiento de la presente invención, se definen posteriormente varios términos y frases.

- 5 Como se utiliza en el presente documento, las expresiones “secuenciación digital” y “secuenciación de única molécula” se utilizan de manera intercambiable y se refieren a la determinación de la secuencia de nucleótidos de moléculas de ácido nucleico individuales. Los sistemas para la secuenciación de moléculas individuales incluyen, pero no se limitan a los instrumentos 454 FLX™ o 454 TITANIUM™ (Roche), el SOLEXA™/Analizador de Genoma Illumina, el Secuenciador de Molécula Única HELISCOPE™ (Helicos Biosciences), y el secuenciador de ADN SOLID™ (Life Technologies/Applied Biosystems), así como otras plataformas aún en desarrollo por compañías tales como Intelligent Biosystems y Pacific Biosystems.
- 10 Como se utiliza en el presente documento, el término “de fondo” como se utiliza en referencia a la metilación de un locus o una región se refiere a la metilación que se observa en una célula o muestra normal en un locus o región de un ácido nucleico que generalmente no está metilado en células normales. Por ejemplo, se considera generalmente que las islas CpG están sin metilar en las células humanas normales pero la metilación no está completamente ausente en las islas CpG de células normales.
- 15 Como se utiliza en el presente documento, “metilación” o “metilado”, como se utiliza en referencia al estado de metilación de una citosina, por ejemplo, en un locus CpG, se refiere en general a la presencia o ausencia de un grupo metilo en la posición 5 del resto de citosina (es decir, si una citosina particular es 5-metilcitosina). la metilación se puede determinar directamente, por ejemplo, como se prueba por procedimientos de rutina para el análisis del estado de metilación de citosinas, por ejemplo, determinando la sensibilidad (o falta de la misma) de un resto C en particular a la conversión a uracilo por tratamiento con bisulfito. Por ejemplo, un resto de citosina en una muestra que no se convierte en uracilo cuando la muestra se trata con bisulfito de la manera que se esperaría que se convirtiera ese resto si no estuviera metilado (por ejemplo, en condiciones en las que la mayoría o todas las citosinas no metiladas en la muestra se convierten en uracilos) se puede en general considerar como “metilado”.
- 20 Como se utiliza en el presente documento, las expresiones “PCR digital”, “PCR de molécula única” y “amplificación de molécula única” se refiere a una PCR y otros procedimientos de amplificación de ácido nucleico que están configurados para proporcionar un producto de amplificación o señal de una única molécula de partida. Normalmente, las muestras se dividen, por ejemplo, por dilución seriada o por partición en porciones suficientemente pequeñas (por ejemplo, en microcámaras o en emulsiones) de manera que cada porción o dilución tiene, de media, no más de una única copia del ácido nucleico diana. Los procedimientos de PCR de molécula única se describen en, por ejemplo, el documento US 6.143.496, que se refiere un conjunto para contener y particionar fluidos; y el documento US 7.459.315, que se refiere a un procedimiento de división de una muestra en un conjunto con cámaras de muestra en las que las muestras se particionan por afinidad de superficie a las cámaras, entonces se sellan las cámaras con un “fluido de desplazamiento” curable. Véase también los documentos US 6.440.706 y US 6.753.147, y Vogelstein, y col., Proc. Natl. Acad. Sci. USA Vol. 96, pp. 9236-9241, agosto de 1999. Véase también el documento US 20080254474, que describe una combinación de PCR digital combinada con detección de la metilación.
- 25 Como se utiliza en el presente documento, “sensibilidad” como se utiliza en referencia a un ensayo diagnóstico, por ejemplo, un ensayo de metilación se refiere a sensibilidad clínica – la proporción de muestras positivas quedan un resultado positivo utilizando un ensayo diagnóstico. La sensibilidad se calcula en general como el número de positivos verdaderos identificados por el ensayo, dividido por la suma del número de positivos verdaderos y el número de falsos negativos determinados por el ensayo de muestras conocidas positivas. De manera similar, el término “especificidad” se refiere a la proporción o número de negativos verdaderos determinados por el ensayo dividido por la suma del número de negativos verdaderos y el número de falsos positivos determinados por el ensayo de muestras negativas conocidas.
- 30 Como se utiliza en el presente documento en referencia a ensayos diagnósticos o análisis, el término “complementario” se refiere a diferentes ensayos que, cuando se utilizan en conjunto, proporciona un resultado más sensible y/o específico que el que se puede proporcionar por cualquiera de los diferentes ensayos utilizados solos.
- 35 Como se utiliza en el presente documento, el término “informativo” o “informatividad” se refiere a una cualidad de un marcador o panel de marcadores, y específicamente a la probabilidad de encontrar un marcador (o panel de marcadores) en una muestra positiva.
- 40 El término “muestra” como se utiliza en el presente documento se utiliza en su sentido más amplio. Por ejemplo, una muestra sospechosa de contener un gen o cromosoma humano o secuencias asociadas con un cromosoma humano puede comprender una célula, cromosomas aislados de una célula (por ejemplo, un manojo de cromosomas en metafase), ADN genómico (en solución o unido a un soporte sólido tal como por análisis de transferencia de Southern), ADNc (en solución o unido a un soporte sólido) y similares.
- 45 Como se utiliza en el presente documento, la expresión “isla CpG” se refiere a una región de un ADN genómico que contiene un alto porcentaje de sitios CpG respecto a la incidencia media de CpG genómico (por la misma especie, por el mismo individuo, o por subpoblación (por ejemplo, cepa, subpoblación óptica, o similares). Existen distintos parámetros y definiciones para las islas CpG; por ejemplo, en algunas realizaciones, las islas CpG se definen como
- 50
- 55

que tienen un porcentaje de GC que es mayor del 50 % y con una relación de CpG observada/esperada que es mayor del 60 % (Gardiner-Garden y col. (1987) *J Mol. Biol.* 196:261-282; Baylin y col. (2006) *Nat. Rev. Cancer* 6:107-116; Irizarry y col. (2009) *Nat. Genetics* 41:178-186; cada uno incorporado en el presente documento por referencia en su totalidad). En algunas realizaciones, las islas CpG pueden tener un contenido en GC >55 % y la CpG observada/ CpG esperada de 0,65 (Takai y col. (2007) *PNAS* 99:3740-3745; que se incorpora en el presente documento por referencia en su totalidad). También existen distintos parámetros con respecto a la longitud de las islas CpG. Como se utiliza en el presente documento, las islas CpG pueden tener menos de 100 pb; 100-200 pb, 200-300 pb, 300-500 pb, 500-750 pb; 750-100 pb; 1000 o más pb de longitud. En algunas realizaciones, las islas CpG muestran patrones de metilación alterados con respecto a los controles (por ejemplo, la metilación alterada en los sujetos cancerosos con respecto a los sujetos sin cáncer; los patrones de metilación alterados específicos de tejido; metilación alterada en las heces de los sujetos con neoplasia colorrectal (por ejemplo, cáncer colorrectal, adenoma colorrectal) con respecto a los sujetos sin neoplasia colorrectal). En algunas realizaciones, la metilación alterada implica hipermetilación. En algunas realizaciones, la metilación alterada implica hipometilación.

Como se utiliza en el presente documento, la expresión “costa CpG” o “costa de la isla CpG” se refiere a una región genómica externa a una isla CpG que es o que tiene el potencial de tener patrones de metilación alterados (véase, por ejemplo, Irizarry y col. (2009) *Nat. Genetics* 41:178-186; que se incorpora en el presente documento por referencia en su totalidad). Las costas de islas CpG puede mostrar patrones de metilación alterada con respecto a los controles (por ejemplo, la metilación alterada en los sujetos de cáncer con respecto a los sujetos sin cáncer; patrones de metilación alterados específicos de tejidos; metilación alterada en heces de sujetos con neoplasia colorrectal (por ejemplo, cáncer colorrectal, adenoma colorrectal) con respecto a sujetos sin neoplasia colorrectal). En algunas realizaciones, la metilación alterada implica hipermetilación. En algunas realizaciones, la metilación alterada implica hipometilación. Las costas de islas CpG puede localizarse en distintas regiones con respecto a las islas CpG (véase, por ejemplo, Irizarry y col. (2009) *Nat. Genetics* 41:178-186; que se incorpora en el presente documento por referencia en su totalidad). En consecuencia, en algunas realizaciones, las costas de islas CpG se localizan a menos de 100 pb; 100-250 pb; 250-500 pb; 500-1000 pb; 1000-1500 pb; 1500-2000 pb; 2000-3000 pb; 3000 pb o más, distancia de la isla CpG.

El término “diana”, cuando se utiliza en referencia a un procedimiento de detección o análisis de ácido nucleico, se refiere a un ácido nucleico que tiene una secuencia particular de nucleótido que se va a detectar o analizar, por ejemplo, en una muestra sospechosa de contener el ácido nucleico diana. En algunas realizaciones, una diana es un ácido nucleico que tiene una secuencia particular para la cual es deseable determinar un estado de metilación. Cuando se utiliza en referencia a una reacción en cadena de polimerasa, “diana” se refiere en general a la región de ácido nucleico unida por cebadores utilizados para la reacción en cadena de polimerasa. Por lo tanto, se busca que la “diana” se clasifique fuera de otras secuencias de ácido nucleico que puede estar presente en una muestra. Un “segmento” se define como una región de ácido nucleico en la secuencia diana. La expresión “matriz de muestra” se refiere al ácido nucleico que se origina de una muestra que se analiza en cuanto a la presencia de una diana.

Como se utiliza en el presente documento, el término “locus” se refiere a una posición particular, por ejemplo, de una mutación, polimorfismo o un resto de C en un dinucleótido CpG, en una región definida o segmento de ácido nucleico, tal como un gen o cualquier otra secuencia caracterizada en un cromosoma o molécula de ARN. Un locus no se limita a cualquier tamaño o longitud particular, y se puede referir a una parte de un cromosoma, un gen, elemento genético funcional, o un único nucleótido o par de bases. Como se utiliza en el presente documento, en referencia a sitios CpG que se pueden metilar, un locus se refiere al resto C del dinucleótido CpG.

Como se utiliza en el presente documento, la expresión “relación de metilación” se refiere a la cantidad o grado de metilación observada para la metilación de una región o locus en particular (por ejemplo, un locus CpG en un gen o región marcadora) en una pluralidad de células no normales (por ejemplo, células en un estado de enfermedad particular, tal como células cancerosas o pre-cancerosas) en comparación con la cantidad o grado de metilación observada para la misma región o locus en una pluralidad de células normales (por ejemplo, células que no están en un estado de enfermedad particular de interés). Por ejemplo, para un locus CpG que presenta una metilación media del 8,39889 % en un muestreo de células normales y una metilación media de 74,0771 % en un muestreo de una pluralidad de células de adenoma, una relación de metilación se puede expresar como la relación de la media determinada para células normales: células de adenoma, o 0,11348. Una relación de metilación no necesita expresarse de una manera en particular o por cualquier cálculo en particular. A modo de ejemplo y sin limitación, la relación de metilación anterior puede expresarse de manera alternativa, por ejemplo, como 8,39889:74,0771; 8,39889/74,0771:8,39889; como un “veces de metilación sobre la de fondo” 8,81987 calculada, etc.

Como se utiliza en el presente documento, “relación de metilación ventajosa” se refiere a una relación de metilación para un locus en el que la metilación se correlaciona con un estado celular, por ejemplo, un estado de enfermedad particular (por ejemplo, normal, pre-cancerosa, cancerosa) que, cuando se compara con la metilación de otro loci que se correlaciona con el mismo estado de enfermedad, presenta un porcentaje de metilación más alto en una población de células no normales en comparación con los niveles de metilación de fondo en el mismo locus en una población de células normales. En algunos ejemplos, ciertos loci CpG, por ejemplo, en una secuencia marcadora de metilación, se presenta una señal-respecto a-ruido mayor, es decir, el grado de metilación en comparación con el de fondo que otro loci en la misma secuencia marcadora. En otros casos, ciertos genes marcadores o genes asociados con enfermedad presentan relaciones de metilación ventajosas en algunos o todos los loci en comparación con las

relaciones de metilación observada en algunos o todos los loci en otra secuencia marcadora.

Como se utiliza en el presente documento, la expresión “metilado coordinadamente” se utiliza en referencia a la metilación de loci, por ejemplo, loci CpG en una secuencia marcadora, que presentan un patrón de metilación particular que se correlaciona con un estado celular, por ejemplo, un estado de enfermedad en particular (por ejemplo, normal, pre-canceroso, canceroso). En realizaciones preferidas la metilación de loci que están todos metilados de manera correlacionada con un estado de enfermedad se puede considerar que están metilados coordinadamente en células que tienen ese estado de enfermedad. “metilación coordinada” no se limita a situaciones en las que todos los loci coordinados están metilados. Cualquier patrón de metilación entre un conjunto de loci particular que se correlaciona con un estado celular, incluyendo los patrones en los que todos los loci coordinados están metilados, patrones en los que los loci presentan un patrón de metilación y no metilación reproducible, y los patrones en los que ninguno de los loci del conjunto está metilado, se incluyen todos en el significado de “metilado coordinadamente”.

Como se utiliza en el presente documento, la expresión “análisis de metilación coordinada” se utiliza de manera intercambiable con “análisis de multimetilación” y se refiere a un ensayo en el que los estados de metilación de una pluralidad de metilación de loci individuales en una secuencia marcadora, por ejemplo, loci CpG, se determinan juntos. En realizaciones preferidas, el análisis de metilación coordinada se lleva a cabo utilizando un procedimiento de copia única/digital (por ejemplo, una secuenciación digital) o un procedimiento de ensayo configurado para interrogar todos los loci CpG seleccionados en cada molécula ensayada, de manera que se revele al patrón de metilación de cada molécula única.

Como se utiliza en el presente documento, la expresión “conjunto definido” de loci CpG (u otra metilación de loci) se refiere al conjunto de loci CpG en un gen o región marcadora para el análisis de metilación. Un conjunto definido de loci CpG en un gen o región marcadora puede comprender todos los loci CpG del gen o región, o puede comprender menos de todos los loci de ese gen o región.

Como se utiliza en el presente documento, la expresión “subconjunto definido” de loci CpG (u otra metilación de loci) se refiere a un subconjunto del conjunto definido de loci CpG en un gen o región marcadora cuya metilación se ha determinado que es indicativa de un estado o normal, por ejemplo, de un adenoma o cáncer. Por ejemplo, en el análisis de metilación coordinada para determinar la presencia de cáncer colorrectal, se determina el estado de metilación de un subconjunto definido de loci CpG en al menos una molécula de ácido nucleico marcador, siendo la metilación simultánea de todos los dicho loci CpG en el subconjunto definido indicativo de cáncer en la muestra. Un subconjunto definido de loci CpG en un gen o región marcadora puede comprender todos los loci CpG en el conjunto definido, o puede comprender menos de todos los loci en el conjunto definido de loci en ese gen o región.

Como se utiliza en el presente documento, la expresión “cáncer colorrectal” significa que incluye la definición médica bien aceptada que define el cáncer colorrectal como una afección médica caracterizada por el cáncer de células del tracto intestinal por debajo del intestino delgado (por ejemplo, en el intestino grueso (colon), incluyendo el ciego, colon ascendente, colon trasverso, colon descendente, y colon sigmoideo, y recto). Adicionalmente, como se utiliza en el presente documento, la expresión “cáncer colorrectal significa que incluye adicionalmente las afecciones médicas que se caracterizan por el cáncer de células del duodeno e intestino delgado (yeyuno e íleon).

Como se utiliza en el presente documento, el término “metástasis” significa que se refiere al proceso en el que las células cancerosas que se originan en un órgano o parte del cuerpo se relocalizan en otra parte del cuerpo y continúan replicándose. Las células metastatizadas posteriormente forman tumores que se pueden metastatizar adicionalmente. La metástasis por lo tanto se refiere a la diseminación del cáncer desde la parte del cuerpo donde existía originalmente a otras partes del cuerpo. Como se utiliza en el presente documento, la expresión “células de cáncer colorrectal metastatizadas” significa que se refiere a células del cáncer colorrectal que han metastatizado; las células de cáncer colorrectal localizadas en una parte del cuerpo distinta del duodeno, intestino delgado (yeyuno e íleon), intestino grueso (colon), incluyendo el ciego, colon ascendente, colon trasverso, colon descendente, y colon sigmoideo, y recto.

Como se utiliza en el presente documento, “un individuo sospechoso de ser susceptible a un cáncer colorrectal metastatizado” significa que se refiere a un individuo que tiene un riesgo por encima de la media de desarrollar un cáncer colorrectal metastatizado. Ejemplos de individuos con un riesgo particular de desarrollar un cáncer colorrectal metastatizado son los que cuya historia médica de familia indica una incidencia por encima de la media de cáncer colorrectal entre los miembros de la familia y/o los que ya han desarrollado un cáncer colorrectal y se han tratado eficazmente que por lo tanto afronta un riesgo de recaída o recurrencia. Otros factores que pueden contribuir a un riesgo por encima de la media de desarrollar un cáncer colorrectal metastatizado que por lo tanto daría lugar a la clasificación de un individuo como que es sospechoso de ser susceptible a un cáncer colorrectal metastatizado se puede basar en la genética específica del individuo, los antecedentes médicos o de comportamiento y las características.

El término “neoplasia” como se utiliza en el presente documento se refiere a cualquier crecimiento nuevo y anormal de tejido. Por lo tanto, una neoplasia puede ser una neoplasia premaligna o una neoplasia maligna.

La expresión “marcador específico de neoplasia” se refiere a cualquier material biológico que se puede utilizar para indicar la presencia de una neoplasia. Ejemplos de materiales biológicos incluyen, sin limitación, ácidos nucleicos, polipéptidos, carbohidratos, ácidos grasos, componentes celulares (por ejemplo, membranas celulares y mitocondrias), y células completas. En algunos casos, los marcadores son regiones de ácido nucleico particulares, por ejemplo, genes, regiones intragénicas, etc. Se hace referencia a las regiones de ácido nucleico que son marcadoras, por ejemplo, como “genes marcadores”, “regiones marcadoras”, “secuencias marcadoras”, etc.

La expresión “marcador específico de neoplasia colorrectal” se refiere a cualquiera material biológico que se puede utilizar para indicar la presencia de una neoplasia colorrectal (por ejemplo, una neoplasia colorrectal premaligna, una neoplasia colorrectal maligna). Ejemplos de marcadores específicos de neoplasia colorrectal incluyen, pero no se limitan a, marcadores epiteliales exfoliados (por ejemplo, bmp-3, bmp-4, SFRP2, vimentin, septin 9, ALX4, EYA4, TFP12, NDRG4, FOXE1, ADN largo, BAT-26, K-ras, APC, antígeno genético de melanoma, p53, BRAF, y PIK3CA) y marcadores de sangre oculta fecal (por ejemplo, hemoglobina, alfa-defensina, calprotectina, α1-antitripsina, albúmina, MCM2, transferrina, lactoferrina y lisozima). Véase también los documentos US 7485420; US7432050; US5352775; US5648212; USRE36713; US5527676; US5955263; US6090566; US6245515; US6677312; US6800617; US7087583; y US7267955.

Marcadores adicionales incluyen, pero no se limitan a los de la Tabla 1, a continuación:

Tabla 1

Acceso	Símbolo	ID del gen	Referencia
NM_000038	APC	324	DNA Methylation And Cancer Therapy, Landes Bioscience 2005, ed. Moshe Szyf
NM_000044	AR	367	DNA Methylation And Cancer Therapy, Landes Bioscience 2005, ed. Moshe Szyf
AB033043	KIAA1217	56243	www.methdb.de/ y/o www.mdanderson.org/
AK055404	KIAA0984	23329	www.methdb.de/ y/o www.mdanderson.org/
AK090480			www.methdb.de/ y/o www.mdanderson.org/
BC041476			www.methdb.de/ y/o www.mdanderson.org/
BX648962	DKFZp686K1684	440034	www.methdb.de/ y/o www.mdanderson.org/
NM_000017	ACADS	35	www.methdb.de/ y/o www.mdanderson.org/
NM_000022	ADA	100; 79015	www.methdb.de/ y/o www.mdanderson.org/
NM_000038	APC	324	www.methdb.de/ y/o www.mdanderson.org/
NM_000038	APC	324	Weber y col. Nature Genetics 37(8), 2005, 853-862
M_000043	FAS	355; 819114	Weber y col. Nature Genetics 37(8), 2005, 853-862
NM_000044	AR	367	www.methdb.de/ y/o www.mdanderson.org/
NM_000044	AR	367	Weber y col. Nature Genetics 37(8), 2005, 853-862
NM_000076	CDKN1C	1028	www.methdb.de/y/www.mdanderson.org/
NM_000077	CDKN2A	1029; 51198	DNA Methylation And Cancer Therapy, Landes Bioscience 2005, ed. Moshe Szyf
NM_000077	CDKN2A	1029; 51198	www.methdb.de/ y/o www.mdanderson.org/
NM_000077	CDKN2A	1029; 51198	Weber y col. Nature Genetics 37(8), 2005, 853-862

(continuación)

Acceso	Símbolo	ID del gen	Referencia
NM_000088	COL1A1	1277	www.methdb.de/y/www.mdanderson.org/
NM_000095	COMP	1311	www.methdb.de/ y/o www.mdanderson.org/
NM_000104	CYP1B1	1545	www.methdb.de/ y/o www.mdanderson.org/
NM_000115	EDNRB	1910	www.methdb.de/ y/o www.mdanderson.org/
NM_000115	EDNRB	1910	Weber y col. Nature Genetics 37(8), 2005, 853-862
NM_000115	EDNRB	1910	www.methdb.de/ y/o www.mdanderson.org/
NM_000125	ESR1	2099	DNA Methylation And Cancer Therapy, Landes Bioscience 2005, ed. Moshe Szyf
NM_000125	ESR1	2099	DNA Methylation And Cancer Therapy, Landes Bioscience 2005, ed. Moshe Szyf
NM_000125	ESR1	2099	www.methdb.de/ y/o www.mdanderson.org/
NM_000125	ESR1	2099	Weber y col. Nature Genetics 37(8), 2005, 853-862
NM_000182	HADHA	3030	www.methdb.de/ y/o www.mdanderson.org/
NM_000193	SHH	6469	Keshet y col. Nature Genetics 38(2), 2006, 149-153
NM_000249	MLH1	4292	DNA Methylation And Cancer Therapy, Landes Bioscience 2005, ed. Moshe Szyf
NM_000249	MLH1	4292	www.methdb.de/ y/o www.mdanderson.org/
NM_000280	PAX6	5080	www.methdb.de/ y/o www.mdanderson.org/
NM_000280	PAX6	5080	Keshet y col. Nature Genetics 38(2), 2006, 149-153
NM_000280	PAX6	5080	Weber y col. Nature Genetics 37(8), 2005, 853-862
NM_000308	PPGB	5476	www.methdb.de/ y/o www.mdanderson.org/
NM_000314	PTEN	5728	DNA Methylation And Cancer Therapy, Landes Bioscience 2005, ed. Moshe Szyf
NM_000321	RB1	5925	DNA Methylation And Cancer Therapy, Landes Bioscience 2005, ed. Moshe Szyf
NM_000321	RB1	5925	www.methdb.de/y/www.mdanderson.org/

(continuación)

Acceso	Símbolo	ID del gen	Referencia
NM_000336	SCNN1B	6338	www.methdb.de/y/www.mdanderson.org/
NM_000362	TIMP3	7078	DNA Methylation And Cancer Therapy, Landes Bioscience 2005, ed. Moshe Szyf
NM_000362	TIMP3	7078	www.methdb.de/y/www.mdanderson.org/
NM_000362	TIMP3	7078	Weber y col. Nature Genetics 37(8), 2005, 853-862
NM_000378	WT1	7490	www.methdb.de/ y/o www.mdanderson.org/
NM_000402	G6PD	2539	www.methdb.de/ y/o www.mdanderson.org/
NM_000438	PAX3	5077	www.methdb.de/ y/o www.mdanderson.org/
NM_000443	ABCB4	5244	www.methdb.de/ y/o www.mdanderson.org/
NM_000453	SLC5A5	6528	www.methdb.de/ y/o www.mdanderson.org/
NM_000453	SLC5A5	6528	www.methdb.de/ y/o www.mdanderson.org/
NM_000475	NR0B1	190	www.methdb.de/y/www.mdanderson.org/
NM_000492	CFTR	1080	www.methdb.de/ y/o www.mdanderson.org/
NM_000492	CFTR	1080	Keshet y col. Nature Genetics 38(2), 2006, 149-153
NM_000514	GDNF	2668	Keshet y col. Nature Genetics 38(2), 2006, 149-153
NM_000517	HBA2	3040	Keshet y col. Nature Genetics 38(2), 2006, 149-153
NM_000520	HEXA	3073; 80072	Keshet y col. Nature Genetics 38(2), 2006, 149-153
NM_000524	HTR1A	3350	Keshet y col. Nature Genetics 38(2), 2006, 149-153
NM_000551	VHL	7428	DNA Methylation And Cancer Therapy, Landes Bioscience 2005, ed. Moshe Szyf
NM_000551	VHL	7428	www.methdb.de/y/www.mdanderson.org/
NM_000551	VHL	7428	Weber y col. Nature Genetics 37(8), 2005, 853-862
NM_000610	CD44	960	Weber y col. Nature Genetics 37(8), 2005, 853-862
NM_000610	CD44	960	www.methdb.de/ y/o www.mdanderson.org/

(continuación)

Acceso	Símbolo	ID del gen	Referencia
NM_000612	IGF2	3481; 492304	www.methdb.de/ y/o www.mdanderson.org/
NM_000620	NOS1	4842	Keshet y col. Nature Genetics 38(2), 2006, 149-153
NM_000680	ADRA1A	148	Keshet y col. Nature Genetics 38(2), 2006, 149-153
NM_000717	CA4	762	Keshet y col. Nature Genetics 38(2), 2006, 149-153
NM_000721	CACNA1 E	777	Keshet y col. Nature Genetics 38(2), 2006, 149-153
NM_000782	CYP24A1	1591	Keshet y col. Nature Genetics 38(2), 2006, 149-153
NM_000799	EPO	2056	www.methdb.de/ y/o www.mdanderson.org/
NM_000813	GABRB2	2561	Keshet y col. Nature Genetics 38(2), 2006, 149-153
NM_000818	GAD2	2572	Keshet y col. Nature Genetics 38(2), 2006, 149-153
NM_000829	GRIA4	2893	Keshet y col. Nature Genetics 38(2), 2006, 149-153
NM_000830	GRIK1	2897	Keshet y col. Nature Genetics 38(2), 2006, 149-153
NM_000834	GRIN2B	2904	Keshet y col. Nature Genetics 38(2), 2006, 149-153
NM_000843	GRM6	2916	Keshet y col. Nature Genetics 38(2), 2006, 149-153
NM_000852	GSTP1	2950	DNA Methylation And Cancer Therapy, Landes Bioscience 2005, ed. Moshe Szyf
NM_000852	GSTP1	2950	www.methdb.de/ y/o www.mdanderson.org/
NM_000852	GSTP1	2950	Weber y col. Nature Genetics 37(8), 2005, 853-862
NM_000857	GUCY1 B3	2983	Keshet y col. Nature Genetics 38(2), 2006, 149-153
NM_000863	HTR1B	3351	Keshet y col. Nature Genetics 38(2), 2006, 149-153
NM_000902	MME	4311	www.methdb.de/ y/o www.mdanderson.org/
NM_000914	OPRM1	4988	Keshet y col. Nature Genetics 38(2), 2006, 149-153
NM_000915	OXT	5020	Keshet y col. Nature Genetics 38(2), 2006, 149-153
NM_000926	PGR	5241	www.methdb.de/ y/o www.mdanderson.org/

(continuación)

Acceso	Símbolo	ID del gen	Referencia
NM_000927	ABCB1	5243	www.methdb.de/y/www.mdanderson.org/
NM_000959	PTGFR	5737	Keshet y col. Nature Genetics 38(2), 2006, 149-153
NM_000965	RARB	5915	DNA Methylation And Cancer Therapy, Landes Bioscience 2005, ed. Moshe Szyf
NM_000965	RARB	5915	www.methdb.de/ y/o www.mdanderson.org/
NM_000965	RARB	5915	Weber y col. Nature Genetics 37(8), 2005, 853-862
NM_000997	RPL37	6167	Keshet y col. Nature Genetics 38(2), 2006, 149-153
NM_001001336	CYB5R2	51700	Keshet y col. Nature Genetics 38(2), 2006, 149-153
NM_001001723	TMEM1	7109	Keshet y col. Nature Genetics 38(2), 2006, 149-153
NM_001002295	GATA3	2625	Keshet y col. Nature Genetics 38(2), 2006, 149-153
NM_001003689	L3MBTL2	83746	Keshet y col. Nature Genetics 38(2), 2006, 149-153
NM_001003891	PCQAP	51586	DNA Methylation And Cancer Therapy, Landes Bioscience 2005, ed. Moshe Szyf
NM_001007792	NTRK1	4914	Keshet y col. Nature Genetics 38(2), 2006, 149-153
NM_001008503	OPRM1	4988	Keshet y col. Nature Genetics 38(2), 2006, 149-153
NM_001008504	OPRM1	4988	Keshet y col. Nature Genetics 38(2), 2006, 149-153
NM_001008505	OPRM1	4988	Keshet y col. Nature Genetics 38(2), 2006, 149-153
NM_001009598	RXRG	6258	Keshet y col. Nature Genetics 38(2), 2006, 149-153
NM_001011545	BACH1	571	Keshet y col. Nature Genetics 38(2), 2006, 149-153
NM_001012331	NTRK1	4914	Keshet y col. Nature Genetics 38(2), 2006, 149-153
NM_001013464	LOC401363	401363; 441242; 402532	www.methdb.de/ y/o www.mdanderson.org/
NM_001018084	SLC26A10	65012	Keshet y col. Nature Genetics 38(2), 2006, 149-153
NM_001020658	PUM1	9698; 28997	Keshet y col. Nature Genetics 38(2), 2006, 149-153
NM_001024844	CD82	3732	www.methdb.de/ y/o www.mdanderson.org/

ES 2 686 309 T3

(continuación)

Acceso	Símbolo	ID del gen	Referencia
NM_001025205	AP2M1	1173	Keshet y col. Nature Genetics 38(2), 2006, 149-153
NM_001025604	ARRDC2	27106	Keshet y col. Nature Genetics 38(2), 2006, 149-153
NM_001033044	GLUL	2752	Keshet y col. Nature Genetics 38(2), 2006, 149-153
NM_001033056	GLUL	2752	Keshet y col. Nature Genetics 38(2), 2006, 149-153
NM_001033518	WIPI2	26100	Keshet y col. Nature Genetics 38(2), 2006, 149-153
NM_001033519	WIPI2	26100	Keshet y col. Nature Genetics 38(2), 2006, 149-153
NM_001033520	WIPI2	26100	Keshet y col. Nature Genetics 38(2), 2006, 149-153
NM_001033952	CALCA	796	www.methdb.de/ y/o www.mdanderson.org/
NM_001036	RYR3	6263	Keshet y col. Nature Genetics 38(2), 2006, 149-153
NM_001043	SLC6A2	6530	Keshet y col. Nature Genetics 38(2), 2006, 149-153
NM_001053	SSTR5	6755	Keshet y col. Nature Genetics 38(2), 2006, 149-153
NM_001059	TACR3	6870	Keshet y col. Nature Genetics 38(2), 2006, 149-153
NM_001063	TF	7018	Keshet y col. Nature Genetics 38(2), 2006, 149-153
NM_001100	ACTA1	58	Keshet y col. Nature Genetics 38(2), 2006, 149-153
NM_001109	ADAM8	101	Keshet y col. Nature Genetics 38(2), 2006, 149-153
NM_001176	ARHGDIG	398	Keshet y col. Nature Genetics 38(2), 2006, 149-153
NM_001186	BACH1	571	Keshet y col. Nature Genetics 38(2), 2006, 149-153
NM_001204	BMPR2	659	Keshet y col. Nature Genetics 38(2), 2006, 149-153
NM_001228	CASP8	841	www.methdb.de/ y/o www.mdanderson.org/
NM_001250	CD40	958	Keshet y col. Nature Genetics 38(2), 2006, 149-153
NM_001257	CDH13	1012	www.methdb.de/ y/o www.mdanderson.org/
NM_001319	CSNK1G2	1455	Keshet y col. Nature Genetics 38(2), 2006, 149-153

(continuación)

Acceso	Símbolo	ID del gen	Referencia
NM_001325	CSTF2	1478	Keshet y col. Nature Genetics 38(2), 2006, 149-153
NM_001385	DPYS	1807; 55412	Keshet y col. Nature Genetics 38(2), 2006, 149-153
NM_001451	FOXF1	2294	Keshet y col. Nature Genetics 38(2), 2006, 149-153
NM_001454	FOXJ1	2302	Keshet y col. Nature Genetics 38(2), 2006, 149-153
NM_001458	FLNC	2318	Keshet y col. Nature Genetics 38(2), 2006, 149-153
NM_001480	GALR1	2587	Keshet y col. Nature Genetics 38(2), 2006, 149-153
NM_001538	HSF4	3299	Keshet y col. Nature Genetics 38(2), 2006, 149-153
NM_001553	IGFBP7	3490; 818325	www.methdb.de/ y/o www.mdanderson.org/
NM_001572	IRF7	3665	www.methdb.de/ y/o www.mdanderson.org/
NM_001628	AKR1B1	231	Keshet y col. Nature Genetics 38(2), 2006, 149-153
NM_001635	AMPH	273	Keshet y col. Nature Genetics 38(2), 2006, 149-153
NM_001651	AQP5	362	Keshet y col. Nature Genetics 38(2), 2006, 149-153
NM_001718	BMP6	654	DNA Methylation And Cancer Therapy, Landes Bioscience 2005, ed. Moshe Szyf
NM_001753	CAV1	857	DNA Methylation And Cancer Therapy, Landes Bioscience 2005, ed. Moshe Szyf
NM_001753	CAV1	857	www.methdb.de/ y/o www.mdanderson.org/
NM_001768	CD8A	925	Keshet y col. Nature Genetics 38(2), 2006, 149-153
NM_001801	CDO1	1036	Keshet y col. Nature Genetics 38(2), 2006, 149-153
NM_001851	COL9A1	1297	Keshet y col. Nature Genetics 38(2), 2006, 149-153
NM_001883	CRHR2	1395	Keshet y col. Nature Genetics 38(2), 2006, 149-153
NM_001884	HAPLN1	1404	Keshet y col. Nature Genetics 38(2), 2006, 149-153
NM_001927	DES	1674	Keshet y col. Nature Genetics 38(2), 2006, 149-153
NM_001954	DDR1	780	DNA Methylation And Cancer Therapy, Landes Bioscience 2005, ed. Moshe Szyf

ES 2 686 309 T3

(continuación)

Acceso	Símbolo	ID del gen	Referencia
NM_001958	EEF1A2	1917	Keshet y col. Nature Genetics 38(2), 2006, 149-153
NM_001972	ELA2	1991	Keshet y col. Nature Genetics 38(2), 2006, 149-153
NM_001975	ENO2	2026	Keshet y col. Nature Genetics 38(2), 2006, 149-153
NM_001989	EVX1	2128	Keshet y col. Nature Genetics 38(2), 2006, 149-153
NM_002007	FGF4	2249	Keshet y col. Nature Genetics 38(2), 2006, 149-153
NM_002012	FHIT	2272; 246734	www.methdb.de/ y/o www.mdanderson.org/
NM_002024	FMR1	2332	www.methdb.de/ y/o www.mdanderson.org/
NM_002065	GLUL	2752	Keshet y col. Nature Genetics 38(2), 2006, 149-153
NM_002110	HCK	3055	Keshet y col. Nature Genetics 38(2), 2006, 149-153
NM_002127	HLA-G	3135	Keshet y col. Nature Genetics 38(2), 2006, 149-153
NM_002148	HOXD10	3236	Keshet y col. Nature Genetics 38(2), 2006, 149-153
NM_002155	HSPA6	3310	Keshet y col. Nature Genetics 38(2), 2006, 149-153
NM_002191	INHA	3623	DNA Methylation And Cancer Therapy, Landes Bioscience 2005, ed. Moshe Szyf
NM_002212	ITGB4BP	3692	Keshet y col. Nature Genetics 38(2), 2006, 149-153
NM_002221	ITPKB	3707	Keshet y col. Nature Genetics 38(2), 2006, 149-153
NM_002235	KCNA6	3742	Keshet y col. Nature Genetics 38(2), 2006, 149-153
NM_002253	KDR	3791	Keshet y col. Nature Genetics 38(2), 2006, 149-153
NM_002344	LTK	4058	Keshet y col. Nature Genetics 38(2), 2006, 149-153
NM_002412	MGMT	4255	www.methdb.de/ y/o www.mdanderson.org/
NM_002457	MUC2	4583	www.methdb.de/ y/o www.mdanderson.org/
NM_002478	MYOD1	4654	www.methdb.de/ y/o www.mdanderson.org/
NM_002529	NTRK1	4914	Keshet y col. Nature Genetics 38(2), 2006, 149-153

ES 2 686 309 T3

(continuación)

Acceso	Símbolo	ID del gen	Referencia
NM_002588	PCDHGC3	5098; 26025; 56108; 56112; 9708; 56109	Keshet y col. Nature Genetics 38(2), 2006, 149-153
NM_002658	PLAU	5328; 414236	www.methdb.de/ y/o www.mdanderson.org/
NM_002700	POU4F3	5459	Keshet y col. Nature Genetics 38(2), 2006, 149-153
NM_002807	PSMD1	5707; 7410	Keshet y col. Nature Genetics 38(2), 2006, 149-153
NM_002848	PTPRO	5800	Keshet y col. Nature Genetics 38(2), 2006, 149-153
NM_002873	RAD17	5884	Keshet y col. Nature Genetics 38(2), 2006, 149-153
NM_002923	RGS2	5997	Keshet y col. Nature Genetics 38(2), 2006, 149-153
NM_003027	SH3GL3	6457	Keshet y col. Nature Genetics 38(2), 2006, 149-153
NM_003088	FSCN1	6624	Keshet y col. Nature Genetics 38(2), 2006, 149-153
NM_003097	SNRPN	6638; 8926; 145624; 8123; 63968; 3653	www.methdb.de/ y/o www.mdanderson.org/
NM_003149	STAC	6769	Keshet y col. Nature Genetics 38(2), 2006, 149-153
NM_003204	NFE2L1	4779	Keshet y col. Nature Genetics 38(2), 2006, 149-153
NM_003219	TERT	7015	www.methdb.de/ y/o www.mdanderson.org/
NM_003238	TGFB2	7042	Keshet y col. Nature Genetics 38(2), 2006, 149-153
NM_003238	TGFB2	7042	Keshet y col. Nature Genetics 38(2), 2006, 149-153
NM_003246	THBS1	7057	www.methdb.de/ y/o www.mdanderson.org/
NM_003274	TMEM1	7109	Keshet y col. Nature Genetics 38(2), 2006, 149-153
NM_003277	CLDN5	7122	Keshet y col. Nature Genetics 38(2), 2006, 149-153
NM_003295	TPT1	7178; 51447; 2982	Keshet y col. Nature Genetics 38(2), 2006, 149-153
NM_003300	TRAF3	7187	Keshet y col. Nature Genetics 38(2), 2006, 149-153
NM_003391	WNT2	7472	Keshet y col. Nature Genetics 38(2), 2006, 149-153

ES 2 686 309 T3

(continuación)

Acceso	Símbolo	ID del gen	Referencia
NM_003392	WNT5A	7474	Keshet y col. Nature Genetics 38(2), 2006, 149-153
NM_003408	ZFP37	7539; 7551	Keshet y col. Nature Genetics 38(2), 2006, 149-153
NM_003417	ZNF264	9422	Keshet y col. Nature Genetics 38(2), 2006, 149-153
NM_003426	ZNF74	7625	Keshet y col. Nature Genetics 38(2), 2006, 149-153
NM_003435	ZNF134	7693	Keshet y col. Nature Genetics 38(2), 2006, 149-153
NM_003451	ZNF177	7730	Keshet y col. Nature Genetics 38(2), 2006, 149-153
NM_003474	ADAM12	8038	Keshet y col. Nature Genetics 38(2), 2006, 149-153
NM_003508	FZD9	8326	Keshet y col. Nature Genetics 38(2), 2006, 149-153
NM_003539	HIST1H4D	8360	Keshet y col. Nature Genetics 38(2), 2006, 149-153
NM_003540	HIST1H4F	8361	Keshet y col. Nature Genetics 38(2), 2006, 149-153
NM_003541	HIST1H4K	8362	Keshet y col. Nature Genetics 38(2), 2006, 149-153
NM_003546	HIST1H4L	8368	Keshet y col. Nature Genetics 38(2), 2006, 149-153
NM_003666	BLZF1	8548	Keshet y col. Nature Genetics 38(2), 2006, 149-153
NM_003735	PCDHGC3	5098; 26025; 56108; 56112; 9708; 56109	Keshet y col. Nature Genetics 38(2), 2006, 149-153
NM_003736	PCDHGC3	5098; 26025; 56108; 56112; 9708; 56109	Keshet y col. Nature Genetics 38(2), 2006, 149-153
NM_003775	EDG6	8698	Keshet y col. Nature Genetics 38(2), 2006, 149-153
NM_003777	DNAH11	8701; 9026	Keshet y col. Nature Genetics 38(2), 2006, 149-153
NM_003806	HRK	8739	www.methdb.de/y/owwww.mdanderson.org/
NM_003823	TNFRSF6B	8771; 51750; 10139	Keshet y col. Nature Genetics 38(2), 2006, 149-153
NM_003888	ALDH1A2	8854	Keshet y col. Nature Genetics 38(2), 2006, 149-153
NM_003914	CCNA1	8900	www.methdb.de/y/owwww.mdanderson.org/

(continuación)

Acceso	Símbolo	ID del gen	Referencia
NM_003923	FOXH1	8928	Keshet y col. Nature Genetics 38(2), 2006, 149-153
NM_003984	SLC13A2	9058	www.methdb.de/ y/o www.mdanderson.org/
NM_003991	EDNRB	1910	Keshet y col. Nature Genetics 38(2), 2006, 149-153
NM_003999	OSMR	9180	Keshet y col. Nature Genetics 38(2), 2006, 149-153
NM_004004	GJB2	2706	www.methdb.de/ y/o www.mdanderson.org/
NM_004064	CDKN1B	1027	www.methdb.de/ y/o www.mdanderson.org/
NM_004068	AP2M1	1173	Keshet y col. Nature Genetics 38(2), 2006, 149-153
NM_004102	FABP3	2170	www.methdb.de/ y/o www.mdanderson.org/
NM_004113	FGF12	2257	Keshet y col. Nature Genetics 38(2), 2006, 149-153
NM_004122	GHSR	2693	Keshet y col. Nature Genetics 38(2), 2006, 149-153
NM_004135	IDH3G	3421	Keshet y col. Nature Genetics 38(2), 2006, 149-153
NM_004181	UCHL1	7345	Keshet y col. Nature Genetics 38(2), 2006, 149-153
NM_004230	EDG5	9294	Keshet y col. Nature Genetics 38(2), 2006, 149-153
NM_004248	PRLHR	2834	Keshet y col. Nature Genetics 38(2), 2006, 149-153
NM_004267	CHST2	9435	Keshet y col. Nature Genetics 38(2), 2006, 149-153
NM_004291	CART	9607	Keshet y col. Nature Genetics 38(2), 2006, 149-153
NM_004297	GNA14	9630	Keshet y col. Nature Genetics 38(2), 2006, 149-153
NM_004327	BCR	613; 26226	www.methdb.de/ y/o www.mdanderson.org/
NM_004360	CDH1	999	DNA Methylation And Cancer Therapy, Landes Bioscience 2005, ed. Moshe Szyf
NM_004360	CDH1	999	www.methdb.de/ y/o www.mdanderson.org/
NM_004360	CDH1	999	DNA Methylation And Cancer Therapy, Landes Bioscience 2005, ed. Moshe Szyf
NM_004378	CRABP1	1381	Keshet y col. Nature Genetics 38(2), 2006, 149-153

(continuación)

Acceso	Símbolo	ID del gen	Referencia
NM_004385	CSPG2	1462	www.methdb.de/ y/o www.mdanderson.org/
NM_004387	NKX2-5	1482	www.methdb.de/ y/o www.mdanderson.org/
NM_004394	DAP	1611	Keshet y col. Nature Genetics 38(2), 2006, 149-153
NM_004411	DYNC111	1780	Keshet y col. Nature Genetics 38(2), 2006, 149-153
NM_004441	EPHB1	2047	Keshet y col. Nature Genetics 38(2), 2006, 149-153
NM_004464	FGF5	2250	Keshet y col. Nature Genetics 38(2), 2006, 149-153
NM_004477	FRG1	2483	Keshet y col. Nature Genetics 38(2), 2006, 149-153
NM_004480	FUT8	2530	Keshet y col. Nature Genetics 38(2), 2006, 149-153
NM_004484	GPC3	2719	www.methdb.de/ y/o www.mdanderson.org/
NM_004525	LRP2	4036	www.methdb.de/ y/o www.mdanderson.org/
NM_004530	MMP2	4313	Keshet y col. Nature Genetics 38(2), 2006, 149-153
NM_004612	TGFBR1	7046	www.methdb.de/ y/o www.mdanderson.org/
NM_004621	TRPC6	7225	Keshet y col. Nature Genetics 38(2), 2006, 149-153
NM_004714	DYRK1 B	9149	Keshet y col. Nature Genetics 38(2), 2006, 149-153
NM_004737	LARGE	9215	Keshet y col. Nature Genetics 38(2), 2006, 149-153
NM_004787	SLIT2	9353	Keshet y col. Nature Genetics 38(2), 2006, 149-153
NM_004817	TJP2	9414	www.methdb.de/ y/o www.mdanderson.org/
NM_004865	TBPL1	9519	Keshet y col. Nature Genetics 38(2), 2006, 149-153
NM_004887	CXCL14	9547	Keshet y col. Nature Genetics 38(2), 2006, 149-153
NM_004929	CALB1	793	Keshet y col. Nature Genetics 38(2), 2006, 149-153
NM_004936	CDKN2B	1030	DNA Methylation And Cancer Therapy, Landes Bioscience 2005, ed. Moshe Szyf
NM_004936	CDKN2B	1030	www.methdb.de/ y/o www.mdanderson.org/

(continuación)

Acceso	Símbolo	ID del gen	Referencia
NM_004938	DAPK1	1612	DNA Methylation And Cancer Therapy, Landes Bioscience 2005, ed. Moshe Szyf
NM_004975	KCNB1	3745	Keshet y col. Nature Genetics 38(2), 2006, 149-153
NM_004976	KCNC1	3746	Keshet y col. Nature Genetics 38(2), 2006, 149-153
NM_004988	MAGEA1	4100	www.methdb.de/ y/o www.mdanderson.org/
NM_005032	PLS3	5358	www.methdb.de/ y/o www.mdanderson.org/
NM_005048	PTHR2	5746	Keshet y col. Nature Genetics 38(2), 2006, 149-153
NM_005073	SLC15A1	6564	Keshet y col. Nature Genetics 38(2), 2006, 149-153
NM_005100	AKAP12	9590	Keshet y col. Nature Genetics 38(2), 2006, 149-153
NM_005117	FGF19	9965	www.methdb.de/ y/o www.mdanderson.org/
NM_005117	FGF19	9965	Keshet y col. Nature Genetics 38(2), 2006, 149-153
NM_005157	ABL1	25	www.methdb.de/ y/o www.mdanderson.org/
NM_005159	ACTC	70	Keshet y col. Nature Genetics 38(2), 2006, 149-153
NM_005181	CA3	761	Keshet y col. Nature Genetics 38(2), 2006, 149-153
NM_005233	EPHA3	2042	www.methdb.de/ y/o www.mdanderson.org/
NM_005284	GPR6	2830	Keshet y col. Nature Genetics 38(2), 2006, 149-153
NM_005285	NPBWR1	2831	Keshet y col. Nature Genetics 38(2), 2006, 149-153
NM_005286	NPBWR2	2832	Keshet y col. Nature Genetics 38(2), 2006, 149-153
NM_005346	HSPA1B	3304	Keshet y col. Nature Genetics 38(2), 2006, 149-153
NM_005382	NEF3	4741	Keshet y col. Nature Genetics 38(2), 2006, 149-153
NM_005386	NNAT	4826	Keshet y col. Nature Genetics 38(2), 2006, 149-153
NM_005398	PPP1R3C	5507	Keshet y col. Nature Genetics 38(2), 2006, 149-153
NM_005427	TP73	7161	DNA Methylation And Cancer Therapy, Landes Bioscience 2005, ed. Moshe Szyf

(continuación)

Acceso	Símbolo	ID del gen	Referencia
NM_005437	NCOA4	8031	DNA Methylation And Cancer Therapy, Landes Bioscience 2005, ed. Moshe Szyf
NM_005523	HOXA11	3207	Keshet y col. Nature Genetics 38(2), 2006, 149-153
NM_005556	KRT7	3855	Keshet y col. Nature Genetics 38(2), 2006, 149-153
NM_005584	MAB21L1	4081	Keshet y col. Nature Genetics 38(2), 2006, 149-153
NM_005638	SYBL1	6845	www.methdb.de/ y/o www.mdanderson.org/
NM_005668	ST8SIA4	7903	Keshet y col. Nature Genetics 38(2), 2006, 149-153
NM_005806	OLIG2	10215	Keshet y col. Nature Genetics 38(2), 2006, 149-153
NM_005825	RASGRP2	10235	Keshet y col. Nature Genetics 38(2), 2006, 149-153
NM_005946	MT1A	4489	www.methdb.de/ y/o www.mdanderson.org/
NM_005959	MTNR1B	4544	Keshet y col. Nature Genetics 38(2), 2006, 149-153
NM_006000	TUBA1	7277; 84854	www.methdb.de/ y/o www.mdanderson.org/
NM_006019	TCIRG1	10312	Keshet y col. Nature Genetics 38(2), 2006, 149-153
NM_006041	HS3ST3B1	9953; 84815	Keshet y col. Nature Genetics 38(2), 2006, 149-153
NM_006043	HS3ST2	9956	Keshet y col. Nature Genetics 38(2), 2006, 149-153
NM_006053	TCIRG1	10312	Keshet y col. Nature Genetics 38(2), 2006, 149-153
NM_006142	SFN	2810	www.methdb.de/ y/o www.mdanderson.org/
NM_006158	NEFL	4747	Keshet y col. Nature Genetics 38(2), 2006, 149-153
NM_006158	NEFL	4747	www.methdb.de/ y/o www.mdanderson.org/
NM_006161	NEUROG1	4762	Keshet y col. Nature Genetics 38(2), 2006, 149-153
NM_006194	PAX9	5083	Keshet y col. Nature Genetics 38(2), 2006, 149-153
NM_006211	PENK	5179	Keshet y col. Nature Genetics 38(2), 2006, 149-153
NM_006306	SMC1L1	8243	Keshet y col. Nature Genetics 38(2), 2006, 149-153

(continuación)

Acceso	Símbolo	ID del gen	Referencia
NM_006307	SRPX	8406	Keshet y col. Nature Genetics 38(2), 2006, 149-153
NM_006463	STAMPB	10617	Keshet y col. Nature Genetics 38(2), 2006, 149-153
NM_006483	DYRK1 B	9149	Keshet y col. Nature Genetics 38(2), 2006, 149-153
NM_006484	DYRK1 B	9149	Keshet y col. Nature Genetics 38(2), 2006, 149-153
NM_006497	HIC1	3090	DNA Methylation And Cancer Therapy, Landes Bioscience 2005, ed. Moshe Szyf
NM_006497	HIC1	3090	www.methdb.de/ y/o www.mdanderson.org/
NM_006539	CACNG3	10368	Keshet y col. Nature Genetics 38(2), 2006, 149-153
NM_006587	CORIN	10699	Keshet y col. Nature Genetics 38(2), 2006, 149-153
NM_006614	CHL1	10752	Keshet y col. Nature Genetics 38(2), 2006, 149-153
NM_006735	HOXA2	3199	Keshet y col. Nature Genetics 38(2), 2006, 149-153
NM_006765	TUSC3	7991	www.methdb.de/ y/o www.mdanderson.org/
NM_006788	RALBP1	10928	Keshet y col. Nature Genetics 38(2), 2006, 149-153
NM_006874	ELF2	1998; 26472	Keshet y col. Nature Genetics 38(2), 2006, 149-153
NM_006898	HOXD3	3232	Keshet y col. Nature Genetics 38(2), 2006, 149-153
NM_006917	RXRG	6258	Keshet y col. Nature Genetics 38(2), 2006, 149-153
NM_007117	TRH	7200	Keshet y col. Nature Genetics 38(2), 2006, 149-153
NM_007181	MAP4K1	11184	Keshet y col. Nature Genetics 38(2), 2006, 149-153
NM_007182	RASSF1	11186	DNA Methylation And Cancer Therapy, Landes Bioscience 2005, ed. Moshe Szyf
NM_007182	RASSF1	11186	DNA Methylation And Cancer Therapy, Landes Bioscience 2005, ed. Moshe Szyf
NM_007182	RASSF1	11186	www.methdb.de/ y/o www.mdanderson.org/
NM_007197	FZD10	11211	Keshet y col. Nature Genetics 38(2), 2006, 149-153
NM_007294	BRCA1	672	DNA Methylation And Cancer Therapy, Landes Bioscience 2005, ed. Moshe Szyf

(continuación)

Acceso	Símbolo	ID del gen	Referencia
NM_007294	BRCA1	672	www.methdb.de/ y/o www.mdanderson.org/
NM_007332	TRPA1	8989	Keshet y col. Nature Genetics 38(2), 2006, 149-153
NM_007345	ZNF236	7776	Keshet y col. Nature Genetics 38(2), 2006, 149-153
NM_007361	NID2	22795	Keshet y col. Nature Genetics 38(2), 2006, 149-153
NM_012200	B3GAT3	26229	Keshet y col. Nature Genetics 38(2), 2006, 149-153
NM_012202	GNG3	2785	Keshet y col. Nature Genetics 38(2), 2006, 149-153
NM_012261	C20orf103	24141	Keshet y col. Nature Genetics 38(2), 2006, 149-153
NM_012295	CABIN1	23523	www.methdb.de/ y/o www.mdanderson.org/
NM_012295	CABIN1	23523	Keshet y col. Nature Genetics 38(2), 2006, 149-153
NM_012301	MAGI2	9863	Keshet y col. Nature Genetics 38(2), 2006, 149-153
NM_012309	SHANK2	22941	www.methdb.de/ y/o www.mdanderson.org/
NM_012309	SHANK2	22941	Keshet y col. Nature Genetics 38(2), 2006, 149-153
NM_012399	PITPNB	23760	Keshet y col. Nature Genetics 38(2), 2006, 149-153
NM_012444	SPO11	23626	Keshet y col. Nature Genetics 38(2), 2006, 149-153
NM_012458	TIMM13	26517	Keshet y col. Nature Genetics 38(2), 2006, 149-153
NM_013250	ZNF215	7762	Keshet y col. Nature Genetics 38(2), 2006, 149-153
NM_013291	CPSF1	29894	Keshet y col. Nature Genetics 38(2), 2006, 149-153
NM_013381	TRHDE	29953	Keshet y col. Nature Genetics 38(2), 2006, 149-153
NM_013435	RAX	30062	Keshet y col. Nature Genetics 38(2), 2006, 149-153
NM_013942	PAX3	5077	Keshet y col. Nature Genetics 38(2), 2006, 149-153
NM_014020	LR8	28959	Keshet y col. Nature Genetics 38(2), 2006, 149-153
NM_014080	DUOX2	50506	Keshet y col. Nature Genetics 38(2), 2006, 149-153

(continuación)

Acceso	Símbolo	ID del gen	Referencia
NM_014155	BTBD15	29068	Keshet y col. Nature Genetics 38(2), 2006, 149-153
NM_014228	SLC6A7	6534	Keshet y col. Nature Genetics 38(2), 2006, 149-153
NM_014234	HSD17B8	7923	Keshet y col. Nature Genetics 38(2), 2006, 149-153
NM_014325	CORO1C	23603	Keshet y col. Nature Genetics 38(2), 2006, 149-153
NM_014379	KCNV1	27012	Keshet y col. Nature Genetics 38(2), 2006, 149-153
NM_014386	PKD2L2	27039	Keshet y col. Nature Genetics 38(2), 2006, 149-153
NM_014459	PCDH17	27253; 144997	Keshet y col. Nature Genetics 38(2), 2006, 149-153
NM_014468	VENTX	27287	Keshet y col. Nature Genetics 38(2), 2006, 149-153
NM_014522	PCDH11X	27328; 83259	Keshet y col. Nature Genetics 38(2), 2006, 149-153
NM_014574	STRN3	29966	Keshet y col. Nature Genetics 38(2), 2006, 149-153
NM_014587	SOX8	30812	Keshet y col. Nature Genetics 38(2), 2006, 149-153
NM_014588	VSX1	30813	Keshet y col. Nature Genetics 38(2), 2006, 149-153
NM_014618	DBC1	1620	Keshet y col. Nature Genetics 38(2), 2006, 149-153
NM_014618	DBC1	1620	DNA Methylation And Cancer Therapy, Landes Bioscience 2005, ed. Moshe Szyf
NM_014631	SH3PXD2A	9644	Keshet y col. Nature Genetics 38(2), 2006, 149-153
NM_014653	KIAA0789	9671	Keshet y col. Nature Genetics 38(2), 2006, 149-153
NM_014676	PUM1	9698; 28997	Keshet y col. Nature Genetics 38(2), 2006, 149-153
NM_014710	GPRASP1	9737	Keshet y col. Nature Genetics 38(2), 2006, 149-153
NM_014724	ZNF96	9753	Keshet y col. Nature Genetics 38(2), 2006, 149-153
NM_014786	ARHGEF17	9828	Keshet y col. Nature Genetics 38(2), 2006, 149-153
NM_014817	KIAA0644	9865	Keshet y col. Nature Genetics 38(2), 2006, 149-153
NM_014979	SV2C	22987	www.methdb.de/ y/o www.mdanderson.org/

ES 2 686 309 T3

(continuación)

Acceso	Símbolo	ID del gen	Referencia
NM_015002	FBXO21	23014	Keshet y col. Nature Genetics 38(2), 2006, 149-153
NM_015094	HIC2	23119	www.methdb.de/ y/o www.mdanderson.org/
NM_015101	GLT25D2	23127	Keshet y col. Nature Genetics 38(2), 2006, 149-153
NM_015163	TRIM9	114088	Keshet y col. Nature Genetics 38(2), 2006, 149-153
NM_015472	WWTR1	25937	Keshet y col. Nature Genetics 38(2), 2006, 149-153
NM_015507	EGFL6	25975	Keshet y col. Nature Genetics 38(2), 2006, 149-153
NM_015610	WIPI2	26100	Keshet y col. Nature Genetics 38(2), 2006, 149-153
NM_015641	TES	26136	www.methdb.de/ y/o www.mdanderson.org/
NM_015683	ARRDC2	27106	Keshet y col. Nature Genetics 38(2), 2006, 149-153
NM_015722	DRD1IP	50632	Keshet y col. Nature Genetics 38(2), 2006, 149-153
NM_015920	RPS27L	51065	Keshet y col. Nature Genetics 38(2), 2006, 149-153
NM_016003	WIPI2	26100	Keshet y col. Nature Genetics 38(2), 2006, 149-153
NM_016135	ETV7	51513	Keshet y col. Nature Genetics 38(2), 2006, 149-153
NM_016157	TRO	7216	Keshet y col. Nature Genetics 38(2), 2006, 149-153
NM_016162	ING4	51147	Keshet y col. Nature Genetics 38(2), 2006, 149-153
NM_016179	TRPC4	7223	Keshet y col. Nature Genetics 38(2), 2006, 149-153
NM_016192	TMEFF2	23671	Keshet y col. Nature Genetics 38(2), 2006, 149-153
NM_016192	TMEFF2	23671	www.methdb.de/ y/o www.mdanderson.org/
NM_016223	PACSIN3	29763	Keshet y col. Nature Genetics 38(2), 2006, 149-153
NM_016229	CYB5R2	51700	Keshet y col. Nature Genetics 38(2), 2006, 149-153
NM_016301	ATPBD1C	51184	Keshet y col. Nature Genetics 38(2), 2006, 149-153
NM_016442	ARTS-1	51752	Keshet y col. Nature Genetics 38(2), 2006, 149-153

(continuación)

Acceso	Símbolo	ID del gen	Referencia
NM_016521	TFDP3	51270	Keshet y col. Nature Genetics 38(2), 2006, 149-153
NM_016535	ZNF581	51545	Keshet y col. Nature Genetics 38(2), 2006, 149-153
NM_016538	SIRT7	51547	Keshet y col. Nature Genetics 38(2), 2006, 149-153
NM_016540	GPR83	10888	Keshet y col. Nature Genetics 38(2), 2006, 149-153
NM_016552	ANKMY1	51281	Keshet y col. Nature Genetics 38(2), 2006, 149-153
NM_016568	RLN3R1	51289	Keshet y col. Nature Genetics 38(2), 2006, 149-153
NM_016605	FAM53C	51307; 995	Keshet y col. Nature Genetics 38(2), 2006, 149-153
NM_016931	NOX4	50507	Keshet y col. Nature Genetics 38(2), 2006, 149-153
NM_016950	SPOCK3	50859	Keshet y col. Nature Genetics 38(2), 2006, 149-153
NM_016954	TBX22	50945	Keshet y col. Nature Genetics 38(2), 2006, 149-153
NM_017514	PLXNA3	55558	Keshet y col. Nature Genetics 38(2), 2006, 149-153
NM_017649	CNNM2	54805	Keshet y col. Nature Genetics 38(2), 2006, 149-153
NM_017729	EPS8L1	54869	Keshet y col. Nature Genetics 38(2), 2006, 149-153
NM_017798	YTHDF1	54915	Keshet y col. Nature Genetics 38(2), 2006, 149-153
NM_017844	ANKMY1	51281	Keshet y col. Nature Genetics 38(2), 2006, 149-153
NM_017847	C1orf27	54953	Keshet y col. Nature Genetics 38(2), 2006, 149-153
NM_018061	PRPF38B	55119	Keshet y col. Nature Genetics 38(2), 2006, 149-153
NM_018074	FLJ10374	55702	Keshet y col. Nature Genetics 38(2), 2006, 149-153
NM_018129	PNPO	55163	Keshet y col. Nature Genetics 38(2), 2006, 149-153
NM_018135	MRPS18A	55168	Keshet y col. Nature Genetics 38(2), 2006, 149-153
NM_018197	ZFP64	55734	Keshet y col. Nature Genetics 38(2), 2006, 149-153
NM_018310	BRF2	55290	Keshet y col. Nature Genetics 38(2), 2006, 149-153

ES 2 686 309 T3

(continuación)

Acceso	Símbolo	ID del gen	Referencia
NM_018354	C20orf46	55321	Keshet y col. Nature Genetics 38(2), 2006, 149-153
NM_018401	STK32B	55351	Keshet y col. Nature Genetics 38(2), 2006, 149-153
NM_018431	DOK5	55816	Keshet y col. Nature Genetics 38(2), 2006, 149-153
NM_018898	PCDHA6	56142; 56145; 56134; 56147; 56146; 56139	Keshet y col. Nature Genetics 38(2), 2006, 149-153
NM_018899	PCDHA6	56142; 56145; 56134; 56147; 56146; 56139	Keshet y col. Nature Genetics 38(2), 2006, 149-153
NM_018901	PCDHA6	56142; 56145; 56134; 56147; 56146; 56139	Keshet y col. Nature Genetics 38(2), 2006, 149-153
NM_018906	PCDHA6	56142; 56145; 56134; 56147; 56146; 56139	Keshet y col. Nature Genetics 38(2), 2006, 149-153
NM_018911	PCDHA6	56142; 56145; 56134; 56147; 56146; 56139	Keshet y col. Nature Genetics 38(2), 2006, 149-153
NM_018920	PCDHGC3	5098; 26025; 56108; 56112; 9708; 56109	Keshet y col. Nature Genetics 38(2), 2006, 149-153
NM_018925	PCDHGC3	5098; 26025; 56108; 56112 ; 9708; 56109	Keshet y col. Nature Genetics 38(2), 2006, 149-153
NM_018926	PCDHGC3	5098; 26025; 56108; 56112 ; 9708; 56109	Keshet y col. Nature Genetics 38(2), 2006, 149-153
NM_018927	PCDHGC3	5098; 26025; 56108; 56112 ; 9708; 56109	Keshet y col. Nature Genetics 38(2), 2006, 149-153
NM_018928	PCDHGC3	5098; 26025; 56108; 56112 ; 9708; 56109	Keshet y col. Nature Genetics 38(2), 2006, 149-153
NM_018950	HLA-F	3134	Keshet y col. Nature Genetics 38(2), 2006, 149-153
NM_018976	SLC38A2	54407	Keshet y col. Nature Genetics 38(2), 2006, 149-153
NM_018997	MRPS21	54460	Keshet y col. Nature Genetics 38(2), 2006, 149-153
NM_019043	APBB11P	54518	Keshet y col. Nature Genetics 38(2), 2006, 149-153
NM_019102	HOXA5	3202	www.methdb.de/ y/o www.mdanderson.org/

(continuación)

Acceso	Símbolo	ID del gen	Referencia
NM_020166	MCCC1	56922	Keshet y col. Nature Genetics 38(2), 2006, 149-153
NM_020201	NT5M	56953	Keshet y col. Nature Genetics 38(2), 2006, 149-153
NM_020208	SLC6A20	54716	Keshet y col. Nature Genetics 38(2), 2006, 149-153
NM_020226	PRDM8	56978	Keshet y col. Nature Genetics 38(2), 2006, 149-153
NM_020230	PPAN	56342	Keshet y col. Nature Genetics 38(2), 2006, 149-153
NM_020348	CNNM1	26507	Keshet y col. Nature Genetics 38(2), 2006, 149-153
NM_020469	ABO	28	www.methdb.de/ y/o www.mdanderson.org/
NM_020549	CHAT	1103	Keshet y col. Nature Genetics 38(2), 2006, 149-153
NM_020630	RET	5979	www.methdb.de/ y/o www.mdanderson.org/
NM_020650	RCN3	57333	Keshet y col. Nature Genetics 38(2), 2006, 149-153
NM_020657	ZNF304	57343	Keshet y col. Nature Genetics 38(2), 2006, 149-153
NM_020660	CX36	57369	Keshet y col. Nature Genetics 38(2), 2006, 149-153
NM_020685	C3orf14	57415	Keshet y col. Nature Genetics 38(2), 2006, 149-153
NM_020815	PCDH10	57575	Keshet y col. Nature Genetics 38(2), 2006, 149-153
NM_020873	LRRN1	57633	www.methdb.de/ y/o www.mdanderson.org/
NM_020984	CHAT	1103	Keshet y col. Nature Genetics 38(2), 2006, 149-153
NM_020985	CHAT	1103	Keshet y col. Nature Genetics 38(2), 2006, 149-153
NM_020986	CHAT	1103	Keshet y col. Nature Genetics 38(2), 2006, 149-153
NM_020999	NEUROG3	50674	Keshet y col. Nature Genetics 38(2), 2006, 149-153
NM_021032	FGF12	2257	Keshet y col. Nature Genetics 38(2), 2006, 149-153
NM_021101	CLDN1	9076	Keshet y col. Nature Genetics 38(2), 2006, 149-153
NM_021179	C1orf114	57821	Keshet y col. Nature Genetics 38(2), 2006, 149-153

(continuación)

Acceso	Símbolo	ID del gen	Referencia
NM_021193	HOXD12	3238	Keshet y col. Nature Genetics 38(2), 2006, 149-153
NM_021216	ZNF71	58491	Keshet y col. Nature Genetics 38(2), 2006, 149-153
NM_021257	NGB	58157	Keshet y col. Nature Genetics 38(2), 2006, 149-153
NM_021614	KCNN2	3781	Keshet y col. Nature Genetics 38(2), 2006, 149-153
NM_021911	GABRB2	2561	Keshet y col. Nature Genetics 38(2), 2006, 149-153
NM_021926	ALX4	60529	Keshet y col. Nature Genetics 38(2), 2006, 149-153
NM_021956	GRIK2	2898	Keshet y col. Nature Genetics 38(2), 2006, 149-153
NM_022076	DUSP21	63904	Keshet y col. Nature Genetics 38(2), 2006, 149-153
NM_022088	ZFP64	55734	Keshet y col. Nature Genetics 38(2), 2006, 149-153
NM_022169	ABCG4	64137	Keshet y col. Nature Genetics 38(2), 2006, 149-153
NM_022405	SLC6A20	54716	Keshet y col. Nature Genetics 38(2), 2006, 149-153
NM_022443	MLF1	4291	Keshet y col. Nature Genetics 38(2), 2006, 149-153
NM_022468	MMP25	64386; 4328	Keshet y col. Nature Genetics 38(2), 2006, 149-153
NM_022469	GREM2	64388	Keshet y col. Nature Genetics 38(2), 2006, 149-153
NM_022718	MMP25	64386; 4328	Keshet y col. Nature Genetics 38(2), 2006, 149-153
NM_022750	PARP12	64761	Keshet y col. Nature Genetics 38(2), 2006, 149-153
NM_023926	ZNF447	65982	Keshet y col. Nature Genetics 38(2), 2006, 149-153
NM_024012	HTR5A	3361	Keshet y col. Nature Genetics 38(2), 2006, 149-153
NM_024046	CAMKV	79012	Keshet y col. Nature Genetics 38(2), 2006, 149-153
NM_024101	MLPH	79083	Keshet et al. Nature Genetics 38(2), 2006, 149-153
NM_024306	FA2H	79152	Keshet y col. Nature Genetics 38(2), 2006, 149-153
NM_024409	NPPC	4880	Keshet y col. Nature Genetics 38(2), 2006, 149-153

(continuación)

Acceso	Símbolo	ID del gen	Referencia
NM_024504	PRDM14	63978	Keshet y col. Nature Genetics 38(2), 2006, 149-153
NM_024593	EFCAB1	79645	Keshet y col. Nature Genetics 38(2), 2006, 149-153
NM_024600	C16orf30	79652	Keshet y col. Nature Genetics 38(2), 2006, 149-153
NM_024826	ASAP	79884	Keshet y col. Nature Genetics 38(2), 2006, 149-153
NM_024882	C6orf155	79940	Keshet y col. Nature Genetics 38(2), 2006, 149-153
NM_024893	C20orf39	79953	Keshet y col. Nature Genetics 38(2), 2006, 149-153
NM_024944	CHODL	140578	Keshet y col. Nature Genetics 38(2), 2006, 149-153
NM_025019	TUBA4	80086	Keshet y col. Nature Genetics 38(2), 2006, 149-153
NM_025058	TRIM46	80128	Keshet y col. Nature Genetics 38(2), 2006, 149-153
NM_025061	LRRC8E	80131	Keshet y col. Nature Genetics 38(2), 2006, 149-153
NM_025087	FLJ21511	80157	Keshet y col. Nature Genetics 38(2), 2006, 149-153
NM_025197	CDK5RAP3	80279	Keshet y col. Nature Genetics 38(2), 2006, 149-153
NM_025204	RP3-402G11.12	80305	Keshet y col. Nature Genetics 38(2), 2006, 149-153
NM_025208	PDGFD	80310; 414301	Keshet y col. Nature Genetics 38(2), 2006, 149-153
NM_025218	ULBP1	80329	Keshet y col. Nature Genetics 38(2), 2006, 149-153
NM_025263	PRR3	80742	Keshet y col. Nature Genetics 38(2), 2006, 149-153
NM_030577	MGC10993	80775	Keshet y col. Nature Genetics 38(2), 2006, 149-153
NM_030667	PTPRO	5800	Keshet y col. Nature Genetics 38(2), 2006, 149-153
NM_030668	PTPRO	5800	Keshet y col. Nature Genetics 38(2), 2006, 149-153
NM_030669	PTPRO	5800	Keshet y col. Nature Genetics 38(2), 2006, 149-153
NM_030670	PTPRO	5800	Keshet y col. Nature Genetics 38(2), 2006, 149-153
NM_030671	PTPRO	5800	Keshet y col. Nature Genetics 38(2), 2006, 149-153

ES 2 686 309 T3

(continuación)

Acceso	Símbolo	ID del gen	Referencia
NM_030760	EDG8	53637	Keshet y col. Nature Genetics 38(2), 2006, 149-153
NM_030806	C1orf21	81563; 116492	Keshet y col. Nature Genetics 38(2), 2006, 149-153
NM_030920	ANP32E	81611	Keshet y col. Nature Genetics 38(2), 2006, 149-153
NM_031277	RNF17	56163	Keshet y col. Nature Genetics 38(2), 2006, 149-153
NM_031283	TCF7L1	83439	Keshet y col. Nature Genetics 38(2), 2006, 149-153
NM_031424	C20orf55	83541	Keshet y col. Nature Genetics 38(2), 2006, 149-153
NM_031466	NIBP	83696	Keshet y col. Nature Genetics 38(2), 2006, 149-153
NM_031488	L3MBTL2	83746	Keshet y col. Nature Genetics 38(2), 2006, 149-153
NM_031497	PCDHA6	56142; 56145; 56134; 56147; 56146; 56139	Keshet y col. Nature Genetics 38(2), 2006, 149-153
NM_031856	PCDHA6	56142; 56145; 56134; 56147; 56146; 56139	Keshet y col. Nature Genetics 38(2), 2006, 149-153
NM_031859	PCDHA6	56142; 56145; 56134; 56147; 56146; 56139	Keshet y col. Nature Genetics 38(2), 2006, 149-153
NM_031860	PCDHA6	56142; 56145; 56134; 56147; 56146; 56139	Keshet y col. Nature Genetics 38(2), 2006, 149-153
NM_031882	PCDHA6	56142; 56145; 56134; 56147; 56146; 56139	Keshet y col. Nature Genetics 38(2), 2006, 149-153
NM_031883	PCDHA6	56142; 56145; 56134; 56147; 56146; 56139	Keshet y col. Nature Genetics 38(2), 2006, 149-153
NM_031901	MRPS21	54460	Keshet y col. Nature Genetics 38(2), 2006, 149-153
NM_031912	SYT15	83849	www.methdb.de/ y/o www.mdanderson.org/
NM_031922	REPS1	85021	Keshet y col. Nature Genetics 38(2), 2006, 149-153
NM_031934	RAB34	83871	Keshet y col. Nature Genetics 38(2), 2006, 149-153
NM_031994	RNF17	56163	Keshet y col. Nature Genetics 38(2), 2006, 149-153

ES 2 686 309 T3

(continuación)

Acceso	Símbolo	ID del gen	Referencia
NM_032034	SLC4A11	83959	Keshet y col. Nature Genetics 38(2), 2006, 149-153
NM_032087	PCDHGC3	5098; 26025; 56108; 56112; 9708; 56109	Keshet y col. Nature Genetics 38(2), 2006, 149-153
NM_032094	PCDHGC3	5098; 26025; 56108; 56112 9708; 56109	Keshet y col. Nature Genetics 38(2), 2006, 149-153
NM_032098	PCDHGC3	5098; 26025; 56108; 56112 9708; 56109	Keshet y col. Nature Genetics 38(2), 2006, 149-153
NM_032099	PCDHGC3	5098; 26025; 56108; 56112 9708; 56109	Keshet y col. Nature Genetics 38(2), 2006, 149-153
NM_032100	PCDHGC3	5098; 26025; 56108; 56112 9708; 56109	Keshet y col. Nature Genetics 38(2), 2006, 149-153
NM_032101	PCDHGC3	5098; 26025; 56108; 56112 9708; 56109	Keshet y col. Nature Genetics 38(2), 2006, 149-153
NM_032109	OTP	23440	www.methdb.de/ y/o www.mdanderson.org/
NM_032134	QRICH2	84074	Keshet y col. Nature Genetics 38(2), 2006, 149-153
NM_032140	C16orf48	84080	Keshet y col. Nature Genetics 38(2), 2006, 149-153
NM_032192	PPP1R1B	84152	Keshet y col. Nature Genetics 38(2), 2006, 149-153
NM_032256	TMEM117	84216	Keshet y col. Nature Genetics 38(2), 2006, 149-153
NM_032303	HSDL2	84263	Keshet y col. Nature Genetics 38(2), 2006, 149-153
NM_032391	PRAC	84366	Keshet y col. Nature Genetics 38(2), 2006, 149-153
NM_032402	PCDHGC3	5098; 26025; 56108; 56112 9708; 56109	Keshet y col. Nature Genetics 38(2), 2006, 149-153
NM_032403	PCDHGC3	5098; 26025; 56108; 56112 9708; 56109	Keshet y col. Nature Genetics 38(2), 2006, 149-153
NM_032406	PCDHGC3	5098; 26025; 56108; 56112 9708; 56109	Keshet y col. Nature Genetics 38(2), 2006, 149-153
NM_032411	ECRG4	84417	Keshet y col. Nature Genetics 38(2), 2006, 149-153

ES 2 686 309 T3

(continuación)

Acceso	Símbolo	ID del gen	Referencia
NM_032412	ORF1-FL49	84418	Keshet y col. Nature Genetics 38(2), 2006, 149-153
NM_032603	LOXL3	84695	Keshet y col. Nature Genetics 38(2), 2006, 149-153
NM_032625	C7orf13	129790	Keshet y col. Nature Genetics 38(2), 2006, 149-153
NM_032803	SLC7A3	84889	Keshet y col. Nature Genetics 38(2), 2006, 149-153
NM_032825	ZNF382	84911	Keshet y col. Nature Genetics 38(2), 2006, 149-153
NM_032838	ZNF566	84924	Keshet y col. Nature Genetics 38(2), 2006, 149-153
NM_032883	C20orf100	84969	Keshet y col. Nature Genetics 38(2), 2006, 149-153
NM_032918	RERG	85004	Keshet y col. Nature Genetics 38(2), 2006, 149-153
NM_032945	TNFRSF6B	8771; 51750; 10139	Keshet y col. Nature Genetics 38(2), 2006, 149-153
NM_032961	PCDH10	57575	Keshet y col. Nature Genetics 38(2), 2006, 149-153
NM_032967	PCDH11X	27328; 83259	Keshet y col. Nature Genetics 38(2), 2006, 149-153
NM_032968	PCDH11X	27328; 83259	Keshet y col. Nature Genetics 38(2), 2006, 149-153
NM_032969	PCDH11X	27328; 83259	Keshet y col. Nature Genetics 38(2), 2006, 149-153
NM_033126	PSKH2	85481	Keshet y col. Nature Genetics 38(2), 2006, 149-153
NM_033135	PDGFD	80310; 414301	Keshet y col. Nature Genetics 38(2), 2006, 149-153
NM_033143	FGF5	2250	Keshet y col. Nature Genetics 38(2), 2006, 149-153
NM_033224	PURB	5814	Keshet y col. Nature Genetics 38(2), 2006, 149-153
NM_033302	ADRA1A	148	Keshet y col. Nature Genetics 38(2), 2006, 149-153
NM_033303	ADRA1A	148	Keshet y col. Nature Genetics 38(2), 2006, 149-153
NM_033304	ADRA1A	148	Keshet y col. Nature Genetics 38(2), 2006, 149-153
NM_033445	HIST3H2A	92815	Keshet y col. Nature Genetics 38(2), 2006, 149-153
NM_033624	FBXO21	23014	Keshet y col. Nature Genetics 38(2), 2006, 149-153

(continuación)

Acceso	Símbolo	ID del gen	Referencia
NM_052902	STK11IP	114790	www.methdb.de/ y/o www.mdanderson.org/
NM_052954	CYYR1	116159	Keshet y col. Nature Genetics 38(2), 2006, 149-153
NM_052961	SLC26A8	116369	Keshet y col. Nature Genetics 38(2), 2006, 149-153
NM_052978	TRIM9	114088	Keshet y col. Nature Genetics 38(2), 2006, 149-153
NM_054021	GPR101	83550	Keshet y col. Nature Genetics 38(2), 2006, 149-153
NM_054108	HRASLS5	117245	Keshet y col. Nature Genetics 38(2), 2006, 149-153
NM_058165	MOGAT1	116255	Keshet y col. Nature Genetics 38(2), 2006, 149-153
NM_078485	COL9A1	1297	Keshet y col. Nature Genetics 38(2), 2006, 149-153
NM_080552	SLC32A1	140679	Keshet y col. Nature Genetics 38(2), 2006, 149-153
NM_080617	CBLN4	140689	Keshet y col. Nature Genetics 38(2), 2006, 149-153
NM_080671	KCNE4	23704	Keshet y col. Nature Genetics 38(2), 2006, 149-153
NM_080742	B3GAT2	135152	Keshet y col. Nature Genetics 38(2), 2006, 149-153
NM_130773	CNTNAP5	129684	Keshet y col. Nature Genetics 38(2), 2006, 149-153
NM_130900	RAET1L	154064	Keshet y col. Nature Genetics 38(2), 2006, 149-153
NM_133180	EPS8L1	54869	Keshet y col. Nature Genetics 38(2), 2006, 149-153
NM_133266	SHANK2	22941	Keshet y col. Nature Genetics 38(2), 2006, 149-153
NM_133338	RAD17	5884	Keshet y col. Nature Genetics 38(2), 2006, 149-153
NM_133339	RAD17	5884	Keshet y col. Nature Genetics 38(2), 2006, 149-153
NM_133340	RAD17	5884	Keshet y col. Nature Genetics 38(2), 2006, 149-153
NM_133341	RAD17	5884	Keshet y col. Nature Genetics 38(2), 2006, 149-153
NM_133342	RAD17	5884	Keshet y col. Nature Genetics 38(2), 2006, 149-153
NM_133343	RAD17	5884	Keshet y col. Nature Genetics 38(2), 2006, 149-153

ES 2 686 309 T3

(continuación)

Acceso	Símbolo	ID del gen	Referencia
NM_133344	RAD17	5884	Keshet y col. Nature Genetics 38(2), 2006, 149-153
NM_133489	SLC26A10	65012	Keshet y col. Nature Genetics 38(2), 2006, 149-153
NM_133493	CD109	135228	Keshet y col. Nature Genetics 38(2), 2006, 149-153
NM_133642	LARGE	9215	Keshet y col. Nature Genetics 38(2), 2006, 149-153
NM_138290	RPIB9	154661	Keshet y col. Nature Genetics 38(2), 2006, 149-153
NM_138718	SLC26A8	116369	Keshet y col. Nature Genetics 38(2), 2006, 149-153
NM_138996	CNTNAP5	129684	Keshet y col. Nature Genetics 38(2), 2006, 149-153
NM_139204	EPS8L1	54869	Keshet y col. Nature Genetics 38(2), 2006, 149-153
NM_139316	AMPH	273	Keshet y col. Nature Genetics 38(2), 2006, 149-153
NM_144497	AKAP12	9590	Keshet y col. Nature Genetics 38(2), 2006, 149-153
NM_144725	FLJ25439	153657	Weber y col. Nature Genetics 37(8), 2005, 853-862
NM_145725	TRAF3	7187	Keshet y col. Nature Genetics 38(2), 2006, 149-153
NM_145726	TRAF3	7187	Keshet y col. Nature Genetics 38(2), 2006, 149-153
NM_152562	CDCA2	157313	Weber y col. Nature Genetics 37(8), 2005, 853-862
NM_152854	CD40	958	Keshet y col. Nature Genetics 38(2), 2006, 149-153
NM_153819	RASGRP2	10235	Keshet y col. Nature Genetics 38(2), 2006, 149-153
NM_170696	ALDH1A2	8854	Keshet y col. Nature Genetics 38(2), 2006, 149-153
NM_170697	ALDH1A2	8854	Keshet y col. Nature Genetics 38(2), 2006, 149-153
NM_170775	KCNN2	3781	Keshet y col. Nature Genetics 38(2), 2006, 149-153
NM_171827	CD8A	925	Keshet y col. Nature Genetics 38(2), 2006, 149-153
NM_172337	OTX2	5015	www.methdb.de/ y/o www.mdanderson.org/
NM_173479	LOC126248	126248	www.methdb.de/ y/o www.mdanderson.org/

(continuación)

Acceso	Símbolo	ID del gen	Referencia
NM_174869	IDH3G	3421	Keshet y col. Nature Genetics 38(2), 2006, 149-153
NM_175052	ST8SIA4	7903	Keshet y col. Nature Genetics 38(2), 2006, 149-153
NM_175611	GRIK1	2897	Keshet y col. Nature Genetics 38(2), 2006, 149-153
NM_175709	CBX7	23492	www.methdb.de/ y/o www.mdanderson.org/
NM_175768	GRIK2	2898	Keshet y col. Nature Genetics 38(2), 2006, 149-153
NM_176095	CDK5RAP3	80279	Keshet y col. Nature Genetics 38(2), 2006, 149-153
NM_176096	CDK5RAP3	80279	Keshet y col. Nature Genetics 38(2), 2006, 149-153
NM_177555	TRO	7216	Keshet y col. Nature Genetics 38(2), 2006, 149-153
NM_177556	TRO	7216	Keshet y col. Nature Genetics 38(2), 2006, 149-153
NM_177557	TRO	7216	Keshet y col. Nature Genetics 38(2), 2006, 149-153
NM_177558	TRO	7216	Keshet y col. Nature Genetics 38(2), 2006, 149-153
NM_177959	DOK5	55816	Keshet y col. Nature Genetics 38(2), 2006, 149-153
NM_178154	FUT8	2530	Keshet y col. Nature Genetics 38(2), 2006, 149-153
NM_178155	FUT8	2530	Keshet y col. Nature Genetics 38(2), 2006, 149-153
NM_178156	FUT8	2530	Keshet y col. Nature Genetics 38(2), 2006, 149-153
NM_178157	FUT8	2530	Keshet y col. Nature Genetics 38(2), 2006, 149-153
NM_181457	PAX3	5077	Keshet y col. Nature Genetics 38(2), 2006, 149-153
NM_181458	PAX3	5077	Keshet y col. Nature Genetics 38(2), 2006, 149-153
NM_181459	PAX3	5077	Keshet y col. Nature Genetics 38(2), 2006, 149-153
NM_181460	PAX3	5077	Keshet y col. Nature Genetics 38(2), 2006, 149-153
NM_181461	PAX3	5077	Keshet y col. Nature Genetics 38(2), 2006, 149-153
NM_181466	ITGB4BP	3692	Keshet y col. Nature Genetics 38(2), 2006, 149-153

ES 2 686 309 T3

(continuación)

Acceso	Símbolo	ID del gen	Referencia
NM_ 181467	ITGB4BP	3692	Keshet y col. Nature Genetics 38(2), 2006, 149-153
NM_ 181468	ITGB4BP	3692	Keshet y col. Nature Genetics 38(2), 2006, 149-153
NM_ 181469	ITGB4BP	3692	Keshet y col. Nature Genetics 38(2), 2006, 149-153
NM_ 181505	PPP1R1B	84152	Keshet y col. Nature Genetics 38(2), 2006, 149-153
NM_ 181657	LTB4R	1241	www.methdb.de/ y/o www.mdanderson.org/
NM_ 181689	NNAT	4826	Keshet y col. Nature Genetics 38(2), 2006, 149-153
NM_ 182609	ZNF677	342926	Weber y col. Nature Genetics 37(8), 2005, 853-862
NM_ 198265	SPO11	23626	Keshet y col. Nature Genetics 38(2), 2006, 149-153
NM_ 198287	ING4	51147	Keshet y col. Nature Genetics 38(2), 2006, 149-153
NM_ 198407	GHSR	2693	Keshet y col. Nature Genetics 38(2), 2006, 149-153
NM_ 198570	UNQ739	375567	www.methdb.de/ y/o www.mdanderson.org/
NM_ 198849	LOC283514	283514	Weber y col. Nature Genetics 37(8), 2005, 853-862
NM_ 199051	FAM5C	339479	www.methdb.de/ y/o www.mdanderson.org/
NM_ 199076	CNNM2	54805	Keshet y col. Nature Genetics 38(2), 2006, 149-153
NM_ 199077	CNNM2	54805	Keshet y col. Nature Genetics 38(2), 2006, 149-153
NM_ 199231	GDNF	2668	Keshet y col. Nature Genetics 38(2), 2006, 149-153
NM_ 199234	GDNF	2668	Keshet y col. Nature Genetics 38(2), 2006, 149-153
NM_ 199425	VSX1	30813	Keshet y col. Nature Genetics 38(2), 2006, 149-153
NM_ 199426	ZFP64	55734	Keshet y col. Nature Genetics 38(2), 2006, 149-153
NM_ 199427	ZFP64	55734	www.methdb.de/ y/o www.mdanderson.org/
NM_ 199427	ZFP64	55734	Keshet y col. Nature Genetics 38(2), 2006, 149-153
NM_ 201647	STAMPB	10617	Keshet y col. Nature Genetics 38(2), 2006, 149-153

(continuación)

Acceso	Símbolo	ID del gen	Referencia
NM_201999	ELF2	1998; 26472	Keshet y col. Nature Genetics 38(2), 2006, 149-153
NM_206827	RASL11A	387496	Weber y col. Nature Genetics 37(8), 2005, 853-862
NM_206866	BACH1	571	Keshet y col. Nature Genetics 38(2), 2006, 149-153
NM_206961	LTK	4058	Keshet y col. Nature Genetics 38(2), 2006, 149-153
NM_207121	C20orf55	83541	Keshet y col. Nature Genetics 38(2), 2006, 149-153
NM_213622	STAMPB	10617	Keshet y col. Nature Genetics 38(2), 2006, 149-153
NP_536846			www.methdb.de/ y/o www.mdanderson.org/
NR_002196			www.methdb.de/ y/o www.mdanderson.org/

Véase también Ilana Keshet, y col., Nature Genetics 38, 149-153 (1 de febrero de 2006) y Gerd P Pfeifer, y col., Expert Opinion on Medical Diagnostics, septiembre de 2007, Vol. 1, N.º 1, páginas 99-108.

5 Como se utiliza en el presente documento, el término “adenoma” se refiere a un tumor benigno de origen glandular. Aunque estos crecimientos son benignos, con el tiempo pueden progresar y convertirse en malignos. Como se utiliza en el presente documento, la expresión “adenoma colorrectal” se refiere a un tumor colorrectal benigno en el que las células forman estructuras glandulares reconocibles o en el que las células claramente derivan de un epitelio glandular.

10 El término “amplificar” o “amplificación” en el contexto de los ácidos nucleicos se refiere a la producción de múltiples copias de un polinucleótido, o una parte del polinucleótido, normalmente comenzando a partir de una pequeña cantidad del polinucleótido (por ejemplo, una única molécula de polinucleótido), donde los productos de amplificación o amplicones son generalmente detectables. La amplificación de polinucleótidos engloba una variedad de procesos químicos y enzimáticos. La generación de múltiples copias de ADN de una o unas cuantas copias de una molécula de ADN diana o matriz durante la reacción en cadena de polimerasa (PCR) o una reacción en cadena de ligasa (LCR; véase, por ejemplo, la Patente de EE. UU. N.º 5.494.810;) son formas de amplificación. Tipos adicionales de amplificación incluyen, pero no se limitan a, PCR específica de alelo (véase, por ejemplo, la Patente de EE. UU. N.º 5.639.611); amplificación dependiente de helicasa (véase, por ejemplo, la Patente de EE. UU. N.º 7.662.594), PCR de inicio caliente (véase, por ejemplo, las Patentes de EE. UU. N.º 5,773,258 y 5,338,671), PR específica de intersecuencia, PCR inversa (véase, por ejemplo, Triglia, y col. (1988) Nucleic Acids Res., 16:8186), PCR mediada por ligamiento (véase, por ejemplo, Guilfoyle, R. y col., Nucleic Acids Research, 25:1854-1858 (1997); Patente de EE. UU. N.º 5.508.169), PCR específica de metilación (véase, por ejemplo, Herman, y col., (1996) PNAS 93(13) 9821-9826), PCR de minicebador, amplificación en sonda dependiente de ligamiento múltiple (véase, por ejemplo, Schouten, y col., (2002) Nucleic Acids Research 30(12): e57), PCR múltiple (véase, por ejemplo, Chamberlain, y col., (1988) Nucleic Acids Research 16(23) 11141-11156; Ballabio, y col., (1990) Human Genetics 84(6) 571-573; Hayden, y col., (2008) BMC Genetics 9:80), PCR anidada, PCR de extensión solapada (véase, por ejemplo, Higuchi, y col., (1988) Nucleic Acids Research 16(15) 7351-7367), PCR en tiempo real (véase, por ejemplo, Higuchi, y col., (1992) Biotechnology 10:413-417; Higuchi, y col., (1993) Biotechnology 11:1026-1030), PCR de transcripción inversa (véase, por ejemplo, Bustin, S.A. (2000) J. Molecular Endocrinology 25:169-193; que se incorpora en el presente documento por referencia en su totalidad), PCR en fase sólida, PCR entrelazada asimétrica térmica y PCR de toma de contacto (véase, por ejemplo, Don, y col., Nucleic Acids Research (1991) 19(14) 4008; Roux, K. (1994) Biotechniques 16(5) 812-814; Hecker, y col., (1996) Biotechniques 20(3) 478-485). La amplificación de polinucleótidos también se puede conseguir utilizando PCR digital (véase, por ejemplo, Kalinina, y col., Nucleic Acids Research. 25; 1999-2004, (1997); Vogelstein y Kinzler, Proc Natl Acad Sci USA. 96; 9236-41, (1999); Publicación de Patente internacional N.º WO05023091A2; Publicación de Patente de EE. UU. N.º 20070202525).

35 La expresión “reacción en cadena de polimerasa” (“PCR”) se refiere al procedimiento de las patentes N.º 4,683,195, 4,683,202, y 4,965,188 de K.B. Mullis, que describe un procedimiento para aumentar la concentración de un

segmento de una secuencia diana en una mezcla de ADN genómico sin clonación ni purificación. Este proceso de amplificación de la secuencia diana consiste en la introducción de un gran exceso de dos oligonucleótidos cebadores a la mezcla de ADN que contiene la secuencia diana deseada, seguido por una secuencia precisa de ciclado térmico en presencia de una ADN polimerasa. Los dos cebadores son complementarios a sus respectivas cadenas de la secuencia diana de doble cadena. Para efectuar la amplificación, la mezcla se desnatura y entonces los cebadores se hibridan con sus secuencias complementarias de la molécula diana. A continuación de la hibridación, los cebadores se extienden con una polimerasa de manera que forman un nuevo par de cadenas complementarias. Las etapas de desnaturalización, hibridado con cebadores, y extensión con polimerasa se pueden repetir muchas veces (es decir, la desnaturalización, hibridado y extensión constituye un "ciclo"; puede haber numerosos "ciclos") para obtener una alta concentración de un segmento amplificado de la secuencia diana deseada. La longitud del segmento amplificado de la secuencia diana deseada se determina por las posiciones relativas de los cebadores con respecto uno con el otro, y, por lo tanto, esta longitud es un parámetro controlable. Mediante el aspecto repetitivo del procedimiento, se hace referencia al procedimiento como la "reacción en cadena de polimerasa" ("PCR"). Debido a que los segmentos amplificados deseados de la secuencia diana se convierten en las secuencias predominantes (en términos de concentración) en la mezcla, se dice que han sido "amplificados por PCR" y son "productos de la PCR" o "amplicones".

Como se utiliza en el presente documento, la expresión "ensayo de detección de ácido nucleico" se refiere a cualquier procedimiento de determinación de la composición de nucleótidos de un ácido nucleico de interés. El ensayo de detección de ácido nucleico incluye, por no se limita a, procedimientos de secuenciación de ADN, procedimientos de hibridación con sondas, ensayos de escisión específica de la estructura (por ejemplo, el ensayo INVADER (Hologic, Inc.) y se describen, por ejemplo, en las Patentes de EE. UU. N.º 5.846.717, 5.985.557, 5.994.069, 6.001.567, 6.090.543, y 6.872.816; Lyamichev y col., Nat. Biotech., 17:292 (1999), Hall y col., PNAS, USA, 97:8272 (2000), y documento US 2009/0253142); procedimientos de escisión enzimático no coincidente (por ejemplo, Variagenics, Pat. de EE. UU. N.º 6.110.684, 5.958.692, 5.851.770); reacción en cadena de la polimerasa; procedimientos de hibridación ramificada (por ejemplo, Chiron, Pat. de EE. UU. N.º 5.849.481, 5.710.264, 5.124.246, y 5.624.802, replicación de círculo rotativo (por ejemplo, Pat. de EE. UU. N.º NASBA (por ejemplo, Pat. de EE. UU. N.º 5.409.818); tecnología de baliza molecular (por ejemplo, Pat. de EE. UU. N.º 6.150.097); tecnología de E-sensor (Motorola, Pat. de EE. UU. N.º 6.248.229, 6.221.583, 6.013.170, y 6.063.573); tecnología de ciclado de sondas (por ejemplo, Pat. de EE. UU. N.º 5.403.711, 5.011.769, y 5.660.988); procedimientos de amplificación de señal de Dade Behring (por ejemplo, Pat. de EE. UU. N.º 6.121.001, 6.110.677, 5.914.230, 5.882.867, y 5.792.614); reacción en cadena de la ligasa (por ejemplo, Barnay Proc. Natl. Acad. Sci USA 88, 189-93 (1991)); y procedimientos de hibridación en sándwich (por ejemplo, Pat. de EE. UU. N.º 5,288,609).

Como se utilizan en el presente documento, los términos "complementario" o "complementariedad" utilizados en referencia a polinucleótidos (es decir, una secuencia de nucleótidos) se refiere a polinucleótidos relacionados por las reglas de emparejamiento de bases. Por ejemplo, la secuencia "5'-A-G-T-3'" es complementaria a la secuencia "3'-T-C-A-5'". La complementariedad puede ser "parcial", en la que solo algunos de las bases de ácido nucleico se emparejan según las reglas de emparejamiento de bases. O, puede ser una complementariedad "completa" o "total" entre los ácidos nucleicos. El grado de complementariedad entre cadenas de ácidos nucleicos tiene efectos significativos sobre la eficacia y fuerza de la hibridación entre cadenas de ácido nucleico. Esto es de particular importancia en las reacciones de amplificación, así como procedimientos de detección que dependen de la unión entre ácidos nucleicos.

Como se utiliza en el presente documento, el término "cebador" se refiere a un oligonucleótido, sea de origen natural, como en una digestión de restricción purificada, o producido sintéticamente, que es capaz de actuar como un punto de inicio de síntesis cuando se coloca en condiciones en las que la se induce la complementariedad con una cadena de ácido nucleico (por ejemplo, en presencia de nucleótidos y un agente inductor tal como un biocatalizador (por ejemplo, una ADN polimerasa o similar). El cebador normalmente es de cadena sencilla para una máxima eficacia de la amplificación, pero puede ser alternativamente parcial o completamente de cadena doble. La parte del cebador que se hibrida con un ácido nucleico matriz es lo suficientemente larga para cebar la síntesis de productos de extensión en presencia del agente de inducción. Las longitudes exactas de los cebadores dependerán de muchos factores, incluyendo temperatura, fuente del cebador y uso del procedimiento. Los cebadores pueden comprender marcadores, marcas, restos de captura, etc.

Como se utiliza en el presente documento, la expresión "molécula de ácido nucleico" se refiere a cualquier molécula que contiene un ácido nucleico, incluyendo, pero no limitada a, ADN o ARN. La expresión engloba secuencias que incluyen cualquiera de los análogos de bases conocidas de ADN y ARN incluyendo, pero sin limitarse a, 4-acetilcitosina, 8-hidroxi-N6-metiladenosina, aziridinilcitosina, pseudoisocitosina, 5-(carboxihidroxi-metil) uracilo, 5-fluorouracilo, 5-bromouracilo, 5-carboximetilaminometil-2-tiouracilo, 5-carboximetil-aminometiluracilo, dihidouracilo, inosina, N6-isopenteniladenina, 1-metiladenina, 1-metilpseudouracilo, 1-metilguanina, 1-metilinosina, 2,2-dimetilguanina, 2-metiladenina, 2-metilguanina, 3-metil-citosina, 5-metilcitosina, N6-metiladenina, 7-metilguanina, 5-metilaminometiluracilo, 5-metoxi-amino-metil-2-tiouracilo, beta-D-manosilqueosina, 5'-metoxicarbonilmetiluracilo, 5-metoxiuracilo, 2-metil-N-isopenteniladenina, uracilo-5-metiléster de ácido oxiacético, uracilo-5-ácido oxiacético, oxibutuosina, pseudouracilo, queosina, 2-tiocitosina, 5-metil-2-tiouracilo, 2-tiouracilo, 4-tiouracilo, 5-metiluracilo, N-uracilo-5-metiléster del ácido oxiacético, uracilo-5-ácido oxiacético, pseudouracilo, queosina, 2-tiocitosina, y 2,6-diaminopurina.

Como se utiliza en el presente documento, el término “nucleobase” es sinónimo de otros términos que se utilizan en la técnica que incluyen “nucleótido”, “desoxinucleótido”, “resto de nucleótido”, “resto de desoxinucleótido”, “nucleótido trifosfato (NTP)”, o “desoxinucleótido trifosfato (dNTP)”.

Un “oligonucleótido” se refiere a un ácido nucleico que incluye al menos dos unidades monoméricas de ácido nucleico (por ejemplo, nucleótidos), normalmente más de tres unidades monoméricas, y más normalmente más de diez unidades monoméricas. El tamaño exacto de un oligonucleótido depende en general de distintos factores, incluyendo la última función o uso del nucleótido. Como ilustración adicional, los oligonucleótidos tienen normalmente menos de 200 restos de longitud (por ejemplo, entre 15 y 100), sin embargo, como se utiliza en el presente documento, el término también tiene la intención de englobar cadenas de polinucleótido más largas. A menudo se hace referencia a los oligonucleótidos por su longitud. Por ejemplo, se hace referencia a un oligonucleótido de 24 restos como un “24-mero”. Normalmente, los monómeros de nucleótidos se unen por enlaces fosfodiéster o análogos de los mismos, incluyendo, fosforotioato, fosforoditioato, fosforoselenoato, fosforodiselenoato, fosforoanilotoato, fosforoanilidato, fosforoamidato, y similares, incluyendo los contraiones asociados, por ejemplo, H^+ , NH_4^+ , Na^+ , y similares, si dichos contraiones están presentes. Adicionalmente, los oligonucleótidos son normalmente de cadena sencilla. Los oligonucleótidos se preparan opcionalmente por cualquier procedimiento adecuado, incluyendo, pero sin limitarse a, aislamiento de una secuencia existente o natural, replicación o amplificación de ADN, transcripción inversa, clonación y digestión de restricción de secuencias apropiadas, o síntesis química directa por un procedimiento tal como el procedimiento de fosfotriéster de Narang y col. (1979) *Meth Enzymol.* 68: 90-99; el procedimiento fosfodiéster de Brown y col. (1979) *Meth Enzymol.* 68: 109-151; el procedimiento dietilfosforoamidita de Beaucage y col. (1981) *Tetrahedron Lett.* 22: 1859-1862; el procedimiento triéster de Matteucci y col. (1981) *J Am Chem Soc.* 103:3185-3191; procedimientos de síntesis automática; o el procedimiento de soporte sólido de la Pat. de EE. UU. N.º 4,458,066, titulada “PROCESS FOR PREPARING POLYNUCLEOTIDES,” expedida el 3 de jul. de 1984 de Caruthers y col., u otros procedimientos conocidos por los expertos en la técnica.

Una “secuencia” de un biopolímero se refiere al orden e identificación de unidades monoméricas (por ejemplo, nucleótidos, aminoácidos, etc.) en el biopolímero. La secuencia (por ejemplo, una secuencia de base) de un ácido nucleico se lee normalmente en la dirección 5' a 3'.

La expresión “de tipo silvestre” se refiere a un gen o producto genético que tiene las características del gen o producto genético cuando se aísla de una fuente de origen natural. Un gen de tipo silvestre es el que se observa más frecuentemente en una población y por lo tanto se denomina arbitrariamente la forma “normal” o “de tipo silvestre” del gen. Por el contrario, los términos “modificado”, “mutante”, y “variante” se refiere a un gen o producto genético que presenta modificaciones en la secuencia y/o propiedades funcionales (es decir, características alteradas) cuando se compara con el gen o producto genético de tipo silvestre. Se señala que se pueden aislar mutantes de origen natural; estos se identifican por el hecho de que tienen características alteradas cuando se comparan con el gen o producto genético de tipo silvestre.

Como se utiliza en el presente documento, el término “gen” se refiere a una secuencia de ácido nucleico (por ejemplo, ADN) que comprende las secuencias codificantes necesarias para la producción de un polipéptido, precursor, o ARN (por ejemplo, ARNr, ARNt). El polipéptido puede codificarse por una secuencia codificante de longitud completa o por cualquier parte de la secuencia codificante a condición de que se mantengan la actividad deseada o las propiedades funcionales (por ejemplo, actividad enzimática, unión a ligandos, transducción de señal, inmunogenicidad, etc.) del polipéptido de longitud completa o fragmento. El término también engloba la región codificante de un gen estructural y las secuencias localizadas adyacentes a la región codificante en los extremos 5' y 3' a una distancia de aproximadamente 1 kb o más en cualquier extremo de manera que el gen se corresponde con la longitud del ARNm de longitud completa. Se hace referencia a las secuencias localizadas 5' de la región codificante y presentes en el ARNm como secuencias 5' no traducidas. Se hace referencia a las secuencias localizadas 3' o corriente abajo de la región codificante y presentes en el ARNm como secuencias 3' no traducidas. El término “gen” engloba las formas de ADNc y genómica de un gen. Una forma genómica o clon de un gen contiene la región codificante interrumpida por secuencias no codificantes denominadas “intrones o “regiones de intervención” o “secuencias de intervención”. Los intrones son segmentos de un gen que se transcriben en un ARN nuclear (por ejemplo, ARNhn); los intrones pueden contener elementos reguladores (por ejemplo, amplificadores). Los intrones se retiran o “recortan” de la transcripción nuclear o primaria; los intrones por lo tanto están ausentes de la transcripción en ARN mensajero (ARNm). El ARNm funciona durante la traducción para especificar la secuencia u orden de aminoácidos en un polipéptido que surge.

Además de contener intrones, las formas genómicas de un gen también pueden incluir secuencias localizadas en el extremo 5' y 3' de las secuencias que están presentes en la transcripción en ARN. Se hace referencia a estas secuencias como secuencias o regiones “flanqueantes” (estas secuencias flanqueantes se localizan 5' o 3' respecto a las secuencias no traducidas presentes en la transcripción en ARNm). La región flanqueante 5' puede contener secuencias reguladoras tales como promotores y amplificadores que controlan o tienen influencia en la transcripción del gen. La región flanqueante 3' puede contener secuencias que dirigen la terminación de la transcripción, la escisión post-transcripcional y la poliadenilación.

Como se utiliza en el presente documento, los términos “multimetilación”, “metilación en serie” y “metilación específica” se utilizan de manera intercambiable para referirse a que las combinaciones definidas de sitios o loci CpG en una secuencia marcadora deben estar metiladas para decir que la secuencia está metilada en un ensayo coordinado o de multimetilación. Por ejemplo, un ensayo de metilación específica de los sitios CpG para BMP3 puede necesitar que las posiciones CpG en 23, 34, 53, 61, 70 y 74, numeradas en referencia a las Figuras 1A y 1B están todas metiladas con el fin de que una muestra se clasifique como metilada en el marcador BMP3. La metilación específica de BMP3 no se limita a este conjunto de loci particulares, sino que puede incluir más, menos o una colección diferente de loci CpG. Los loci CpG seleccionados para el co-análisis en un ensayo de multimetilación se seleccionan preferentemente, por ejemplo, por análisis de muestras normales (sin adenoma, sin cáncer) para identificar las combinaciones de metilación de CpG que se representan menos frecuentemente en las muestras normales. En realizaciones preferidas, las combinaciones de sitios de metilación se seleccionan de entre las que producen una buena señal-respecto a-ruido en muestras de cáncer y adenoma (es decir, cuando la media de multimetilación en una combinación de loci particular en muestras de cáncer dividida por la media de multimetilación en los loci de muestras normales sea alta).

Como se utiliza en el presente documento, los términos metilación “individual” y “media” se utilizan de manera intercambiable para referirse a análisis en los que cada locus CpG se analiza individualmente, de manera que todas las moléculas en las que la base está metilada se incluyen en un recuento, independientemente del estado de metilación de otros loci, por ejemplo, en el mismo marcador. En general los porcentajes de metilación de todos los loci en el marcador/región se promedian entonces, para producir una cifra de porcentaje de metilación para ese marcador.

Como se utiliza en el presente documento, el término “kit” se refiere a cualquier sistema de suministro para suministrar materiales. En el contexto de ensayos de reacción, dichos sistemas de suministro incluyen sistemas que permiten el almacenamiento, transporte, o suministro de reactivos de reacción (por ejemplo, oligonucleótidos, enzimas, etc. en los envases apropiados) y/o materiales de soporte (por ejemplo, tampones, construcciones escritas para llevar a cabo el ensayo, etc.) de una localización a otra. Por ejemplo, los kits incluyen uno o más recipientes (por ejemplo, cajas) que contienen los reactivos de reacción y/o materiales de soporte relevantes. Como se utiliza en el presente documento, la expresión “kit fragmentado” se refiere a un sistema de suministro que comprende dos o más envases separados que contiene cada uno una subparte del total de los componentes del kit. Los envases se pueden suministrar para el receptor que se pretende juntos o por separado. Por ejemplo, un primera envase puede contener una enzima para su uso en un ensayo, mientras que un segundo envase contiene oligonucleótidos. Se tiene la intención que la expresión “kit fragmentado” englobe kits que contengan reactivos específicos de analitos (ASR) regulados bajo la sección 520(e) del Acta Federal de Alimentos, Fármacos y Cosméticos, pero no se limita a estos. Además, cualquier sistema de suministro que comprende dos o más envases separados que contenga cada uno una subparte de los componentes totales del kit se incluyen en la expresión “kit fragmentado”. Por el contraste, un “kit combinado” se refiere a un sistema de suministro que contiene todos los componentes de un ensayo de reacción en un único envase (por ejemplo, en un único recipiente que alberga cada uno de los componentes deseados). El término “kit” incluye tanto los kits fragmentados como los combinados.

Como se utiliza en el presente documento, el término “información” se refiere a una colección de hechos o de datos. En referencia a la información almacenada o procesado utilizando un sistema de computadora, incluyendo, pero no limitada a, internet, el término se refiere a cualquier dato almacenado en cualquier formato (por ejemplo, analógico, digital, óptico, etc.). Como se utiliza en el presente documento, la expresión “información relativa a un sujeto” se refiere a los hechos o datos pertenecientes a un sujeto (por ejemplo, un ser humano, planta, o animal). La expresión “información genómica” se refiere a la información perteneciente a un genoma que incluye, pero no se limita a, secuencias de ácido nucleico, genes, frecuencias de alelo, niveles de expresión de ARN, expresión proteica, fenotipos que se correlacionan con Genotipos, etc. “Información de frecuencia de alelo” se refiere a los hechos o datos que pertenecen a las frecuencias de alelos, incluyendo, pero sin limitarse a, identidades de alelos, correlaciones estadísticas entre la presencia de un alelo y una característica de un sujeto (por ejemplo, un sujeto humano), la presencia o ausencia de un alelo en un individuo o población, el porcentaje de probabilidad de que un alelo esté presente en un individuo que tenga una o más características particulares, etc.

Descripción de los dibujos

Las Figuras 1A y 1B proporciona información de secuencia y CpG para las regiones marcadoras ejemplares en el presente análisis. Para cada gen diana, se muestra la secuencia nativa de la región en la línea superior. Los restos C no metilados que se convertirían por bisulfito y amplificación en Ts se muestran como restos T. Las posiciones candidatas a la metilación se muestran encuadradas. El número de referencia por base y posiciones CpG se muestra encima de cada secuencia nativa. Las localizaciones de cebador para la amplificación se muestran como una fila de posiciones de bases subrayadas.

Las Figuras 2A-J proporciona tablas que muestran los análisis de muestras normales, de adenoma y cáncer en el que la media de metilación se determinó en cada una de las posiciones CpG indicadas, en las regiones marcadoras indicadas. Para cada marcador, las posiciones CpG numeradas son las que se indica en referencia a los números de las Figuras 1A y 1B. La media de metilación de cada locus específico se muestra en la parte de abajo de cada columna para las muestras normales, de adenoma y cáncer. La relación de metilación

normal/mutante para cada locus (una relación de metilación en cada locus) se muestra en la parte inferior de cada columna de los datos de muestras de Adenoma y Cáncer. La columna de Medias a la derecha de cada tabla indica la media de metilación a lo largo de todos los loci CpG indicados para cada una de las muestras. Los valores de la Media y SD a lo largo de todas las muestras normales en todos los loci se indican en la parte inferior de cada tabla de valores de las muestras normales.

Las Figuras 3A-I proporcionan tablas que muestran los análisis de las muestras normales, de adenoma y cáncer en los que se calculó la media de metilación a lo largo de todos los loci CpG indicados en las Figuras 2A-J para cada marcador en cada muestra. Para las muestras normales en la Fig. 3A, se indican la media, desviación típica y la media más 2 o 3 desviaciones típicas para cada marcador. Para las muestras de adenoma y cáncer, las celdas sombreadas en las Fig. 3B y 3C indican un resultado positivo, que se refleja como un valor medio de metilación para ese marcador que es mayor que la media de metilación + 3 desviaciones típicas determinadas para ese marcador en las muestras normales.

Las Figuras 3D y 3E muestran el efecto calculado de una dilución de 20 veces de ADN de adenoma y cáncer en ADN normal, Las Figuras 3F y 3G muestran una dilución de 10 veces calculada, y las Fig. 3H y 3I muestran una dilución calculada de 5 veces. En cada una de las diluciones calculadas, la media de metilación para un marcador se divide por 20, 10 o 5, se añade a la media de metilación de ADN normal para ese marcador. Las celdas sombreadas de las Fig. 3D-3I indican un valor de la media de metilación para ese marcador que es mayor que la media de metilación + 2 desviaciones típicas (especificidad del 97,5 %) determinada para ese marcador en las muestras normales.

Debajo de cada una de las Figuras 3B-3I, se indican el porcentaje de valores positivos para cada marcador en la muestra tipo y la dilución para ese panel. El porcentaje de muestras que dan una señal positiva para al menos uno de los marcadores Vimentin, BMP3, Septin 9 y TFPI2 se indican en la parte inferior de cada panel.

Las Figuras 4A y 4B proporcionan la secuencia y la información de CpG para genes ejemplares utilizados en el presente análisis. Los loci CpG de cada gen marcador incluidos en los subconjuntos definidos de loci CpG para el análisis de metilación coordinada en muestras de adenoma y cáncer colorrectal se muestran con un fondo negro y letras en blanco.

Las Figuras 5A-I proporcionan tablas que muestran los análisis de muestras normales, de adenoma y de cáncer en los que se determinó la metilación de cada una de las posiciones CpG indicadas en las regiones marcadoras indicadas (es decir, las muestras se ensayaron en cuanto al porcentaje de copias de ADN que presentan metilación en todos los loci CpG del subconjunto definido). Cada marcador se ensayó en cada uno de los loci CpG en los subconjuntos definidos en las Figuras 4A y 4B y los datos del porcentaje de metilación refleja el porcentaje de copias del marcador que tienen metilación en todos los loci CpG ensayados (análisis de metilación coordinada o de "multimetilación"). Para las muestras normales, en la Fig. 5A, se indican la media de multimetilación, la desviación típica y la media más 2 o 3 desviaciones típicas para cada marcador. Para las muestras de adenoma y cáncer, las celdas sombreadas de las Fig. 5B y 5C indican un resultado positivo, reflejado como el valor de multimetilación para ese marcador que es mayor que la media de multimetilación + 3 desviaciones típicas determinadas para ese marcador en las muestras normales.

Las Figuras 5D y 5E muestran el efecto calculado de una dilución de 20 veces de ADN de adenoma y cáncer en ADN normal. Las Fig. 5F y 5G muestran una dilución calculada de 10 veces, y 5H y 5I muestran una dilución calculada de 5 veces. En cada una de las diluciones calculadas, la media de multimetilación para un marcador se divide por 30, 10, 9 5, se añade a la media de multimetilación del ADN normal para ese marcador. Las celdas sombreadas de las Fig. 5D-5I indican un valor de la media de multimetilación para ese marcador que es mayor que la media de multimetilación + 2 desviaciones típicas (especificidad del 97,5 %) determinada para ese marcador en las muestras normales.

Debajo de cada una de las Fig. 5B-5I, se indica el porcentaje de valores positivos de cada marcador en el tipo de muestra y dilución para ese panel. Se indican el porcentaje de muestras que dan una señal positiva para al menos uno de los marcadores de vimentin, BMP3, Septin 9 y TFPI2 en la parte inferior de cada panel.

La Figura 6 muestra una tabla y un gráfico que comparan los valores del porcentaje de positivos de cada marcador en las muestras de adenoma y cáncer, como se indica, utilizando procedimientos de análisis de metilación individual/media o multimetilación para ensayar cada uno de los marcadores indicados, en cada una de las diluciones calculadas indicadas.

La Figura 7 muestra una tabla y un gráfico que compara los valores del porcentaje de positivos determinados en muestras de adenoma y cáncer, determinados utilizando cuatro marcadores con la media inferior de fondo en estas muestras (vimentin, BMP3, Septin 9, TFPI2), utilizando el procedimiento de análisis de metilación individual/media o multimetilación, en cada una de las diluciones calculadas indicadas en ADN normal.

Descripción detallada de la invención

Se describen las realizaciones de la invención en el presente sumario, y en el Sumario de la invención, anterior, que se incorpora en el presente documento por referencia. Aunque la invención se ha descrito en conexión con realizaciones específicas, se debería entender que la invención reivindicada no debería limitarse indebidamente a dichas realizaciones específicas.

La presente invención se refiere a procedimientos de determinación, y usos de patrones de metilación específicos indicativos de adenoma y carcinoma de acuerdo con las reivindicaciones. En particular, la invención se refiere a análisis de subconjuntos definidos de loci CpG que están metilados coordinadamente en los ADN de muestras de cáncer y adenoma, y procedimientos para utilizar el análisis de loci metilados coordinadamente en uno o más marcadores o regiones en el diseño de ensayos para adenoma y cáncer que tienen una sensibilidad y especificidad mejoradas.

La presente invención se refiere a la observación de que, en los ácidos nucleicos marcadores para los que el estado de metilación es indicativo del estado celular, por ejemplo, canceroso, pre-canceroso, normal, etc., un subconjunto de la metilación individual de loci, por ejemplo, loci CpG, en células no normales presentan en general un grado de metilación mayor con respecto a los niveles de fondo de metilación observada en los loci correspondiente de las células normales, mientras que la metilación de otros loci en las células no normales pueden presentar niveles de metilación que están más cercanos a los niveles de fondo. En algunas realizaciones, el grado de metilación observada para un locus particular en una pluralidad de células cancerosas o pre-cancerosas con respecto a las células normales se expresa como una relación de metilación.

Algunas realizaciones de la presente invención se refieren a la exploración de genes marcadores conocidos o sospechosos para identificar la metilación específica de loci que presentan relaciones mayores de metilación asociada a enfermedad con respecto a la metilación de fondo, en comparación con otros genes marcadores u otros loci en el mismo gen marcador. En algunas realizaciones preferidas, la presente invención se refiere al análisis de metilación coordinada, para medir el grado hasta el cual una molécula marcadora o una muestra presenta metilación en todos los loci seleccionados de una pluralidad.

La presente invención se refiere al análisis de estados de metilación de un conjunto definido de loci CpG individuales en marcadores de metilación (o regiones diana con dichos marcadores) con un número significativamente suficiente de moléculas de ADN individuales en muestras de adenoma o muestras de cáncer para identificar subconjuntos definidos de loci CpG que tengan relaciones de metilación ventajosas en comparación con otros loci de las mismas muestras de adenoma o cáncer. Un subconjunto definido de loci CpG que tenga relaciones de metilación ventajosas en una muestra puede comprender la totalidad de un conjunto de loci CpG en un marcador particular o región diana de un marcador, o puede ser menor de todos los loci CpG en la región caracterizada del marcador.

Los procedimientos convencionales de análisis del estado de metilación de un marcador generalmente implican el análisis de una población mixta de moléculas. Por ejemplo, la amplificación de un ácido nucleico marcador de una muestra produce en general una mezcla de amplicones que vienen de muchas copias de una molécula diana. Si las condiciones de amplificación no son selectivas de una variante genética, el producto amplicón contiene una mezcla de la variante y el ADN normal o de tipo silvestre. Incluso si los cebadores son específicos de una mutación o para un sitio de metilación particular, cuando se amplifica el ADN a partir de muchas copias de ADN diana derivado de muchas células, puede haber una heterogeneidad en otras posiciones de bases del amplicón resultante. Si esta población mixta, y las secuencias particulares o mutaciones presentes en una pequeña parte de la población son esencialmente no detectables. Aunque algunos investigadores han secuenciado los clones individuales de dichas amplificaciones para examinar la información de secuencia de moléculas individuales de la mezcla, solo se analizaban unas pocas moléculas y los datos acumulados no sugerían que alguno de los loci específicos en los marcadores presentara de manera previsible relaciones de metilación ventajosas en comparación con otros loci metilados de la misma diana, o que el análisis coordinado de loci tuviera relaciones de metilación ventajosas que pudieran ser útiles en mejorar la especificidad y sensibilidad de los ensayos de detección de neoplasias. Un aspecto de la presente invención se basa en la observación de que la recolección de la información de la relación de metilación de una cantidad muy grande de moléculas individuales tanto de muestras normales y no normales revela que la metilación de algunos loci en las regiones marcadores o secuencias presenta un grado mayor de metilación en células no normales en comparación con la de fondo (metilación en los mismos loci de células normales) que otros loci individuales de la misma región marcadora o gen. Estos loci en las secuencias no normales que tienen un nivel de metilación mayor en comparación con la de fondo se puede ver como particularmente ventajoso ya que son más fáciles de identificar sobre el nivel de metilación de fondo observado en las células normales. Un aspecto de esta ventaja es que ese análisis de estos loci particulares permite la identificación de metilación asociada al cáncer con más sensibilidad, y en un nivel mayor al de fondo de las células normales.

La presente invención también se refiere a la observación de que el análisis coordinado de múltiples loci proporciona un nivel significativamente aumentado de sensibilidad de la identificación de células cancerosas o precancerosas, especialmente en muestras que pueden comprender también una cantidad significativa de células normales. Por ejemplo, la Figura 6 compara la sensibilidad de detección de ce de adenoma y cancerosas. Para cada uno de los genes marcadores indicados, la metilación se determinaba como una media a lo largo de la región marcadora (por

ejemplo, la media de metilación en el marcador vimentina a lo largo de todos los loci de 26, 37, 40, 45, 52, 54, 59, 63, y 74; véase las Figuras 3A-I), indicada como media de metilación “individual”, o como un porcentaje de moléculas que presentan metilación en todos un subconjunto de loci seleccionados (por ejemplo, metilación en el marcador vimentin en los tres loci 37, 40, y 45; véase las Figuras 5A-I), es decir, el análisis de metilación coordinada de múltiples loci individuales, indicado como “multi”. Las sensibilidades de las mismas muestras también se muestran en las diluciones de 5, 10 o 20 veces en ADN normal. La Figura 6 muestra que, mientras que las sensibilidades del ensayo pueden ser similares en el ADN analizado directamente del tejido sin dilución, como la cantidad de fondo del ADN normal se aumenta en las diluciones mayores, el análisis de metilación coordinada muestra que es más sensible que el análisis de media de metilación. Por ejemplo, en el análisis de Septin 9, las muestras de adenoma y cáncer se pueden detectar por encima del fondo solamente en los perfiles sin diluir y de dilución de cinco veces cuando se analiza la media de metilación a lo largo del marcador, mientras que estas mismas muestras se pueden detectar con más de aproximadamente un 69-74 % de sensibilidad con una dilución de 20 veces, y un 90-93 % de sensibilidad con una dilución de 10 veces, cuando se utiliza un análisis de metilación coordinada de los loci 37, 40 y 45.

La divulgación proporciona un procedimiento para diseñar un ensayo de metilación para identificar un estado de enfermedad, que comprende I) la selección de al menos una secuencia de análisis; II) la determinación del estado de metilación de una pluralidad de loci en la secuencia en una población de células normales y una población de células no normales para determinar una tasa media de metilación para cada uno de la pluralidad de loci de cada células normal y no normal; y III) la identificación de al menos dos loci en dicha pluralidad de loci que tiene relaciones de metilación ventajosas.

I. Selección de secuencias. Los marcadores de metilación asociados con estados de enfermedad particulares se han identificado para varios estados de enfermedad. Por ejemplo, los marcadores específicos de neoplasias colorrectales incluyen, por ejemplo, bmp-3, bmp-4, SFRP2, vimentin, septin 9, ALX4, EYA4, TFPI2, NDRG4, FOXE1, ADN largo, BAT-26, K-ras, APC, antígeno genético de melanoma, p53, BRAF, y PIK3CA. Marcadores adicionales incluyen, pero no se limitan a los de la Tabla 1 anterior. El análisis de los loci candidatos a metilación para identificar los que tienen relaciones de metilación ventajosas puede comprender el análisis de cada locus en la secuencia diana (por ejemplo, cada CpG) o puede comprender el análisis de un subconjunto de metilación de loci. Los CpG se pueden seleccionar para el análisis por su localización en puntos calientes de metilación particulares, mientras que otros loci para el análisis puede localizarse convenientemente con respecto a los sitios de unión al cebador u otras características de secuencia. La Figura 1A proporciona una selección ejemplar de marcadores asociados a una neoplasia con cada uno de los restos C en los loci CpG se indican por un cuadrado. Para cada gen diana, la secuencia nativa de la región se muestra en la línea superior y las secuencias de ADN no metilado y metilado según aparecen después de la conversión con bisulfito y amplificación se muestran debajo. Los restos C no metilados que se convertirían por bisulfito y amplificación en restos T se muestran como Ts.

En algunas realizaciones, la presente invención proporciona el uso de un ensayo de detección de ácidos nucleicos para analizar de manera coordinada una pluralidad de loci ventajosos en una muestra, determinando de esta manera el estado de enfermedad de las células de una muestra.

II. Determinación de las relaciones de metilación para los loci de la secuencia(s) seleccionada. Como se ha expuesto anteriormente, la determinación de la relación de metilación para un locus comprende la determinación de la tasa media de metilación para ese locus en una población de células normales y la determinación de la tasa media de metilación en el mismo locus en una población de células no normales. Como se ha señalado anteriormente, los procedimientos utilizados comúnmente de análisis de metilación de genes marcadores se llevan a cabo en ácidos nucleico mezclados, por ejemplo, amplicones producidos a partir de ADN no fraccionado de una población mixta de células (tales como el ADN purificado de una muestra tisular multicelular). Mientras que algunos estudios han analizado clones individuales de amplicones producidos a partir de una muestra de ADN no fraccionado, la cantidad de clones analizados ha sido normalmente demasiado pequeña para revelar diferencias significativas o reproducibles en las relaciones de metilación en loci CpG individuales en las secuencias. Por ejemplo, en su comparación de genes altamente metilados en el cáncer colorrectal, Zou, y col. analizaban solamente seis clones de cada muestra (Zou, y col., Cancer Epidemiol Biomarkers Prev 2007;16(12):2686), mientras que Weisenberg, y col. utilizaba la presente invención que comprende el análisis a gran escala de moléculas de ADN individuales, por ejemplo, por secuenciación directa de moléculas de ADN individuales, o por secuenciación del ADN amplificado clónicamente.

Aunque no limitando la presente invención a ningún procedimiento en particular, los procedimientos de amplificación clónica de copias de ácidos nucleicos individuales (por ejemplo, utilizando la PCR) se pueden utilizar en el análisis rápido de grandes cantidades de marcadores individuales de muestras normales y no normales. Los procedimientos de amplificación de molécula única pueden comprender el uso de microcámaras, reacciones de mulsión, “PCR puente” en soportes sólidos, o cualquiera de un número de procedimientos establecidas de segregación de productos de amplificación que aparecen de las moléculas diana individuales. A continuación de la amplificación de molécula única, se pueden secuenciar los amplicones.

Los procedimientos mejorados de secuenciación de molécula individuales directamente obvian la necesidad de clonar moléculas en células o, en algunos procedimientos, la necesidad de amplificar clónicamente antes de la secuenciación. La eliminación de clonación en las células hace que el análisis de colecciones de moléculas mucho mayores sea más eficaz. Las plataformas para la secuenciación de moléculas individuales incluyen 454

FLX™ o 454 TITANIUM™ (Roche), el SOLEXA™/Analizador de Genoma Illumina, el Secuenciador de Molécula Única HELISCOPE™ (Helicos Biosciences), la máquina Genoma Personal Ion (Ion Torrent) y el secuenciador de ADN SOLID™ (Life Technologies/Applied Biosystems), así como otras plataformas aún en desarrollo por compañías tales como Intelligent Biosystems y Pacific Biosystems. Aunque la química por la que se genera la información de secuencia varía en las plataformas de secuenciación de la próxima generación, todas ellas comparten la característica común de generar datos de secuencia a partir de un gran número de matrices de secuenciación individuales, en reacciones de secuenciación que se ejecutan simultáneamente. Los datos de las reacciones se recopilan utilizando, por ejemplo, una celda de flujo, un sensor químico u óptico, y/o explorador, y las secuencias se ensamblan y analizan utilizando un software bioinformático. En ciertas realizaciones preferidas, la presente invención proporciona procedimientos de análisis de marcadores de metilación utilizando secuenciación digital para identificar la metilación de loci asociada a neoplasia que tienen relaciones de metilación que son significativamente ventajosas estadísticamente en comparación con otros loci en los mismos marcadores. En realizaciones preferidas, la secuenciación digital se hace de una manera alta o masivamente paralela, proporcionando una precisión mayor en la identificación de la metilación de sitio CpG que tienen relaciones de metilación ventajosas.

Para los procedimientos de secuenciación digital masivamente paralela mencionada anteriormente, cada molécula se analiza en cuanto a la metilación en cada locus CpG, de manera que el porcentaje de copias de ADN que tienen metilación en cualquier combinación de loci CpG se puede analizar después de la ejecución experimental. Además, cada secuencia marcadora particular, por ejemplo, cada molécula de ácido nucleico diana, o amplicón clónico se pueden interrogar muchas, muchas veces, por ejemplo, al menos 100 veces, a veces más de 1000 veces, y en algunos casos por encima de 100.000 veces, o hasta 500.000 veces. Por lo tanto, los patrones de metilación coordinada indicativa de cáncer o adenoma que sería detectable en el análisis de un grupo de moléculas diana individuales se puede revelar.

III. Selección de un subconjunto de loci de metilación por análisis coordinado

Como se ha señalado anteriormente, la determinación del estado de metilación de un grupo de loci CpG en un gran número de copias de ADN marcador de muestras normales y muestras no normales (por ejemplo, de muestras de adenoma o cáncer) revela que ciertos loci CpG de los genes o regiones marcadoras pueden tender a estar metilados de manera coordinada. Además, el diseño de ensayos de detección de ácidos nucleicos para interrogar una pluralidad de loci CpG para los que la metilación coordinada es indicativa de adenoma o cáncer en una muestra puede proporcionar un ensayo que tenga una señal-respecto al ruido mejorada en comparación con ensayos que supervisan el porcentaje medio de metilación a lo largo de genes marcadores completos.

Un aspecto de la selección de un subconjunto de loci CpG comprende la selección de loci que se ha determinado que están metilados coordinadamente por el uso, por ejemplo, de procedimientos de análisis digital. Otro aspecto comprende la selección de loci CpG de los que se ha determinado que tienen relaciones de metilación ventajosas cuando se compara el ADN normal con el ADN de adenoma o cáncer. Los diseños de ensayos pueden, pero no necesariamente, utilizar un locus CpG que tenga la relación de metilación más ventajosa en comparación con otros loci en el mismo marcador. En algunas realizaciones, la selección de una pluralidad de loci CpG como un subconjunto comprende la selección de la pluralidad de loci que tiene las relaciones de metilación más ventajosas. En otras realizaciones, la selección de una pluralidad de loci CpG como un subconjunto comprende la selección del locus que tiene la relación de metilación más ventajosa, seleccionando entonces al menos loci CpG adicionales que están situados convenientemente con respecto al locus seleccionado en primer lugar para la configuración de un ensayo de detección de ácido nucleico particular (por ejemplo, la selección de loci CpG que tiene una proximidad particular entre ellos para la configuración de un ensayo de escisión invasivo, un ensayo de ligadura, un ensayo de amplificación, etc.) con el fin de interrogar a todos los loci CpG seleccionados en copias del ADN diana en un ensayo único. En algunas realizaciones, un subconjunto de loci CpG candidatos se analiza adicionalmente para determinar el porcentaje de copias del ADN marcador de muestras no normales que están metiladas coordinadamente en los loci candidatos, y que tienen poca o ninguna metilación coordinada en las muestras normales.

Análisis de muestras para la detección de adenoma o cáncer

Los procedimientos convencionales de análisis de metilación (por ejemplo, PCR específica de metilación convencional, PCR específica de metilación entiotempo real, véase, por ejemplo, los documentos US 5.786.146, 6.017.704, 6.200.756, 6.265.171), analizan normalmente de manera no digital, por ejemplo, analizando una mezcla de moléculas co-amplificadas derivadas de una mezcla de ácidos nucleicos ADN diana, de manera que el análisis de los productos amplificados proporciona la información de secuencia que refleja el estado de metilación agregado o medio en la población de amplicones, por no proporciona información del porcentaje de moléculas de partida que tenían metilación coordinada en todos de una pluralidad de loci CpG. En algunos casos los investigadores han analizado varios amplicones clonados, que pueden revelar la diversidad de metilación en los loci CpG en un gen marcador diana. Sin embargo, la secuenciación de clones individuales no proporciona suficientes datos para revelar una metilación coordinada estadísticamente significativa de subconjuntos de loci CpG específicos.

En contraste con los procedimientos convencionales, los inventores buscaron analizar los genes marcadores de metilación en de una manera de secuenciación digital masivamente paralela para identificar metilación coordinada estadísticamente significativa de loci CpG específicos asociados con neoplasias (adenoma y carcinoma). Este procedimiento de análisis permite:

1. Analizar muestras en cuanto a la metilación coordinada en un gen marcador como medio para detectar neoplasias sin necesidad de ensayar cada marcador (mutación) genético.

2. Analizar muestras en cuanto a metilación coordinada en una pluralidad de genes marcadores como medio de detección neoplasias sin la necesidad de ensayar ningún marcador (mutación) genético.

5 Los inventores decidieron utilizar una secuenciación “digital” en un gran número de muestras tisulares obtenidas de biopsias de adenomas colorrectales, cánceres colorrectales, epitelios colorrectales normales y otros cánceres GI y secuenciaron varias regiones específicas con varios genes. Este tipo de secuenciación proporciona un patrón de metilación para cada gen metilado individual. Para la primera ejecución los inventores tenían 9 muestras de tejidos normales, 38 de adenomas y 36 de cáncer con los siguientes marcadores - Vimentin, BMP3, Septin 9, TFPI2, 2
10 regiones de LRAT, y EYA4.

Sorprendentemente, los inventores descubrieron que, en algunos de los genes, el fondo observado como metilación en muestras normales se distribuye aleatoriamente en las secuencias, mientras que la metilación asociada con el cáncer y adenoma no. Por lo tanto, si se aplican ciertas reglas, por ejemplo, si todos los restos C a, b y c tienen que estar metilados en un ensayo diagnóstico, entonces el número de copias que presentan metilación en las tres
15 posiciones de esa secuencia se reduce en comparación con el número de copias de ADN que presentan metilación en un subconjunto de posiciones. En algunos de los genes o regiones marcadoras ensayadas, la reducción del número de copias de ADN en el ADN que presenta metilación en todos los sitios seleccionados arroja un grado mayor que en el ADN de la muestra de cáncer y/o adenoma, dando como resultado un aumento significativo de la relación de la señal específica respecto al ruido de fondo. Para ciertos genes, el fondo del ADN normal se reduce
20 drásticamente utilizando un análisis de multimetilación (metilación coordinada), mientras que no se ve una reducción equivalente en la señal del ADN de cáncer y adenoma. Para otros genes el fondo en las muestras normales se reduce menos y/o la señal del ADN del cáncer también disminuye con el análisis de multimetilación, de manera que hay menos o ninguna mejora neta en la señal respecto a ruido y las ventajas de utilizar el análisis de multimetilación son menores. Los genes que tienen una señal respecto a ruido favorable en los análisis de multimetilación se
25 determinan fácilmente empíricamente.

A partir de los datos de multimetilación presentados en el presente documento (véase, por ejemplo, las Figuras 2A-J) es posible:

- a. Identificar regiones en las secuencias genéticas que dan una mayor discriminación entre células normales y no normales, por ejemplo, de cáncer y adenoma);
- 30 b. Identificar genes particulares que tienen mayor señal respecto a ruido (señal de células no normales en comparación con el fondo de células normales);
- c. Identificar la metilación de loci particulares que tiene mayor señal respecto a ruido;
- d. Identificar la metilación en loci particulares que tienen metilación coordinadamente en muestras de adenoma y cáncer, pero no en muestras normales, de manera que la detección de metilación coordinada en estos loci es un
35 indicador sensible de adenoma o cáncer;
- e. Identificar los genes como metilación de fondo muy bajo que permita una mayor dilución de ADN metilado en ADN normal con menos disminución en la sensibilidad del ensayo;
- f. Identificar los genes que son complementarios diagnósticamente entre ellos, es decir, que cuando se analizan en combinación producen una información diagnóstica de elevada sensibilidad y/o elevada especificidad en
40 comparación con los genes analizados solos.
- g. Identificar combinaciones de genes que dan una elevada sensibilidad a elevada especificidad, por ejemplo, un 100 % de sensibilidad para el cáncer y adenoma a un 100 % de especificidad.

Ejemplos experimentales

Ejemplo 1

45 **Uso de PCR digital y secuenciación para la identificación de subconjuntos de loci CpG específicos metilados en muestras de cáncer y adenoma**

El ADN extraído de las muestras de tejido congeladas se trató con un kit de conversión con bisulfito EPITECT (Qiagen) para convertir las citosinas no metiladas en uracilo. Las citosinas metiladas se mantenían sin convertir. Se diseñaron los cebadores de cada región genética de manera que la composición de los productos de amplificación se mantuviera igual que las secuencias diana originales y las secuencias metiladas y no metiladas se amplificaron
50 con eficacias iguales. La amplificación del ADN convertido que contenía d/U producía amplicones que tienen restos T en lugar de los restos dU. Los amplicones se prepararon entonces por secuenciación en el instrumento Illumina. Para cada muestra de tejido, se preparó la reacción de amplificación de cada diana a partir de la misma muestra de ADN tratado con bisulfito.

55 Después de la secuenciación, se analizaron cuantitativamente los datos como la media de metilación similar a la secuenciación de Sanger, pero con una precisión y resolución más altas en la que se calcula la señal combinada en cada posición a partir de moléculas individuales. Para cada secuencia de amplicón, se evaluó un conjunto de loci CpG en cuanto al porcentaje de metilación en los diferentes tejidos, para identificar un subconjunto de loci que

estaban co-metilados más frecuentemente en muestras de cáncer y/o adenoma que en tejidos normales.

Protocolo de secuenciación Illumina

La secuenciación se llevó a cabo de acuerdo con el procedimiento recomendado por el Analizador de Genoma Illumina Iix, GAllx, software de colección de datos ver. 2.5, y softwares de análisis Pipeline ver. 1.5. En resumen, el procedimiento Illumina comprende a) preparación de una biblioteca a partir del ADN de la muestra por unión de marcadores de secuencia conocida que permitan la indexación, la unión a la celda de flujo, la amplificación, y la secuenciación; b) unión de la biblioteca a una superficie de celda de flujo; c) amplificación en puente para producir agrupamientos de fragmentos de ADN derivado de moléculas únicas, y d) secuenciación en la utilización de reacciones de extensión por cebador iterativo utilizando terminados reversibles marcados para determinar la secuencia de nucleótidos de cada agrupamiento de amplicones. Véase, por ejemplo, Bentley, y col, Nature 456, 53-59 (6 nov. 2008)/ [ido:10.1038/nature07517](https://doi.org/10.1038/nature07517) con procedimientos y datos suplementarios, incorporados en el presente documento por referencia. El uso de secuencias marcadoras únicas para la indexación permite el análisis de muestras múltiples en una única celda de flujo. Véase, por ejemplo, Craig, y col., Nat. Methods Nat Methods. 2008 oct.; 5(10):887-93 (Epub 14 sept. 2008), incorporado en el presente documento por referencia.

Conjunto de muestra: N = 82, compuesto de ADN de tejido extraído de 42 cánceres colorrectales, 31 adenomas pre-cancerosos y 9 de mucosa colónica normal.

Configuración de celda de flujo

Las muestras se indexaron a 12 por calle para un total de 7 calles. Una celda de flujo está compuesta por 8 calles, una de las cuales se dedica a un control de calidad phiX.

Preparación de biblioteca:

El ADN extraído del tejido de pacientes se trató con bisulfito y se llevó a cabo una amplificación en 2 etapas utilizando aproximadamente 10.000 copias genómicas del material inicial. La primera ronda utilizaba cebadores con cola (T1) (Illumina) específicos de las secuencias marcadoras. Estas colas eran secuencias derivadas de Illumina necesarias para la ronda dos. La segunda ronda (T2) (Illumina) la PCR utiliza cebadores específicos para las colas Illumina añadidas en T1, e incorpora el índice, el cebador de secuenciación, y la unión de secuencias a la celda de flujo. Durante la preparación de la biblioteca, se ejecutaron comprobaciones de qPCR múltiples en las muestras para asegurar representaciones equimolares de todos los amplicones de las bibliotecas.

Diseño de cebadores:

Se diseñaron cebadores directo e inverso específicos para las regiones con citosinas no CpG convertidas (utilizando, por ejemplo, software MethPrimer) para amplificar cada uno de los sitios de biomarcador específico de una manera específica de no metilación. Cuando las citosinas CpG no se evitan en el diseño de cebador, se utilizan mezclas degeneradas (C/T; G/A) los sitios en los cebadores. Si es necesario indagar secuencias adicionales fuera del amplicón primario, se pueden diseñar cebadores adicionales. Si las CpG de la secuencia diana no se pueden evitar, los cebadores pueden incorporar bases degeneradas en los sitios CpG (software BiSearch).

Los cebadores para la segunda ronda de PCR comprenden secuencias para la unión a la celda de flujo Illumina (sitios de amplificación en puente), secuenciación de sitios de cebador (para la lectura de muestras), sitios de índice, y sitios de cebadores de secuenciación (par la lectura de indexación). Cada uno de los conjuntos de cebador (x) tiene 12 marcas de índice diferentes, para un total de 12x conjuntos. Los conjuntos de cebador independientes del índice (n = x) se optimizan en ADN no metilado convertido (por ejemplo, ADN humano) y ADN metilado convertido. Por ejemplo, los ADN de control se amplifican, purifican, (por ejemplo, utilizando el tratamiento AMPURE (Agencourt)), y se ejecuta en un Bioanalizador 2100 Agilent para evaluar el tamaño y cantidad de los ácidos nucleicos amplificados.

Etapas experimentales:

Aislamiento de ADN y conversión con bisulfito:

- 1) Se extrajo el ADN y purificó a partir de los tejidos utilizando los kits DNAZOL (Invitrogen), o QIAAMP (Qiagen) y se midió la concentración y pureza por absorbancia (A230/A260/A280) utilizando un espectrofotómetro Nanodrop ND-1000 (Thermo Scientific). Se utilizó la fluorescencia PICOGREEN (Molecular Probes) en conjunción con el lector de placas TECAN F-200 (Tecan) para muestras altas que presentaban los valores A230 altos.
- 2) Se ajustaron las muestras a una concentración de al menos 200 ng/ul utilizando un concentrador por evaporación Speedvac (Thermo Scientific), según fuera necesario.
- 3) Para cada muestra, se trataron 2 ug de ADN con bisulfito utilizando las placas de 96 pocillos EPITECT (Qiagen).
- 4) Se evaluó la recuperación por absorbancia con fluorescencia OLIGOGREEN (Molecular Probes) y se evaluó la eficacia de conversión con una PCR cuantitativa utilizando cebadores no CpG que contenían citosina específicos para el ADN no convertido. Se determinó que la eficacia de conversión era mayor del 99 %.

Primera ronda de PCR:

5) Las 84 muestras se amplificaron en reacciones con 30 ng de ADN utilizando conjuntos de cebadores (T1) específicos del marcador. El número de ciclos utilizados eran específicos de cada conjunto marcador y se determinó empíricamente por las reacciones de control iniciales en ADN metilado y no metilado. El número de ciclos se fija aproximadamente a la media del valor calculado Ct.

Por ejemplo, se utilizaron los siguientes números de ciclos para los marcadores indicados:

- TFPI12; 26 ciclos
- SEPT9; 27 ciclos
- BMP3; 28 ciclos
- VIM; 28 ciclos
- EYA4; 29 ciclos

6) El producto amplificado de cada reacción se purificaron utilizando perlas AMPURE (Agencourt), con elución en tampón EB (Qiagen)

7) El producto de cada marcador se cuantificó por qPCR como se ha descrito anteriormente, utilizando un conjunto de cebadores T2. Las placas maestras se prepararon conteniendo cantidades iguales de cada biomarcador para cada muestra.

Segunda ronda de PCR:

8) Las muestras de la primera ronda se amplificaron entonces con 12 cebadores indexados T2.

9) El producto de cada reacción se purificó de nuevo y se midieron las concentraciones con qPCR, este tiempo con cebadores específicos de la celda de flujo y una curva de referencia creada utilizando una dilución en serie de ADN de control PhiX.

Preparación de la biblioteca final:

10) Las 12 columnas de cada placa se combinaron en 1 columna maestra en proporciones equimolares. 1 ul de cada biblioteca se cargó en un chip ADN de alta sensibilidad (Agilent) y se ejecutaron en el Bioanalizador. También se llevó a cabo una qPCR final en el LightCycler 480 (Roche) con las referencias PhiX.

11) Las bibliotecas se secuenciaron en el instrumento Illumina y los datos de secuencia obtenidos de cada marcador para cada muestra.

12) La media de metilación de cada sitio CpG se calculó para cada marcador de cada muestra. Véase las Figuras 2A-J.

13) Se calculó el porcentaje de moléculas metiladas en todos los loci CpG en un subconjunto definido del loci CpG en cada marcador para cada marcador de cada muestra. Véase las Figuras 5A-I.

Todas las publicaciones y patentes mencionados en la especificación anterior se incorporan en el presente documento por referencia. Distintas modificaciones y variaciones de los procedimientos y sistemas de la invención descritos serán aparentes para los expertos en la técnica sin alejarse del ámbito y espíritu de la invención. Aunque la invención se ha descrito en conexión con realizaciones específicas preferidas, se debería entender que la invención como se reivindica no debería limitarse indebidamente a dichas realizaciones específicas. Además, distintas modificaciones de los modos descritos para llevar a cabo la invención que son obvios para los expertos en los campos relevantes tienen la intención de estar en el ámbito de las siguientes reivindicaciones.

LISTADO DE SECUENCIAS

- <110> Ahlquist, David A.
- Taylor, William R.
- Zou, Hongzhi
- Lidgard, Graham P.

<120> ANÁLISIS DE SECUENCIA DIGITAL DE LA METILACIÓN DE ADN

<130> EXCT-31446/WO-1/ORD

<150> US 61/438.649
<151> 02-02-2011

<160> 15

<170> PatentIn versión 3.5

<210> 1
<211> 121

ES 2 686 309 T3

	<212> ADN		
	<213> <i>Homo sapiens</i>		
5	<400> 1		
	gaagagccca cctgtcagge tgcgctgggt cagcgcagca agtggggctg gcogetatct	60	
	cgctgcaccc ggcgcgctcc cgggctccgt gcgccctcgc cccagctggt ttggagtcca	120	
	a	121	
10	<210> 2		
	<211> 121		
	<212> ADN		
	<213> Artificial		
15	<220>		
	<223> Sintética		
	<400> 2		
	gaagagttta tttgttaggt tgtgttgggt tagtgtagta agtggggttg gttgttattt	60	
	tgttgtattt ggttgtgttt tgggttttgt gtgtttttgt tttagttggt ttggagtta	120	
	a	121	
20	<210> 3		
	<211> 121		
	<212> ADN		
	<213> Artificial		
25	<220>		
	<223> Sintética		
	<400> 3		
	gaagagttta tttgttaggt tgcgttgggt tagcgtagta agtggggttg gtcgttattt	60	
	cgttgtattc ggtcgcgctt cgggtttcgt gcgttttcgt tttagttggt ttggagtta	120	
30	a	121	
35	<210> 4		
	<211> 129		
	<212> ADN		
	<213> <i>Homo sapiens</i>		
	<400> 4		
	aaataaaaaac ggagtgggtc ccccgcgcgc cgccgcccc cgcgtccctg ggggctccc	60	
	ccgaggcccc cggcggcctc acgagcccc agtagccggt ggcgacgtcg cccccgcccc	120	
40	acctccccg	129	
45	<210> 5		
	<211> 132		
	<212> ADN		
	<213> Artificial		
	<220>		
	<223> Sintética		

ES 2 686 309 T3

	<400> 5	
	gttaaataaa aatggagtgg gttttttgtg tgttgttgtt ttttgtgttt ttggtggttt	60
	tttttgaggt ttttgggtgg tttatgagtt tgtagtagtt ggtgggtgatg ttgtttttgt	120
	tttatttttt tg	132
5	<210> 6 <211> 132 <212> ADN <213> Artificial	
10	<220> <223> Sintética	
15	<400> 6	
	gttaaataaa aacggagtgg gtttttcgcg cgtcgtcgtt tttcgcgttt ttggcggttt	60
	ttttcgaggt tttcggcgggt tttacgagtt cgtagtagtc ggtggcgacg ttcgttttcgt	120
	tttatttttt tg	132
20	<210> 7 <211> 99 <212> ADN <213> <i>Homo sapiens</i>	
	<400> 7	
	ggccgcagca gccagcccag caccacctt cgaagtccga aatgatccca tccagctgcg	60
25	cgttgaccgc ggggtccgac atgatggctg gtgggcagc	99
30	<210> 8 <211> 99 <212> ADN <213> Artificial	
	<220> <223> Sintética	
35	<400> 8	
	ggttgtagta gttagtttag tatttatttt tgaagtttga aatgatttta tttagttgtg	60
	tgttgattgt ggggtttgat atgatggttg gtgggtagt	99
40	<210> 9 <211> 99 <212> ADN <213> Artificial	
45	<220> <223> Sintética	
	<400> 9	

ES 2 686 309 T3

	ggtcgtagta gttagttag tatttatttt cgaagttcga aatgatttta ttagttgcg	60
	cgttgatcgc ggggttcgat atgatggtg gtgggtagc	99
5	<210> 10 <211> 116 <212> ADN <213> <i>Homo sapiens</i>	
	<400> 10	
	aggaggtgcg cggctttctg ctccagggcg cccgggtgcc cgctttatgc ggggcgagcg	60
10	tccggccgac ccccgccggg gccgagcctg aggggtggct gattcatgca cgggga	116
15	<210> 11 <211> 116 <212> ADN <213> Artificial	
20	<220> <223> Sintética	
	<400> 11	
	aggaggtgtg tggttttttg ttttaggtgg tttgggtggt tgttttatgt ggggtgagtg	60
	tttggttgat tttgttggg gtggagttg aggggtggtt gatttatgta tgggga	116
25	<210> 12 <211> 116 <212> ADN <213> Artificial	
30	<220> <223> Sintética	
	<400> 12	
	aggaggtgcg cggttttttg ttttaggcgg ttcgggtggt cgctttatgc ggggcgagcg	60
35	ttcggtcgat tttcgtcggg gccgagttg aggggtggtt gatttatgta cgggga	116
40	<210> 13 <211> 117 <212> ADN <213> <i>Homo sapiens</i>	
	<400> 13	
	caggtccgtg tccctcgtcct cctaccgcag gatgttcggc ggcccgggca ccgagagccg	60
	gccgagctcc agccggagct acgtgactac gtccaccocg acctacagcc tgggcga	117
45	<210> 14 <211> 117 <212> ADN <213> Artificial	
50	<220>	

ES 2 686 309 T3

<223> Sintética

<400> 14

taggtttgtg tttttgtttt tttattgtag gatgtttggt ggtttgggta ttgtgagttg 60

5

gttgagtttt agttggagtt atgtgattat gtttatttgt atttatagtt tgggtag 117

<210> 15

<211> 117

<212> ADN

10

<213> Artificial

<220>

<223> Sintética

15

<400> 15

taggttcgtg ttttcgtttt tttatcgtag gatgttcggc ggttcgggta tgcgcagtcg 60

gtcgcagtttt agtcgcgagtt acgtgattac gtttattcgt atttatagtt tgggtag 117

REIVINDICACIONES

1. Un procedimiento de selección de un subconjunto definido de loci CpG en un ácido nucleico marcador para su uso en un ensayo de detección de ácido nucleico que detecta la metilación coordinada de un subconjunto definido de loci CpG, en el que la metilación coordinada del subconjunto definido de loci CpG es indicativo de adenoma o cáncer, comprendiendo el procedimiento:
- a) la determinación del estado de metilación de una pluralidad de loci CpG en cada una de una pluralidad de copias individuales de un ácido nucleico marcador de una pluralidad de muestras normales;
 - b) la determinación del estado de metilación de dicha pluralidad de loci CpG en cada una de una pluralidad de copias individuales de dicho ácido nucleico marcador de una pluralidad de muestras de adenoma o una pluralidad de muestras de cáncer; en el que la pluralidad de copias individuales de dicho ácido nucleico marcador analizado en cada una de dichas muestras normales y dichas muestras de adenoma o cáncer comprende al menos 1.000;
 - c) la determinación de las relaciones de metilación de cada locus en dicha pluralidad de dichos loci CpG en dicho ácido nucleico marcador; en el que la determinación de dichas relaciones de metilación comprende la determinación de la relación entre la media de metilación en cada uno de dicha pluralidad de loci CpG en dichas muestras normales respecto a la media de metilación de cada locus CpG correspondiente en dicha pluralidad de loci CpG en dichas muestras de adenoma o cáncer;
 - d) la selección de un conjunto definido de loci CpG en dicho ácido nucleico marcador, en el que dicho conjunto definido de loci CpG comprende una pluralidad de loci CpG que tienen relaciones de metilación ventajosas que se correlacionan con adenoma o cáncer; y
 - e) la selección de un subconjunto definido de loci CpG de dicho conjunto definido, en el que dicho subconjunto definido de loci CpG comprende al menos tres loci CpG, y en el que dicho subconjunto definido se selecciona de manera que el porcentaje de copias individuales en dicho ácido nucleico marcador de dicha pluralidad de muestras normales que están metiladas en todos los dichos al menos tres loci CpG en dicho subconjunto definido es menor que el porcentaje de copias individuales de dicho ácido nucleico marcador de dicha pluralidad de muestras de adenoma o dichas muestras de cáncer que están metiladas en todos los dichos al menos tres loci CpG en dicho subconjunto definido.
2. El procedimiento de la reivindicación 1, en el que la pluralidad de copias individuales de un ácido nucleico marcador analizado en dichas muestras normales y de adenoma o cáncer comprende al menos 10.000, más preferentemente al menos 100.000.
3. El procedimiento de una cualquiera de la reivindicación 1 o la reivindicación 2, en el que la pluralidad de muestras normales y de adenoma o de cáncer comprende al menos 10, preferentemente al menos 25, más preferentemente al menos 100.
4. El procedimiento de una cualquiera de las reivindicaciones 1 a 3, en el que dicho conjunto definido de loci CpG comprende al menos cuatro loci CpG, preferentemente al menos cinco loci CpG.
5. El procedimiento de una cualquiera de las reivindicaciones 1 a 4, en el que dicha determinación del estado de metilación de dicha pluralidad de loci CpG comprende el tratamiento del ADN de dichas muestras con bisulfito.
6. El procedimiento de una cualquiera de las reivindicaciones 1 a 5, en el que dicha determinación del estado de metilación de dicha pluralidad de loci CpG comprende el análisis digital de dicha pluralidad de loci CpG en dicho ácido nucleico marcador.
7. El procedimiento de la reivindicación 6, en el que dicho análisis digital comprende al menos una secuenciación digital y una PCR digital.
8. El procedimiento de una cualquiera de las reivindicaciones 1 a 7, en el que dichas muestras de adenoma o cáncer comprenden muestras colorrectales.
9. Un procedimiento de detección de cáncer o adenoma en una muestra, que comprende la determinación del estado de metilación de cada locus CpG en un subconjunto definido de loci CpG seleccionados por el procedimiento de una cualquiera de las reivindicaciones 1-8 en al menos una molécula de ácido nucleico marcador de cáncer o adenoma, en el que la metilación de cada uno de dichos loci CpG en dicho subconjunto definido de loci CpG en dicha molécula de ácido nucleico marcador de cáncer o adenoma es indicativa de cáncer o adenoma en dicha muestra.
10. El procedimiento de la reivindicación 9, en el que dicho subconjunto definido de loci CpG comprende al menos cuatro loci CpG, preferentemente al menos cinco loci CpG.
11. El procedimiento de la reivindicación 9, en el que dicha determinación comprende el análisis de dichos loci CpG en un ensayo de detección de ácido nucleico configurado para determinar el estado de metilación de cada uno de dichos loci CpG en único un ensayo de detección de ácido nucleico.

12. El procedimiento de la reivindicación 9, en el que dicha determinación comprende el análisis de dichos loci CpG en un ensayo de detección de ácido nucleico configurado para determinar el estado de metilación de cada uno de dichos loci CpG en una única mezcla de reacción.
- 5 13. El procedimiento de la reivindicación 11, en el que dicho ensayo de detección de ácido nucleico comprende al menos un ensayo seleccionado de entre el grupo que consiste en un ensayo de extensión de cebador, un ensayo de amplificación de ácido nucleico, un ensayo de secuenciación de ácido nucleico, un ensayo de escisión específica de estructura, un ensayo de escisión de 5' nucleasa, un ensayo de escisión invasiva, y un ensayo de ligamiento.
- 10 14. El procedimiento de la reivindicación 9, en el que dicha al menos una molécula de ácido nucleico marcador de cáncer o adenoma se selecciona de entre el grupo que consiste en moléculas de ácido nucleico de vimentin, BMP3, Septin 9, TFPI2, 2 regiones de LRAT, y EYA4.
- 15 15. El procedimiento de la reivindicación 9, en el que dicho subconjunto definido de loci CpG comprende al menos un subconjunto definido de loci CpG seleccionado de entre el grupo que consiste en: los loci 37, 40, y 45 en una molécula de ácido nucleico de vimentin; los loci 34, 53, y 61 en una molécula de ácido nucleico de BMP3; los loci 59, 61, 68, y 70 en una molécula de ácido nucleico de septin 9; los loci 55, 59, 63, y 67 en una molécula de ácido nucleico de TFPI2; y los loci 31, 34, 37 y 44 en una molécula de ácido nucleico EYA4.

FIG. 1B



FIG. 2A

Vimentin										
CpG	26	37	40	45	52	54	59	63	74	
NORMAL										Media
8-4	11.63	6.08	6.62	5.52	3.05	2.31	3.44	3.66	3.88	4.98
8-5	6.92	3.4	2.97	1.26	1.19	0.5	2.61	0.97	1.14	2.33
8-6	12.25	8.92	5.06	4.01	2	2.45	2.27	3.44	5.21	5.07
8-7	15.74	9.41	5.7	6.72	3.73	5.26	5.92	4.29	4.46	6.80
8-8	6.48	2.52	2.71	2.72	4.26	3.14	1.67	2.67	2.84	3.22
8-9	5.65	2.48	1.27	1.48	1.5	0.87	1.7	2.02	3.18	2.24
8-10	5.36	2.77	1.09	2.84	2.09	0.85	1.89	1.97	2.55	2.38
8-11	7.5	2.65	2.34	1.66	4.9	4.84	1.71	3.5	3.04	3.57
8-12	5.91	5.12	3.52	1.91	2.53	2.27	1.84	1.86	1.58	2.95
Media	8.60444	4.81667	3.47556	2.90222	2.87222	2.49889	2.56111	2.70889	3.09778	3.73
										SD total
										2.68
										M+2SD
										9.09
										M+3SD
										11.77
CpG	26	37	40	45	52	54	59	63	74	
ADENOMA										Media
3-4	50.2	52.6	47	24.66	21.46	16.34	20.96	27.91	36.05	33.02
3-5	79.04	70.33	65.69	56.54	33.15	25.6	35.34	32.14	40.64	48.72
3-6	37.08	32.91	32.94	25.05	23.78	25.64	23.57	23.22	29.4	28.18
3-7	47.73	45.01	44.47	42.42	41.78	43.24	41.83	41.75	40.02	42.92
3-8	56.11	48.88	46.52	44.12	41.26	41.34	41.29	40.82	43.15	44.83
3-9	6.49	3.18	4.26	2.92	3.28	2.87	2.55	2.17	3.46	3.46
3-10	5.7	2.61	4.61	2.02	2.77	2.46	2.2	2.15	3.01	3.06
3-11	84.54	84.38	83.07	41.43	43.76	51.8	77.13	75.74	48.14	65.55
3-12	90.13	90.15	88.53	88.89	88.89	85.22	83.03	83.48	83.35	86.85
5-1	71.75	71.01	70.12	65.83	72.49	71.45	69.97	61.69	65.53	68.87
5-2	39.07	35.75	33.57	31.84	31.98	31.84	30.25	30.1	30.97	32.82
5-4	40.85	32.71	17.84	21.28	18.47	20.19	20.5	23.79	40.53	26.24
5-11	70.93	70.52	69.58	64.06	70.39	70.52	68.51	60.3	63.66	67.61
5-12	84.36	84.75	84.36	77.41	73.36	57.53	49.03	68.92	79.15	73.21
6-1	87.8	86.44	87.45	86.38	85.89	82.93	84.12	80.86	80.54	84.71
6-2	50.08	46.61	40.99	37.87	36.69	32.92	32.63	39.06	39.44	39.59
6-3	68.72	67.13	59.29	60.01	55.34	55.21	49.64	54.92	55.63	58.43
6-4	59.32	59.36	53.62	43.22	42.23	39.54	44.19	45.19	38.26	47.21
6-5	14.51	8.39	8.32	4.44	3.24	2.17	3.35	2.1	4	5.61
6-6	55.32	54.47	53.14	43.9	38.87	39.01	34.56	36.08	39.69	43.89
7-5	71.06	70.46	71.36	70.54	70.74	70.65	68.07	63.9	64.36	69.02
7-6	58.16	55.35	49.14	45.4	42.42	45.59	52.06	44.81	47.71	48.96
7-7	20.5	16.52	15.05	12.88	12	11.04	12.63	11.37	10.61	13.62
7-8	28.05	20.31	22.19	13.34	15.5	10.57	19.98	18.19	17.36	18.39
7-9	79.93	79.58	78.49	78.5	78.21	76.44	75.6	72.93	68.5	76.46
7-10	80.88	81.15	80.46	80.04	79.32	77.6	76.5	74.03	70.63	77.85
7-11	22.15	12.4	10.05	5.74	7.02	2.31	6.61	6.09	9.06	9.05
7-12	33.99	32.48	33.46	31.53	32.34	31.36	31.44	29.17	30.14	31.77
8-1	48.74	49.22	50.37	48.32	50.05	50.83	50.9	49.21	47.73	49.49
8-2	82.35	82.4	82.33	81.75	81.4	81.89	80.65	79.84	78.95	81.28
8-3	63.16	63.53	63.87	65.06	64.59	64.34	62.43	62.09	61.29	63.37
Media	54.4742	51.9545	50.0690	45.0771	43.9571	42.5303	43.5974	43.3555	44.2245	
N/M	0.15795	0.09271	0.06942	0.06438	0.06534	0.05876	0.05874	0.06248	0.07005	

FIG. 2B

Vimentin CpG	26	37	40	45	52	54	59	63	74	Media
CANCER										
1-1	55.95	46.38	39.19	39.35	39.25	38.19	30.93	26.81	33.13	38.80
1-2	46.07	48.21	39.2	26.64	33.32	21.46	34.99	27.12	35.62	34.74
1-3	36.4	23.79	25.7	5.9	6.22	4.63	4.54	4.83	6.72	13.19
1-4	80.52	66.55	81.59	80.93	80.51	81.01	79.67	70.78	76.98	77.62
1-5	86.12	85.72	85.71	85.99	85.66	86.21	84.61	81.46	82.86	84.93
1-6	76.07	75.26	76.89	75.46	74.46	75.74	74.47	70.81	57.16	72.92
1-7	11.26	13.06	26.2	7.2	5.52	2.47	3.57	2.68	3.34	8.37
1-8	3.24	2.4	3.04	3.05	3.85	2.63	4.58	3.05	2.85	3.19
1-9	91.73	91.67	90.09	90.59	91.4	87.87	88.51	72.29	75.96	85.69
1-10	91.81	91.44	90.57	91.05	91.41	88.25	88.74	71.95	75.29	86.72
1-11	96.17	95.74	94.21	85.46	66.31	55.84	45.36	53.05	55.95	72.01
1-12	81.45	70.09	58.61	49.52	40.5	39.07	40.96	34.12	29.02	49.26
2-1	3.2	2.71	2.37	2.63	4.47	1.65	3.08	2.32	2.89	2.81
2-2	27.81	27.74	28.16	24.33	27.01	26.02	25.55	19.5	21.84	25.33
2-3	50.74	50.46	50.99	50.06	50.1	50.5	48.51	47.2	46.41	49.44
2-4	49.58	48.5	49.13	42.19	48.89	40.01	47.42	35.7	43.83	45.03
2-5	5.4	3.66	3.69	3.1	3.06	2.56	2.54	2.58	4.21	3.42
2-6	39.3	39.04	39.7	38.55	39.38	38.32	37.14	36.43	36.53	38.28
2-7	55.16	54.9	54.89	54.26	55.2	55.07	54.09	51.47	51.4	54.05
2-8	62.61	62.07	63.43	61.37	62.91	62.71	62.75	58.15	57.97	61.55
2-9	5.64	4.28	1.97	2.06	3.81	2.26	6.47	2.86	2.97	3.59
2-10	4.96	3.92	1.36	1.52	3.48	2.24	5.74	1.94	2.31	3.05
2-11	68.03	67.01	59.74	66.53	38.15	64.62	65.4	57.5	61.65	64.29
2-12	60.01	47.56	57	32.01	44.13	40.93	33.52	30.48	45.93	43.51
3-2	45.95	45.94	46.16	45.91	45.76	46.43	44.81	43.34	42.49	45.20
5-3	30.38	29.55	29.08	28.84	30.73	30.97	28.13	27.42	28.37	29.27
5-5	29.85	17.44	6.57	7.31	3.29	3.22	2.62	2.62	5.57	8.72
5-6	9.19	15.6	3.9	4.11	10.38	3.48	3.23	9.96	13.16	8.00
5-7	52.6	51.71	39.08	34.92	25.56	28.83	38.34	45.32	49.14	40.50
5-8	21.65	20.69	20.69	19.08	22.4	21.76	21.76	19.51	19.4	20.77
5-9	44.3	42.83	43.32	39.74	44.14	41.53	28.83	39.41	40.88	40.55
5-10	43.44	41.51	42.53	40.36	42.76	40.94	28.62	37.06	39.34	39.62
6-7	91.08	90.06	90.06	90.28	89.75	90.85	88.49	84.97	85.04	88.95
6-8	65.53	62.59	59.24	59.03	51.16	50.98	53.92	58.67	60.01	57.90
6-9	7.35	4.62	4.49	2.5	3.93	4.24	5.55	4.66	8.91	5.14
6-10	5.56	3.22	4.2	1.36	2.97	2.07	3.03	2.9	7.64	3.66
6-11	66.81	65.15	64.79	64.41	67.47	63.55	64.79	60.5	61.13	64.29
6-12	68.38	63.74	45	34.86	35.79	25.68	31.84	25.16	33.91	40.48
7-1	63.71	61.07	60.24	55.62	56.07	57.06	45.3	48.45	49.69	55.25
7-2	49.63	41.8	31.28	30.46	23.63	28.56	15.68	23.23	24.1	29.60
7-3	61.72	60.06	60.77	60.47	60.53	60.58	59.07	57.15	55.66	59.56
7-4	83.11	82.56	77.6	81.19	67.36	56.23	74.45	56.05	69.23	71.98
Media	48.3210	45.7690	44.1055	40.9619	40.7781	38.6957	38.3476	35.9871	38.2260	
N/M	0.17807	0.10524	0.07880	0.07085	0.07044	0.06458	0.06679	0.07527	0.08104	

FIG. 2C

BMP3							
CpG	34	53	61	70	74	Media	
NORMAL							
8-4	3.25	3.26	2.83	3.22	2.92	3.06	
8-5	2.37	2.3	1.4	1.88	2.21	2.03	
8-6	3.18	1.59	2.69	2.09	2.37	2.38	
8-7	3.78	4.15	0.84	2.35	1.84	2.59	
8-8	3.99	2.95	2.9	2.91	4.26	3.40	
8-9	5.49	3.69	1.71	3.03	3.65	3.51	
8-10	5.29	3.44	0.02	0.06	0.11	1.78	
8-11	4.22	2.92	2.82	2.65	2.51	3.02	
8-12	2.98	3.23	2.71	1.64	1.98	2.51	
Media	3.83889	3.05889	1.96889	2.20333	2.42778	2.70	
						50 total	1.18
						M+2SD	5.05
						M+3SD	6.23
CpG	34	53	61	70	74	Media	
ADENOMA							
3-4	2.33	3.14	3.61	2.69	4.13	3.18	
3-5	19.45	8	4	2.88	4.25	7.72	
3-6	17.33	14.18	13.48	15.42	17.16	15.51	
3-7	45.19	46.07	41.96	41.15	41.66	43.21	
3-8	9.43	4.4	3.57	6.31	6.61	6.06	
3-9	5.04	4.75	3.42	3.29	3.1	3.92	
3-10	5.32	4.02	3.39	2.71	1.73	3.43	
3-11	4.77	3.54	3.99	12.56	3.79	5.73	
3-12	5.63	3.77	4.42	6.87	5.14	5.17	
5-1	87.27	85.28	84.85	83.63	86.85	85.58	
5-2	34.33	32.92	25.52	31.5	28.84	30.62	
5-4	8.5	2.83	2.75	4.72	3.95	4.55	
5-11	30.56	23.64	15.75	20.94	18.2	21.82	
5-12	9.12	15.55	22.11	23.91	10.78	16.29	
6-1	90.01	88.79	88.48	88.95	88.02	88.85	
6-2	3.22	3.38	3.03	2.23	3.28	3.03	
6-3	82.39	80.24	80.21	79.47	80.87	80.64	
6-4	2.98	2.51	2.52	2.34	3.17	2.70	
6-5	2.8	2.51	2.02	2.46	2.61	2.48	
6-6	26.76	25.01	23.53	24.17	24.84	24.86	
7-5	41.72	40.49	40.45	39.64	40.58	40.58	
7-6	72.74	70.9	66.24	68.78	70.47	69.83	
7-7	14.78	14.42	13.32	13	12.37	13.58	
7-8	18.74	15.98	11.73	6.85	6.02	11.86	
7-9	20.44	21.31	20.56	19.66	20.77	20.55	
7-10	16.24	13.64	12.34	16.49	15.25	14.79	
7-11	5.49	3.8	3.88	8.94	3.31	5.09	
7-12	27.12	27.51	27.26	26.17	26.11	26.83	
8-1	56.1	55.54	55.85	56.41	56.4	55.86	
8-2	82.63	81.89	81.36	82.11	80.68	81.73	
8-3	1.36	2.08	0.67	2.7	2.4	1.84	
Media	27.4126	25.8742	24.7184	25.7726	24.9142		
N/M	0.14004	0.11822	0.07965	0.08549	0.09745		

FIG. 2D

BMP3							
CpG	34	53	61	70	74		
CANCER						Media	
1-1	4.1	3.27	2.75	2.48	2.97	3.11	
1-2	2.51	2.26	1.79	1.69	1.79	2.01	
1-3	3.93	2.97	2.67	2.33	3.2	3.02	
1-4	3.03	5.87	6.21	6.31	6.12	5.51	
1-5	84.92	84.93	84.66	84.32	84.63	84.69	
1-6	69.86	68.52	68.6	68.14	69.27	68.88	
1-7	4.12	2.89	2.73	3.84	3.19	3.35	
1-8	3.57	2.38	3	1.77	2.7	2.68	
1-9	46.41	30.05	14.12	5.5	5.4	20.30	
1-10	45.95	28.29	12.83	4.28	3.9	19.05	
1-11	3.71	6.67	4.29	4.63	16.61	7.18	
1-12	3.68	3.03	2.44	2.2	2.58	2.79	
2-1	2.8	2.42	1.17	1.05	2.17	1.96	
2-2	3.54	2.31	2.53	1.19	2.37	2.51	
2-3	47.85	47.99	46.97	46.63	46.65	47.22	
2-4	21.33	4.65	3.75	2.92	3.23	7.18	
2-5	74.6	74.29	73.31	74.06	74.61	74.17	
2-6	43.55	43.4	42.74	42.2	42.68	42.91	
2-7	57.93	57.12	56.09	56.29	56.34	56.75	
2-8	20.14	6	3.12	4.79	4.2	7.65	
2-9	84.2	83.37	82.82	82.49	83.03	83.18	
2-10	83.9	82.79	82.46	82.14	82.69	82.80	
2-11	60.49	57.84	63.95	61.56	63.87	61.54	
2-12	4.53	2.96	2.4	2.63	3.37	3.18	
3-2	52.98	52.28	52.39	52.08	52.32	52.41	
5-3	27.71	31.07	25.97	27.23	21.08	26.61	
5-5	21.21	17.74	17	13.13	13.84	16.58	
5-6	4.02	2.82	2.56	1.47	2.25	2.62	
5-7	3.07	5.48	5.09	3.07	2.63	3.87	
5-8	37.56	36.21	34.38	35.91	36.51	36.11	
5-9	9.87	9.23	3.47	5.94	4.84	6.67	
5-10	8.23	8.55	3.47	3.54	4.44	5.65	
6-7	87.32	85.77	86.05	85.91	86.14	86.24	
6-8	48.14	52.49	48.07	49.61	48.67	49.40	
6-9	3.81	2.96	2.49	1.99	2.75	2.80	
6-10	3.32	2.1	1.88	1.48	2.68	2.29	
6-11	36.92	55.67	54.4	54.85	53.99	51.17	
6-12	15.79	14.37	13.98	13.37	14.73	14.45	
7-1	2.37	2.63	2.21	2.07	2.63	2.38	
7-2	3.5	2.31	3.04	3.24	3.77	3.17	
7-3	64.11	63.08	63.22	62.45	63.17	63.21	
7-4	4.82	2.5	3.03	2.53	2.49	3.07	
Media	28.9381	27.4650	25.9548	25.3645	25.8881		
N/M	0.13266	0.11137	0.07586	0.08687	0.09378		

FIG. 2E

Septins							
CpG	31	38	59	61	68	70	
NORMAL							Media
8-4	4.33	4.68	3.65	3.4	3.05	2.99	3.61
8-5	5.81	5.22	3.28	2.55	2.56	2.62	3.77
8-6	9.7	8.48	6.03	5.02	5.4	3.5	6.36
8-7	25.07	23.83	15.73	15.38	12.7	7.3	16.67
8-8	9.6	9.34	7.07	7.68	7.06	5.31	7.68
8-9	2.93	3.79	2.85	2.19	2.67	2	2.74
8-10	2.95	3.94	2.72	3.17	3.03	2.33	2.94
8-11	9.91	10.36	7.98	6.95	6.22	4.78	7.70
8-12	7.37	8.04	5.18	3.9	3.49	3.71	5.28
Media	8.63000	8.63111	6.06556	5.58222	5.13111	3.78889	6.30
							SD total 5.06
							M+2SD 16.42
							M+3SD 21.47
CpG	31	38	59	61	68	70	
ADENOMA							Media
3-4	71.21	71.25	67.4	67.63	70.36	70.48	69.72
3-5	78.85	78.62	78.74	79.41	78.69	77.51	78.64
3-6	47.45	47.25	47.36	46.33	45.52	43.7	46.27
3-7	54.28	54.19	53.89	54.5	52.93	51.27	53.51
3-8	82.73	80.42	82.52	83.81	81.98	83.04	82.42
3-9	59.76	59.11	59.97	59.88	59.03	59.65	59.57
3-10	59.64	59.13	60.14	60.14	59.08	59.62	59.63
3-11	81.43	80.79	81.85	82.38	81.68	81.7	81.64
3-12	87.2	87.14	87.78	85.16	87.49	86.78	86.93
5-1	81.86	81.66	82.4	81.83	81.39	82.63	81.96
5-2	58.22	58.48	57.93	56.61	55.53	52.77	56.59
5-4	90.56	89.44	91.06	90.32	89.35	89.37	90.02
5-11	82.52	81.57	82.17	82.04	80.93	80.54	81.63
5-12	87.76	87.67	88.6	87.5	87.52	83.04	87.02
6-1	88.48	88.58	88.91	88.89	88.14	87.99	88.50
6-2	54.02	53.55	52.96	51.62	51.85	49.39	52.23
6-3	75.28	74.77	75.14	74.75	73.85	70.73	74.09
6-4	66.87	67.68	66.53	55.84	46.89	43.19	57.83
6-5	39.2	39.97	29.71	29.79	24.9	18.71	30.38
6-6	46.52	46.87	47.66	46.69	46.41	43.43	46.26
7-5	71.84	71.15	71.81	71.76	71.65	70.46	71.45
7-6	67.38	67.19	66.38	67.37	67.74	65.9	66.99
7-7	39.96	39.74	40.16	38.96	38.06	35.38	38.71
7-8	76.27	73.19	78.23	77.87	70.99	55.35	71.98
7-9	82.36	81.58	82.87	80.95	81.01	79.39	81.36
7-10	82.1	81.35	83.09	81.42	80.71	79.28	81.33
7-11	79.96	79.14	76.53	75.27	74.93	63.99	74.97
7-12	28.03	27.75	28.58	28.03	27.64	27.52	27.93
8-1	47.19	46.29	48.75	47.99	47.07	47.31	47.43
8-2	78.05	78.32	78.79	79.02	77.53	78.26	78.33
8-3	73.6	73.1	73.21	73.63	72.92	73.09	73.26
Media	68.4058	67.9658	68.1006	67.3352	66.2506	64.2410	67.0498
N/M	0.12616	0.12699	0.08907	0.08290	0.07745	0.05898	0.09403

FIG. 2F

CoG	Septin9						Media
	31	38	59	61	66	70	
CANCER							
1-1	74.24	74.37	74.74	69.16	73.67	69.78	72.66
1-2	64.3	63.59	64.48	63.97	64.03	64.55	64.15
1-3	78.49	77.13	77.94	75.03	76.7	75.33	76.77
1-4	76.88	76.83	61.04	77.26	77.25	76.34	74.27
1-5	83.22	82.77	82.91	83.1	78.22	81.8	82.00
1-6	72.72	72.6	73.26	73.34	72.55	72.53	72.83
1-7	58.64	58.8	59.5	59.02	57.95	58.03	58.66
1-8	41.04	41.59	42.34	39.9	39.31	31.59	39.30
1-9	87.69	87.79	87.9	85.22	87.34	86.76	87.12
1-10	87.52	88.04	88.3	85.78	87.66	87.37	87.45
1-11	93.45	93.07	83.24	92.82	92.33	92.82	91.29
1-12	54.85	51.7	55.46	53.56	51.61	48.36	52.59
2-1	59.5	59.92	61.38	60.56	58.72	56.88	58.49
2-2	52.9	57.7	53.1	57.04	57.76	46.02	54.09
2-3	49.88	49.46	50.03	50.05	48.88	49.32	49.61
2-4	45.75	46.15	46.94	47	46.06	29.99	43.65
2-5	65.13	65.64	67.05	67.26	66.23	66.47	66.30
2-6	20.94	20.51	20.35	19.83	20.44	9.66	18.62
2-7	47.93	46.04	41.52	41.4	36.64	39.59	42.19
2-8	68.51	68.14	69.55	69.26	68.23	68.64	68.72
2-9	75.02	73.17	56.65	75.24	71.97	75.17	71.20
2-10	74.22	72.24	56.32	74.72	73	74.53	70.51
2-11	37.38	38.85	24.02	14.56	10.66	5.93	21.90
2-12	59.19	58.71	59.1	58.62	55.6	54.69	57.65
3-2	46.5	46.36	47.19	48.3	45.89	45.97	46.70
5-3	47.82	48.26	49.38	48.05	48.32	48.3	48.36
5-5	30.03	28.6	30.72	27.46	28.69	29.34	29.14
5-6	64.74	65.65	65.21	60.89	64.87	65.19	64.43
5-7	57.61	58.27	59.96	58.38	58.15	54.59	57.83
5-8	30.81	30.44	32.62	31.11	31.36	31.13	31.25
5-9	57.09	57.39	58.38	57.84	56.92	57.5	57.52
5-10	56.43	56.72	58.5	57.27	56.35	56.66	56.99
6-7	86.96	86.4	81.86	86.91	86.55	84.06	85.46
6-8	61.93	60.83	61.43	62.11	62.02	62.04	61.73
6-9	55.17	54.87	55.62	55.64	55.6	55.37	55.38
6-10	54.31	54.02	54.91	54.51	54.35	54.33	54.41
6-11	2.04	2.13	3.89	3.2	2.29	2.48	2.67
6-12	75.22	75.08	76.44	76.09	75.94	76.3	75.85
7-1	63.33	63.35	63.77	63.97	62.75	59.07	62.71
7-2	63.88	62.96	64.86	63.63	63.36	62.23	63.49
7-3	73.04	73.06	73.73	74.34	73.65	73.43	73.54
7-4	75.73	77.28	76.63	79.06	79.23	79.13	77.84
Media	60.2864	60.1548	58.8624	59.5824	58.9786	57.4593	
N/M	0.14315	0.14348	0.10305	0.09369	0.08700	0.06594	

FIG. 2G

CpG	28	33	41	50	55	59	63	67	74	
NORMAL										Media
8-4	16.8	11.72	18.34	15.92	14.43	12.65	20.44	11.46	10.88	14.74
8-5	10.4	6.72	10.5	9.92	8.66	8.57	14.69	7.26	6.75	9.27
8-6	5.78	3.74	5.21	5.57	4.66	5.04	7.19	2.99	4.17	4.93
8-7	7.42	3.99	6.42	6.28	5.29	4.82	8.15	3.56	3.07	5.44
8-8	5.19	3.55	3.84	3.46	2.28	2.69	5.08	2.4	2.54	3.45
8-9	9.18	6.49	10.3	7.05	6.96	6.93	11.24	4.29	4.52	7.44
8-10	9.2	5.94	10.48	7.21	6.49	6.71	11.22	4.83	4.22	7.37
8-11	8.32	3.01	5.69	6.61	3.66	4.03	6.71	3.07	3.07	4.91
8-12	5.23	3.81	5.83	4.96	3.17	2.96	7.42	3.75	2.28	4.38
Media	8.61333	5.44111	8.51222	7.44222	6.17778	6.08444	10.23778	4.84444	4.61111	6.88
									SDtotal	3.86
									M+2SD	14.61
									M+3SD	18.47
CpG	28	33	41	50	55	59	63	67	74	
ADENOMA										Media
3-4	66.66	49.94	65.74	66.29	59.94	62.71	64.28	48.29	30.53	57.15
3-5	77.23	76.12	77.55	76.96	75.45	73.61	76.39	72.7	71	75.22
3-6	41.89	36.35	40.76	40.97	40.56	38.13	40.11	37.77	34.48	39.00
3-7	52.43	48.78	52.34	53.57	50.9	49.98	52.74	47.83	44.76	50.37
3-8	80.17	79.31	79.2	79.83	79.76	77.16	76.28	78.09	64.06	77.10
3-9	41.24	39.22	40.04	40.87	40.69	40.06	39.84	39.23	39.04	40.03
3-10	39.75	37.16	38.59	39.38	39.06	38.61	38.26	37.68	36.9	38.39
3-11	84.09	81.71	83.36	83.58	83.66	82.34	81.57	82.53	80.87	82.63
3-12	86.28	75.8	86.62	87.69	78.28	79.03	86.59	79.89	58.94	79.90
5-1	78.42	77.48	78.38	73.72	77.69	76.86	72.05	75.7	70.17	75.61
5-2	59.47	53.62	57.42	53.97	55.91	55.91	54.51	52.46	50.29	54.84
5-4	91.15	91.11	92.16	87.49	91.68	86.88	86	90.22	89.08	89.53
5-11	73.27	70.21	70.36	68.17	69.56	68.83	66.21	69.63	69.41	69.52
5-12	78.05	75.39	84.77	80.16	80.59	83.95	78.32	83.67	83.63	80.95
6-1	86.13	84.43	85.44	85.9	85.74	83.62	83.43	84.01	82.29	84.55
6-2	52.6	48.51	50.23	51.37	50.91	48.11	50.74	48.74	47.62	48.87
6-3	71.67	68.75	70.6	70.04	70.4	67.48	69.53	67.59	64.92	69.00
6-4	53.89	27.64	52.9	53.58	47.65	29	48.93	48.09	39.87	44.62
6-5	18.96	10.51	19.35	14.32	13.37	12.03	19.15	7.52	6.76	13.55
6-6	52.19	48.46	50.11	50.18	50.03	47.91	49.4	47.35	40.79	48.49
7-5	57.72	56.03	57.33	57.64	57.01	55.73	56.81	55.51	53.79	56.40
7-6	52.68	49.32	51	50.35	50.47	48.95	48.43	49.85	49.02	50.01
7-7	25.22	18.22	21.12	20.96	19.79	18.46	22.15	16.57	15.59	19.79
7-8	33.85	15.37	23.72	19.92	27.03	37.42	54.82	30.88	33.69	30.74
7-9	73.9	59.02	70.99	65.87	66.99	61.66	71.3	62.11	56.11	65.33
7-10	71.51	56.26	68.66	63.4	64.27	58.32	69.59	60.46	55.45	63.10
7-11	63.86	52.6	68.02	62.26	55.02	53.43	67.1	48.71	39.43	56.71
7-12	26.9	21.82	25.75	26.12	26.72	24.49	27.01	22.98	22.07	24.87
8-1	39.67	36.94	38.87	39.82	38.12	37.04	39.47	36.65	35.48	38.01
8-2	4.39	2.77	3.43	9.4	3.36	4.15	5.24	5.01	4.29	4.67
8-3	18.38	6.67	3.77	8.39	7.12	8.05	22.38	3.59	7.32	9.52
Media	56.5684	50.1781	55.1155	54.2635	53.4752	51.9326	55.4397	51.3326	47.6661	
N/M	0.15226	0.10844	0.15444	0.19715	0.11553	0.11659	0.18467	0.09437	0.09674	

FIG. 2H

CpG	TFPI2									
	28	33	41	50	55	59	63	67	74	
CANCER										Media
1-1	75.92	73.75	76.91	76.98	76.89	75.12	74.58	75.44	71.99	75.29
1-2	60.7	58.48	59.83	60.11	59.24	58.56	58.47	58.39	58.02	59.09
1-3	69.4	67.39	69.05	69.3	69.58	66.17	67.34	67.9	66.92	68.12
1-4	84.99	82.51	85.32	85.75	83.16	80.99	83.51	54.26	56.55	77.45
1-5	80.24	78.4	79.98	77.16	79.53	79.17	78.2	72.3	76.71	77.97
1-6	72.82	70.18	72.1	72.34	72.46	71.33	70.86	69.43	69.23	71.18
1-7	56.49	13.25	31.78	55.62	33.25	30.17	54.09	28.23	32.74	37.29
1-8	32.13	20.84	30.98	32.68	33.26	30.28	30.66	29.42	29.77	30.00
1-9	89.35	86.99	84.73	89.13	88.76	87.47	86.92	87.1	60.92	84.60
1-10	88.63	86.02	83.65	88.27	87.98	86.9	86.05	86.28	60.23	83.78
1-11	70.4	12.47	93.04	93.91	75.62	91.84	90.9	64.22	18.62	67.89
1-12	67	65.56	66.77	66.96	66.98	65.79	64.81	64.2	64.96	65.89
2-1	15.11	11.81	12.62	12.17	13.99	11.93	12.78	12.63	11.69	12.75
2-2	28.93	6.35	10.73	33.33	17.12	15.95	30.68	8.02	7.15	17.58
2-3	45.41	43.39	44.33	44.06	44.47	43.25	42.52	43.4	42.42	43.69
2-4	45.2	42.77	44.85	45.04	45.13	43.42	43.83	41.69	35.59	43.06
2-5	63.22	51.49	65.06	65.35	65.29	63.52	63.19	62.25	52.05	61.27
2-6	31.68	28.87	29.77	30.31	30.84	29.71	29.63	29.67	29.19	29.96
2-7	45.62	43.81	44.36	44.25	41.67	43.54	43.71	42.12	41.39	43.39
2-8	64.7	62.61	63.61	63.79	57.58	60.84	60.93	62.33	58.59	61.66
2-9	75.87	71.86	75.47	74.9	75.49	71.68	71.42	74.03	73.19	73.77
2-10	72.47	68.98	72.08	71.33	72.4	68.8	67.93	70.49	69.81	70.48
2-11	59.41	50.01	64.27	64.23	56.2	58.22	60.85	58.34	39.90	56.83
2-12	50.9	45.83	56.05	55.83	52.73	51.94	54.45	52.23	48.45	52.05
3-2	43.69	40.73	43.07	42.99	42.94	43.01	42.86	40.76	40.71	42.30
5-3	38.56	30.45	42.56	40.53	35.54	34.59	40.19	36.63	28.62	36.41
5-5	61.12	56.82	57.86	54.72	56.43	56.68	54.83	50.89	54.88	56.02
5-6	53.8	48.22	59.5	38.46	17.73	19.02	28.45	18.28	13.88	33.04
5-7	63.5	60.54	61.93	58.59	62.75	60.84	58.35	58.15	58.39	60.34
5-8	22.3	19.7	19.36	18.14	20.25	18.93	19.06	19.85	19.06	19.52
5-9	52.64	51.06	52.01	48.3	50.75	49.65	47.16	46.77	49.25	49.73
5-10	49.62	48.7	48.35	45.2	48.18	47.48	46.33	44.56	46.76	47.24
6-7	84.49	83.96	84.44	83.97	84.53	79.72	81.88	82.5	81.27	82.97
6-8	52.41	45.12	51.33	50.98	50.21	49.08	50.3	45.16	39.78	48.26
6-9	34.12	12.99	37.31	25.11	14.81	25.65	37.63	14.79	31.82	26.03
6-10	34.11	12.42	36.31	23.71	13.2	24.85	37.09	14.15	31.6	25.27
6-11	61.62	30.74	60.7	61.09	59.77	59.31	58.74	59.47	58.63	56.67
6-12	57.77	42.67	65.73	64.01	62.69	63.07	64.1	61.68	49.37	59.01
7-1	62.23	60.07	61.28	61.27	62.01	57.54	59.89	60.22	59.01	60.39
7-2	38.32	36.07	41.16	40.3	38.66	33.41	39.09	37.17	35.3	37.72
7-3	55.98	53.42	54.54	54.6	54.66	53.01	53.42	53.37	51.96	53.88
7-4	76.63	56.91	76.83	76.78	57.28	71.59	73.28	65.43	54.48	67.69
Media	56.8919	48.4098	56.4669	56.2250	53.1431	53.1910	55.2610	50.5743	47.1645	
N/M	0.15140	0.11240	0.15075	0.13237	0.11625	0.11364	0.18526	0.09579	0.09777	

FIG. 21

EYA4													
CpG	27	29	31	34	37	44	46	55	65	74			
NORMAL											Media		
8-4	7.95	3.92	5.81	15.44	11.76	10	11.72	14.57	6.23	6.67	9.41		
8-5	0.52	0.72	5.76	3.59	0.23	2.35	3.48	0.41	2.95	0.38	2.04		
8-6	2.46	2.56	2.74	2.51	2.84	0.1	2.47	3.88	2.24	2.18	2.40		
8-7	27.16	27.12	7.42	26.64	26.48	4	4.06	10.23	23.1	25.77	18.20		
8-8	3.46	6.25	0.63	5.31	5.58	6.13	9.73	4.37	4.21	10.11	5.58		
8-9	1.55	1.81	0.51	1.55	1.55	0.23	0.26	1.66	6.07	8.5	2.37		
8-10	0.18	0.7	0.37	0.2	0.18	0.17	0.42	0.18	1.71	7.13	1.12		
8-11	14.45	9.34	8.79	11.49	11.46	8.65	3.08	8.6	2.32	10.83	8.90		
8-12	3.31	3.92	2.34	8.86	2.6	4.66	2.22	9.79	0.06	1.56	3.93		
Media	6.78222	6.26000	3.81889	8.39889	6.96444	4.03222	4.16000	5.96556	5.43222	8.12556	5.99		
											SD total	6.64	
												M+2SD	19.27
												M+3SD	25.90
CpG	27	29	31	34	37	44	46	55	65	74			
ADENOMA											Media		
3-4	42.34	7.34	13.95	15.1	34.99	13.74	20.19	23.02	14.87	25.63	21.11		
3-5	75.62	55.47	57.53	79.82	76.73	47.75	54.51	49.28	29.16	62.02	58.79		
3-6	94.03	94.1	93.31	90.55	87.59	92.01	88.36	66.23	38.32	65.91	81.04		
3-7	95.43	96.07	95.59	95.71	95.27	92.45	93.84	89.14	68.37	72.86	89.47		
3-8	95.86	86.62	49.24	95.35	79.12	96.8	94.79	92.04	63.24	70.73	82.38		
3-9	14.55	23.73	32.45	24.76	18.23	11.68	13.59	23.67	8.92	47.61	21.94		
3-10	13.57	23.23	29.82	21.68	16.82	10.17	13.21	21.92	7.26	44.63	20.23		
3-11	97.79	98.59	97.25	97.61	62.96	94.67	96.87	43.46	62.52	84.91	85.67		
3-12	65.73	63.48	64.89	71.19	67.65	69.9	72.69	81.74	39.26	68.67	66.52		
5-1	90.16	93.09	89.89	95.48	81.65	33.24	91.22	76.6	56.12	76.33	78.38		
5-2	83.81	71.43	60.95	87.62	79.52	27.62	79.52	58.1	45.71	66.19	66.05		
5-4	28.96	38.8	27.69	64.66	61.75	13.3	38.62	14.57	17.93	48.45	34.97		
5-11	94.41	94.41	92.31	97.2	90.91	28.32	76.92	66.08	39.86	80.07	76.05		
5-12	98.79	96.76	91.09	97.17	91.9	11.74	58.3	25.51	36.44	86.64	69.43		
6-1	95.63	96.8	96.26	96.51	94.84	94.08	96.72	89.85	67	71.73	89.94		
6-2	89.62	87.37	86.95	88.6	83.53	86.34	83.06	93.31	52.22	62.18	80.32		
6-3	97	96.79	95.1	96.68	95.73	95.3	94.9	82.6	59.33	71.11	88.45		
6-4	47.71	28.77	29.19	83.03	38.35	14.73	24.06	15.42	5.76	29.73	31.68		
6-5	15.49	7.45	9.53	20.3	13.44	8.9	5.48	15.51	6.9	11.4	11.44		
6-6	85.06	85.26	84.76	85.88	84.14	85.08	84.83	79.57	64.17	63.75	80.25		
7-5	93.98	94.73	95.05	92.77	94.15	92.06	90.95	87.51	60.32	65.65	86.72		
7-6	92.4	93	92.47	92.76	83.21	91.36	87.67	86.05	63.1	64.39	84.64		
7-7	61.1	61.34	59.78	65.15	62.99	59.16	60.7	52.74	37.07	44.69	56.47		
7-8	17	11.63	8.37	25.03	17.31	5.2	4.95	12.33	3.31	50.91	15.60		
7-9	80.91	74.06	77.26	82.16	76.42	76.69	77.13	72.52	52.25	65.57	73.50		
7-10	77	71.06	70.81	78.33	72.76	78.15	74.08	69.86	51.78	64.53	70.84		
7-11	0.53	0.84	9.01	2.12	16.04	6.46	9.41	8.97	12.98	22.93	8.93		
7-12	73.35	76.12	76.18	71.6	75.34	74.97	76.41	64.9	42.94	51.83	68.36		
8-1	89.74	89.94	90.16	89.41	89.4	89.69	88.58	74.41	70.39	76.14	84.80		
8-2	96.69	96.5	98.29	97.88	92.95	97.53	97.08	79.52	75.3	83.15	91.49		
8-3	89.79	93.92	94.97	94.28	71.33	59.43	61.38	34.46	42.65	55.09	69.73		
Media	70.7758	68.0194	66.7774	74.0771	68.6142	56.7265	64.8426	56.1645	41.6274	59.8526			
N/M	0.09583	0.09203	0.05719	0.11338	0.10150	0.07108	0.06416	0.10622	0.13050	0.13576			

FIG. 2J

CoG	EYA4											
	27	29	31	34	37	44	46	55	65	74	Media	
CANCER												
1-1	95.77	95.43	95.77	96.12	90.26	94.76	94.95	72.84	67.49	82.09	88.55	
1-2	91.26	92.07	92.65	93.03	91.62	91.94	91.19	69.82	62.06	79.13	85.48	
1-3	95.81	96.96	96.22	95.96	94.14	96.56	94.2	80.24	62.51	77.93	89.05	
1-4	96.31	95.85	97.08	96.12	87.07	94.71	76.53	36.85	36.16	69.45	78.61	
1-5	97.36	97.86	97.2	97.58	97.13	97.41	97.29	84.8	65.65	81.89	91.47	
1-6	94.33	95.64	95.97	95.08	92.67	95.52	93.72	69.51	72.14	82.97	88.76	
1-7	18.72	9.23	9.21	53.23	36.24	14.01	44.41	58.09	7.14	13.19	26.35	
1-8	46.66	30.42	29.64	59.15	24.97	19.9	15.52	10.52	31.39	67.42	33.56	
1-9	96.11	94.22	93.91	97.09	90.15	93.97	93.78	73.93	73.3	67.96	87.44	
1-10	96.21	94.28	93.99	97.24	91.01	94.45	94.19	73.8	72.18	70.03	87.74	
1-11	98.77	97.62	97.6	96.75	97.25	98.23	96.89	93.56	41.81	78.11	89.66	
1-12	91.41	91.71	92.15	92.58	91.12	91.65	69.38	67.07	55.93	78.28	82.13	
2-1	19.91	21.85	20.02	19.4	20.66	18.45	19.59	16.34	12.97	12.04	18.12	
2-2	33.9	37.54	33.6	35.41	26.72	32.37	30.33	25.69	12.73	21.64	28.99	
2-3	87.09	85.4	86.41	87.06	70.66	82.49	87.01	52.21	38.48	67.66	74.45	
2-4	81.28	84.94	84.36	84.62	81.79	75.22	67.07	18.47	8.36	20.2	60.63	
2-5	95.51	84.65	89.45	97.75	96.96	89.4	93.64	71.6	60.1	71.7	85.08	
2-6	89.64	90.39	92	89.4	86.3	86.95	89.9	78.41	50.98	66.56	81.99	
2-7	87.95	83.38	87.88	86.33	79.7	62.37	74.51	58.32	41.49	63.64	72.56	
2-8	88.93	79.13	74.75	91.49	78.51	87.98	88.76	67.95	49.06	66.23	77.28	
2-9	96.63	96.37	96.75	95.33	94.76	91.66	91.7	82.93	62.73	69.07	87.79	
2-10	96.23	96.18	96.45	95.35	94.09	91.68	92.03	84.12	62.29	68.48	87.69	
2-11	78.21	91.62	93.38	82.83	80.84	89.21	86.42	47.49	19.08	55.01	72.41	
2-12	78.92	77.21	65.25	88.2	87.17	48.02	48.4	43.86	32.71	55.41	62.52	
3-2	83.19	83.33	85.51	87.83	84.07	85.4	83.93	72.44	38.71	62.51	76.69	
5-3	75	77.63	73.03	76.97	65.13	21.71	66.45	14.47	8.55	28.29	50.72	
5-5	76.69	89.83	90.89	79.24	49.15	28.39	67.37	31.78	19.07	40.04	57.25	
5-6	84.14	66.9	82.76	80.69	60.69	18.62	65.52	26.9	13.79	33.1	53.31	
5-7	83.85	83.08	85	83.46	76.54	29.23	84.23	41.92	30.38	70	66.77	
5-8	59.34	63.74	62.09	68.13	56.59	23.08	62.09	39.01	27.47	46.7	50.82	
5-9	82.26	85.35	86.38	84.32	80.21	29.56	81.23	18.25	26.74	74.29	64.86	
5-10	78.22	81.24	81.41	80.57	78.06	25.46	79.23	18.76	23.95	71.36	61.83	
6-7	96.25	97.94	97.18	96.54	94.24	95.22	96.77	90.47	68.78	71.86	90.53	
6-8	75.42	60.15	66.23	85.35	70.66	76.79	71.49	67.79	49.75	59.12	68.28	
6-9	74.63	72.85	75.4	77.97	75.44	66.67	58.5	43.07	8.53	12.99	56.61	
6-10	72.13	68.52	70.34	73.37	69.14	63.44	53.88	42.34	6.23	11.98	53.14	
6-11	90.57	91.22	90.96	88.64	90.51	87.87	90.7	78.51	60.18	62.03	83.12	
6-12	81.63	94.2	95.03	93.02	79.24	89.94	88.49	58.09	32.59	53.01	76.52	
7-1	95.77	93.81	90.2	96.4	94.38	94.6	93.33	85.21	55.69	65.68	86.51	
7-2	69.02	62.6	67.89	67.45	67.11	63.19	61.07	42.99	27.53	29.84	55.87	
7-3	87.53	87.41	85.13	87.34	86.47	85.59	86.17	77.97	56.43	57.76	79.78	
7-4	96.06	96.57	94.2	94.28	78.02	15.36	26.08	27.32	17.28	53.07	59.82	
Media	81.3005	80.3886	80.7457	83.9207	77.0824	67.5960	74.9510	55.1343	39.7569	56.8981		
N/M	0.08342	0.07787	0.04730	0.10008	0.09035	0.05965	0.05550	0.10820	0.13664	0.14281		

FIG. 3A

Media del porcentaje de metilación de todas las bases individuales					
Normal	Vim	BMP3	Septin 9	TFP12	EYA4
8-4	4,98	3,06	3,61	14,74	9,41
8-5	2,33	2,03	3,77	9,27	2,04
8-6	5,07	2,38	6,36	4,93	2,40
8-7	6,80	2,59	16,67	5,44	18,20
8-8	3,22	3,40	7,68	3,45	5,58
8-9	2,24	3,51	2,74	7,44	2,37
8-10	2,38	1,78	2,94	7,37	1,12
8-11	3,57	3,02	7,70	4,91	8,90
8-12	2,95	2,51	5,28	4,38	3,93
MED	3,73	2,70	6,30	6,88	5,99
SD	2,68	1,18	5,06	3,86	6,64
M+2SD	9,09	5,05	16,42	14,61	19,27
M+3SD	11,77	6,23	21,47	18,47	25,90

FIG. 3B

Corte	11,77	6,23	20,45	18,47	25,90
Adenom.	Vim	BMP3	Septin 9	TFPI2	EYA4
3-4	33,02	3,18	69,72	57,15	21,11
3-5	48,72	7,72	78,64	75,22	58,79
3-6	28,18	15,51	46,27	39,00	81,04
3-7	42,92	43,21	53,51	50,37	89,47
3-8	44,83	6,06	82,42	77,10	82,38
3-9	3,46	3,92	59,57	40,03	21,94
3-10	3,06	3,43	59,63	38,38	20,23
3-11	65,55	5,73	81,64	82,63	85,67
3-12	86,85	5,17	86,93	79,90	66,52
5-1	68,87	85,58	81,96	75,61	78,38
5-2	32,82	30,62	56,59	54,84	66,05
5-4	26,24	4,55	90,02	83,53	34,97
5-11	67,61	21,82	81,63	69,52	76,05
5-12	73,21	16,29	87,02	80,95	63,43
6-1	84,71	88,85	88,50	84,55	89,94
6-2	39,59	3,03	52,23	49,87	80,32
5-3	58,43	80,64	74,09	69,00	88,45
6-4	47,21	2,70	57,83	44,62	31,68
6-5	5,61	2,48	30,38	13,55	11,44
6-6	43,89	24,86	46,26	48,49	80,25
7-5	69,02	40,58	71,45	56,40	86,72
7-6	48,96	69,83	66,99	50,01	84,64
7 7	13,62	13,58	38,71	19,79	56,47
7-8	18,39	11,86	71,98	30,74	15,60
7-9	76,46	20,55	81,36	65,33	73,50
7-10	77,85	14,79	81,33	63,10	70,84
7-11	9,05	5,08	74,97	56,71	8,93
7-12	31,77	26,83	27,93	24,87	68,36
8-1	49,49	55,86	47,43	38,01	84,80
8-2	81,28	81,73	78,33	4,67	91,49
8-3	63,37	1,84	73,26	9,52	69,73
	87,10	61,29	100,00	90,32	80,65
				100	

FIG. 3C

Cáncer	Vim	BMP3	Septin 9	TFPI2	EYA4
1-1	38,80	3,11	72,66	75,29	88,55
1-2	34,74	2,01	64,15	59,09	85,48
1-3	13,19	3,02	76,77	68,12	89,05
1-4	77,62	5,51	74,27	77,45	78,61
1-5	84,93	84,69	82,00	77,97	91,42
1-6	72,92	68,88	72,83	71,18	88,76
1-7	8,37	3,35	58,66	37,29	26,35
1-8	3,19	2,68	39,30	30,00	33,56
1-9	86,69	20,30	87,12	84,60	87,44
1-10	86,72	19,05	87,45	83,78	87,74
1-11	72,01	7,18	91,29	67,89	89,66
1-12	49,26	2,79	52,59	65,89	82,13
2-1	2,81	1,96	58,49	12,75	18,12
2-2	25,33	2,51	54,09	17,53	28,99
2-3	49,44	47,22	49,61	43,69	74,45
2-4	45,03	7,18	43,65	43,06	60,63
2-5	3,42	74,17	66,30	61,27	85,08
2-6	38,28	42,91	18,62	29,96	81,99
2-7	54,05	56,75	42,19	43,39	72,56
2-8	61,55	7,65	68,72	61,66	77,28
2-9	3,59	83,18	71,20	73,77	87,79
2-10	3,05	82,80	70,51	70,48	87,69
2-11	64,29	61,54	21,90	56,83	72,41
2-12	43,51	3,18	57,65	52,05	62,52
3-2	45,20	52,41	46,70	42,30	76,69
5-3	29,27	26,61	48,36	36,41	50,72
5-5	8,72	16,58	29,14	56,02	57,25
5-6	8,00	2,62	64,43	33,04	53,31
5-7	40,50	3,87	57,83	60,34	66,77
5-8	20,77	36,11	31,25	19,52	50,82
5-9	40,55	6,67	57,52	49,73	64,86
5-10	39,62	5,65	56,99	47,24	61,83
6-7	88,95	86,24	85,46	82,97	90,53
6-8	57,90	49,40	61,73	48,26	68,28
6-9	5,14	2,80	55,38	26,03	56,61
6-10	3,66	2,29	54,41	25,27	53,14
6-11	64,29	51,17	2,67	56,67	83,12
6-12	40,48	14,45	75,85	59,01	76,52
7-1	55,25	2,38	62,71	60,39	86,51
7-2	29,60	3,17	63,49	37,72	55,87
7-3	59,56	63,21	73,54	53,88	79,78
7-4	71,98	3,07	77,84	67,69	59,82
	76,19	57,14	95,24	95,24	97,62
Vim, BMP, Sep, TFPI2				100	

FIG. 3D

		Dilución de veinte veces				
		Con una especificidad del 97,5 % (+2SD de la media)				
Corte		Vim	BMP3	Septin 9	TFPI2	
	Adenom.	9,09	5,05	15,73	14,61	19,27
	3-4	5,38	2,88	9,79	9,74	7,05
	3-5	6,16	3,09	10,24	10,64	8,93
	3-6	5,14	3,48	8,62	8,33	10,05
	3-7	5,87	4,86	8,98	9,40	10,47
	3-8	5,97	3,00	10,43	10,74	10,11
	3-9	3,90	2,90	9,28	8,88	7,09
	3-10	3,88	2,87	9,29	8,80	7,01
	3-11	7,00	2,99	10,39	11,01	10,28
	3-12	8,07	2,96	10,65	10,88	9,32
	5-1	7,17	6,98	10,40	10,66	9,91
	5-2	5,37	4,23	9,13	9,62	9,30
	5-4	5,04	2,93	10,81	11,31	7,74
	5-11	7,11	3,79	10,39	10,36	9,80
	5-12	7,39	3,51	10,66	10,33	9,47
	6-1	7,96	7,14	10,73	11,13	10,49
	6-2	5,71	2,85	8,92	9,37	10,01
	6-3	6,65	6,73	10,01	10,33	10,42
	6-4	6,09	2,83	9,20	9,1	7,58
	6-5	4,01	2,82	7,82	7,51	6,57
	6-6	5,92	3,94	3,6	9,3,1	10,01
	7-5	7,18	4,73	9,88	9,70	10,33
	7-6	6,17	6,19	9,65	9,35	10,23
	7-7	4,41	3,38	8,24	7,8	8,82
	7-8	4,65	3,29	9,90	8,42	6,77
	7-9	7,55	3,73	10,37	10,15	9,67
	7-10	7,62	3,44	10,37	10,04	9,54
	7-11	4,18	2,95	10,05	9,72	6,44
	7-12	5,31	4,04	7,70	8,12	9,41
	8-1	6,20	5,49	8,68	8,78	10,23
	8-2	7,79	6,79	10,22	7,11	10,57
	8-3	6,90	2,79	9,97	7,36	9,48
		0,00	12,90	0,00	0,00	
	Vim, BMP, Sep, TFP12				12,90	

FIG. 3E

Dilución de 20 veces					
Con una especificidad del 97,5 % (+2SD de la media)					
Cáncer	Vim	BMP3	Septin 9	TFPI2	EYA4
	5,67	2,86	9,94	10,64	10,42
	5,46	2,80	9,51	9,83	10,27
	4,39	2,85	10,14	10,29	10,45
	7,61	2,37	10,02	10,75	9,92
	7,97	6,93	10,40	10,78	10,56
	7,37	6,14	9,95	10,44	10,43
	4,14	2,87	9,24	8,74	7,31
	3,89	2,83	8,27	8,38	7,67
	8,06	3,71	10,66	11,11	10,37
	8,06	3,65	10,68	11,07	10,38
	7,33	3,06	10,87	10,28	10,48
	6,19	2,84	8,93	10,18	10,10
	3,87	2,80	9,23	7,52	6,90
	4,99	2,82	9,01	7,76	7,44
	6,20	5,06	8,79	9,07	9,72
	5,98	3,06	8,49	9,03	9,03
	3,90	6,41	9,62	9,94	10,25
	5,64	4,85	7,24	8,38	10,09
	6,43	5,54	8,41	9,05	9,62
	6,80	3,08	9,74	9,96	9,86
	3,91	6,86	9,86	10,57	10,38
	3,88	6,84	9,83	10,40	10,38
	6,94	5,78	7,40	9,72	9,61
	5,90	2,86	9,19	9,48	9,12
	5,99	5,32	8,64	9,00	9,83
5-3	5,19	4,03	8,72	8,70	8,53
5-5	4,16	3,53	7,76	9,68	8,86
5-6	4,13	2,83	9,53	8,53	8,66
5-7	5,75	2,89	9,20	9,90	9,33
5-8	4,76	4,51	7,87	7,86	8,54
5-9	5,75	3,03	9,18	9,37	9,24
5-10	5,71	2,98	9,15	9,24	9,09
	8,17	7,01	10,58	11,03	10,52
	6,62	5,17	9,39	9,29	9,41
	3,98	2,84	9,07	8,18	8,82
	3,91	2,81	9,03	8,14	8,65
	6,94	5,26	6,44	9,71	10,15
	5,75	3,42	10,10	9,83	9,82
	6,49	2,82	9,44	9,90	10,32
	5,21	2,86	9,48	8,77	8,79
	6,70	5,86	9,98	9,57	9,98
	7,33	2,85	10,20	10,26	8,99
	0,00	23,81	0,00	0,00	0,00
	Vim, BMP, Sep, TFPI2			23,81	

FIG. 3F

Dilución de 10 veces					
Con una especificidad del 97,5 % (+2SD de la media)					
Corte	9,09	5,05	15,73	14,61	19,27
Adenom.	Vim	BMP3	Septin 9	TFPI2	EYA4
3-4	7,03	3,02	13,28	12,60	8,10
3-5	8,60	3,47	14,17	14,40	11,87
3-6	6,54	4,25	10,93	10,78	14,10
13-7	8,02	7,02	11,66	11,92	14,94
3-8	8,21	3,31	14,55	14,59	14,23
3-9	4,07	3,09	12,26	10,88	8,19
3-10	4,03	3,04	12,27	10,72	8,02
3-11	10,28	3,27	14,47	15,14	14,56
3-12	12,41	3,22	15,00	14,87	12,65
5-1	10,61	11,26	14,50	14,44	13,83
5-2	7,01	5,76	11,96	12,36	12,60
5-4	6,35	3,15	15,31	15,83	9,49
5-11	10,49	4,88	14,47	13,83	13,60
5-12	11,05	4,33	15,01	14,98	12,94
6-1	12,20	11,58	15,15	15,34	14,99
6-2	7,69	3,00	11,53	11,87	14,03
6-3	9,57	10,76	13,71	13,78	14,84
6-4	8,45	2,97	12,09	11,34	9,16
6-5	4,29	2,95	9,34	8,24	7,14
6-6	8,12	5,19	10,93	11,73	14,02
7-5	10,63	6,76	13,45	12,52	14,67
7-6	8,62	9,68	13,00	11,88	14,46
7-7	5,09	4,06	10,18	8,86	11,64
7-8	5,57	3,89	13,50	9,95	7,55
7-9	11,37	4,75	14,44	13,41	13,34
7-10	11,51	4,18	14,44	13,19	13,08
7-11	4,63	3,21	13,80	12,55	6,89
7-12	6,90	5,38	9,10	9,37	12,83
8-1	8,67	8,29	11,05	10,68	14,47
8-2	11,85	10,87	14,14	7,35	15,14
8-3	10,06	2,88	13,63	7,83	12,97
	38,71	35,48	0,00	16,13	0,00
	Vim, BMP, Sep, TFPI2				61,29

FIG. 3G

		Dilución de diez veces				
		Con una especificidad del 97,5 % (+2SD de la media)				
Cáncer	Vim	BMP3	Septin 9	TFPI2	EYA4	
	7,61	3,01	13,57	14,41	14,85	
	7,20	2,90	12,72	12,79	14,54	
	5,05	3,00	13,98	13,69	14,90	
	11,49	3,25	13,73	14,63	13,86	
	12,22	11,17	14,51	14,68	15,14	
	11,02	9,59	13,59	14,00	14,87	
	4,56	3,03	12,17	10,61	8,63	
	4,05	2,97	10,23	9,88	9,35	
	12,40	4,73	15,02	15,34	14,74	
	12,40	4,60	15,05	15,26	14,77	
	10,93	3,42	15,43	13,67	14,96	
	8,65	2,38	11,56	13,47	14,21	
	4,01	2,90	12,15	8,16	7,81	
	5,26	2,95	11,71	8,64	8,89	
	8,67	7,42	11,27	11,25	13,44	
	8,23	3,42	10,67	11,19	12,06	
	4,07	10,12	12,93	13,01	14,50	
	7,55	6,99	8,17	9,88	14,19	
	9,13	8,37	10,52	11,22	13,25	
	9,88	3,46	13,18	13,05	13,72	
	4,09	11,02	13,43	14,26	14,77	
	4,03	10,98	13,36	13,93	14,76	
	10,16	8,85	8,49	12,56	13,23	
	8,08	3,02	12,07	12,09	12,25	
	8,25	7,94	10,97	11,11	13,66	
5-3	6,65	5,36	11,14	10,52	11,07	
5-5	4,60	4,36	9,22	12,48	11,72	
5-6	4,53	2,36	12,75	10,18	11,33	
5-7	7,78	3,09	12,09	12,91	12,67	
6-8	5,80	6,31	9,43	8,83	11,08	
5-9	7,78	3,37	12,06	11,85	12,48	
5-10	7,69	3,26	12,00	11,60	12,18	
	12,62	11,32	14,85	15,18	15,05	
	9,52	7,64	12,48	11,71	12,82	
	4,24	2,98	11,84	9,48	11,65	
	4,09	2,93	11,75	9,41	11,31	
	10,16	7,82	6,57	12,55	14,31	
	7,77	4,14	13,89	12,78	13,65	
	9,25	2,94	12,58	12,92	14,64	
	6,69	3,02	12,65	10,65	11,58	
	9,68	3,02	13,66	12,27	13,97	
	10,92	3,01	14,09	13,65	11,98	
	35,71	38,10	0,00	11,90	0,00	
	Vim, BMP, Sep, TFPI2			54,76		

FIG. 5A

Metilación de secuencia específica identificada						
		Vim	BMP3	SEPTINS	TFPI2	EYA4
	loci CpG:	37,40,45	34,53,61	59,61,68,7	55,59,63,6	31,34,37,44
Normal						
8-4		1.20%	0.18%	0.56%	5.46%	3.17%
8-5		0.20%	0.38%	0.71%	3.28%	0.03%
8-6		1.89%	0.02%	0.78%	0.74%	0.00%
8-7		1.62%	0.02%	3.77%	0.84%	3.85%
8-8		0.14%	0.01%	1.19%	0.13%	0.39%
8-9		0.01%	0.01%	0.07%	0.82%	0.09%
8-10		0.04%	0.01%	0.13%	0.91%	0.09%
8-11		0.30%	0.12%	1.52%	0.72%	8.49%
8-12		0.47%	0.12%	0.29%	0.05%	0.06%
Media (M)		0.65%	0.10%	1.00%	1.44%	1.80%
Desv. Típ.		0.72%	0.12%	1.14%	1.77%	2.92%
M+2SD		2.10%	0.34%	3.29%	4.99%	7.63%
M+3SD		2.82%	0.46%	4.43%	6.76%	10.55%

FIG. 5B

Corte	2.82%	0.46%	4.43%	6.76%	10.55%
Adenoma	Vim	BMP3	Septin9	TFPI2	EYA4
3-4	19.12%	0.24%	60.96%	39.99%	2.07%
3-5	47.82%	0.90%	72.27%	63.44%	32.24%
3-6	21.85%	9.52%	39.62%	30.89%	84.77%
3-7	39.45%	37.77%	47.14%	39.66%	89.11%
3-8	39.08%	0.01%	77.07%	67.72%	43.89%
3-9	0.39%	0.28%	55.75%	32.78%	1.43%
3-10	0.03%	0.01%	55.92%	32.13%	0.38%
3-11	39.51%	0.03%	77.15%	76.22%	77.21%
3-12	85.15%	0.01%	78.97%	58.54%	54.28%
5-1	61.69%	81.06%	76.07%	64.28%	27.66%
5-2	26.34%	17.95%	47.65%	43.47%	16.19%
5-4	11.27%	0.00%	82.45%	74.81%	3.10%
5-11	61.64%	10.99%	74.59%	56.30%	24.83%
5-12	71.24%	2.97%	79.10%	68.40%	9.72%
6-1	83.10%	85.08%	84.48%	76.31%	87.64%
6-2	34.40%	0.42%	44.25%	41.48%	76.82%
6-3	52.37%	77.20%	65.30%	60.22%	89.49%
6-4	37.43%	0.07%	34.06%	24.61%	2.53%
6-5	1.08%	0.04%	10.43%	2.12%	0.69%
6-6	41.40%	21.23%	39.83%	41.53%	80.47%
7-5	57.63%	37.63%	65.54%	48.68%	87.49%
7-6	40.21%	64.61%	61.84%	44.09%	80.73%
7-7	9.25%	10.03%	31.53%	11.86%	51.79%
7-8	11.07%	6.96%	50.61%	11.99%	0.34%
7-9	75.10%	14.42%	72.15%	46.46%	59.02%
7-10	76.96%	7.90%	70.54%	42.87%	53.10%
7-11	3.41%	0.08%	52.03%	30.58%	0.39%
7-12	29.62%	23.60%	23.02%	17.75%	69.49%
8-1	45.04%	52.53%	42.61%	32.02%	88.68%
8-2	80.42%	78.85%	73.17%	0.36%	88.99%
8-3	61.90%	0.01%	69.09%	2.59%	52.72%
Sensibilidad:					
	90.32	58.06	100.00	90.32	70.97
vim,BMP3, Sep,TFPI2				100.00%	

FIG. 5C

Cancer	Vim	BMP3	Septin9	TFPI2	EYA4
1-1	33.41%	0.13%	61.92%	67.12%	85.88%
1-2	17.84%	0.06%	59.03%	52.16%	88.01%
1-3	1.73%	0.04%	63.33%	59.72%	89.63%
1-4	64.08%	0.31%	57.10%	45.72%	82.91%
1-5	82.75%	81.13%	71.85%	66.21%	94.37%
1-6	72.60%	65.31%	67.97%	64.34%	90.24%
1-7	1.69%	0.09%	53.46%	18.01%	1.48%
1-8	0.56%	0.27%	26.22%	23.61%	5.03%
1-9	87.66%	10.27%	80.69%	81.23%	84.91%
1-10	88.29%	8.62%	81.50%	80.11%	85.49%
1-11	82.28%	0.03%	78.50%	43.16%	92.99%
1-12	42.32%	0.10%	38.16%	58.35%	88.08%
2-1	0.49%	0.14%	45.78%	8.88%	17.68%
2-2	22.24%	0.13%	36.09%	1.25%	24.55%
2-3	48.22%	25.78%	45.63%	38.24%	64.23%
2-4	40.22%	0.78%	26.66%	35.78%	66.08%
2-5	1.11%	69.66%	62.58%	55.66%	80.10%
2-6	37.83%	41.05%	6.66%	25.54%	78.18%
2-7	52.55%	53.57%	28.93%	34.27%	55.18%
2-8	58.40%	0.88%	62.42%	48.36%	62.57%
2-9	0.59%	80.67%	51.00%	64.49%	85.96%
2-10	0.05%	79.46%	53.89%	61.26%	85.68%
2-11	56.80%	50.96%	0.75%	41.21%	65.12%
2-12	28.56%	0.15%	49.26%	39.41%	38.51%
3-2	43.57%	49.35%	43.20%	36.53%	80.82%
5-3	26.24%	15.25%	45.03%	20.39%	17.11%
5-5	1.95%	13.60%	19.90%	40.01%	12.29%
5-6	1.18%	0.04%	56.10%	2.94%	15.86%
5-7	27.04%	0.22%	51.50%	49.43%	23.85%
5-8	17.47%	31.72%	26.88%	12.76%	18.68%
5-9	38.11%	0.64%	53.60%	38.45%	26.48%
5-10	38.54%	0.32%	52.75%	36.60%	23.79%
6-7	86.89%	83.13%	74.34%	72.65%	89.23%
6-8	51.90%	36.83%	56.44%	38.21%	52.14%
6-9	1.38%	0.48%	52.25%	4.93%	60.58%
6-10	0.67%	0.09%	51.43%	4.31%	56.33%
6-11	57.37%	32.79%	0.50%	51.88%	84.25%
6-12	28.81%	11.47%	72.27%	51.57%	72.63%
7-1	48.16%	0.22%	53.59%	52.32%	86.00%
7-2	22.43%	0.05%	56.56%	26.31%	48.93%
7-3	58.13%	60.11%	70.26%	47.15%	78.31%
7-4	73.59%	0.21%	72.36%	42.14%	8.20%
Sensibilidad					
	73.81	57.14	97.62	90.48	92.86
vim bmp3, sep, TFPI2				100.00%	

FIG. 5D

Dilución de veinte veces					
con una especificidad del 97,5 % (+2SD de la media)					
Corte	2.10%	0.34%	3.29%	4.99%	7.63%
Adenoma	Vim	BMP3	Septin9	TRPI2	EYA4
3-4	1.61%	0.11%	4.05%	3.44%	1.90%
3-5	3.04%	0.14%	4.61%	4.61%	3.41%
3-6	1.74%	0.57%	2.98%	2.98%	6.04%
3-7	2.62%	1.98%	3.36%	3.42%	6.25%
3-8	2.60%	0.10%	4.85%	4.82%	3.99%
3-9	0.67%	0.11%	3.79%	3.08%	1.87%
3-10	0.65%	0.10%	3.80%	3.04%	1.82%
3-11	2.63%	0.10%	4.86%	5.25%	5.66%
3-12	4.91%	0.10%	4.95%	4.36%	4.51%
5-1	3.73%	4.15%	4.80%	4.65%	3.18%
5-2	1.97%	0.99%	3.38%	3.61%	2.61%
5-4	1.21%	0.10%	5.12%	5.18%	1.95%
5-11	3.73%	0.65%	4.73%	4.25%	3.04%
5-12	4.21%	0.25%	4.96%	4.86%	2.28%
6-1	4.81%	4.35%	5.23%	5.25%	6.18%
6-2	2.37%	0.12%	3.21%	3.51%	5.64%
6-3	3.27%	3.96%	4.27%	4.45%	6.27%
6-4	2.52%	0.10%	2.70%	2.67%	1.93%
6-5	0.70%	0.10%	1.52%	1.54%	1.83%
6-6	2.72%	1.16%	2.99%	3.51%	5.82%
7-5	3.53%	1.98%	4.28%	3.87%	6.17%
7-6	2.66%	3.33%	4.09%	3.64%	5.83%
7-7	1.11%	0.60%	2.58%	2.03%	4.39%
7-8	1.20%	0.44%	3.53%	2.04%	1.82%
7-9	4.41%	0.82%	4.61%	3.76%	4.75%
7-10	4.50%	0.49%	4.53%	3.58%	4.45%
7-11	0.82%	0.10%	3.60%	2.97%	1.82%
7-12	2.13%	1.28%	2.15%	2.32%	5.27%
8-1	2.90%	2.72%	3.13%	3.04%	6.23%
8-2	4.67%	4.04%	4.66%	1.46%	6.25%
8-3	3.75%	0.10%	4.46%	1.57%	4.43%
	Sensibilidad				
	67.74	54.84	74.19	6.45	0.00
	v+B+S+TRPI2			96.77%	

FIG. 5E

Dilución de veinte veces					
con una especificidad del 97,5 % (+2SD de la media)					
Cancer	Vim	BMP3	Septin9	TFPI2	EYA4
1-1	2.32%	0.10%	4.10%	4.79%	6.09%
1-2	1.54%	0.10%	3.95%	4.05%	6.20%
1-3	0.74%	0.10%	4.17%	4.42%	6.28%
1-4	3.85%	0.11%	3.86%	3.72%	5.94%
1-5	4.79%	4.15%	4.59%	4.75%	6.52%
1-6	4.28%	3.36%	4.40%	4.65%	6.31%
1-7	0.73%	0.10%	3.67%	2.34%	1.87%
1-8	0.68%	0.11%	2.31%	2.62%	2.05%
1-9	5.03%	0.61%	5.04%	5.50%	6.04%
1-10	5.06%	0.53%	5.08%	5.44%	6.07%
1-11	4.76%	0.10%	4.93%	3.59%	6.45%
1-12	2.77%	0.10%	2.91%	4.35%	6.20%
2-1	0.67%	0.10%	3.29%	1.88%	2.68%
2-2	1.76%	0.10%	2.81%	1.50%	3.03%
2-3	3.06%	1.39%	3.28%	3.35%	5.01%
2-4	2.66%	0.14%	2.33%	3.23%	5.10%
2-5	0.71%	3.58%	4.13%	4.22%	5.80%
2-6	2.54%	2.15%	1.33%	2.71%	5.71%
2-7	3.28%	2.78%	2.45%	3.15%	4.56%
2-8	3.57%	0.14%	4.12%	3.86%	4.93%
2-9	0.68%	4.13%	3.55%	4.66%	6.10%
2-10	0.65%	4.07%	3.70%	4.50%	6.08%
2-11	3.49%	2.64%	1.04%	3.50%	5.05%
2-12	2.08%	0.10%	3.46%	3.41%	3.72%
3-2	2.83%	2.56%	3.16%	3.26%	5.84%
5-3	1.96%	0.86%	3.25%	2.46%	2.65%
5-5	0.75%	0.78%	2.00%	3.44%	2.41%
5-6	0.71%	0.10%	3.81%	1.58%	2.59%
5-7	2.00%	0.11%	3.58%	3.91%	2.99%
5-8	1.52%	1.68%	2.34%	2.08%	2.73%
5-9	2.56%	0.13%	3.68%	3.36%	3.12%
5-10	2.58%	0.11%	3.64%	3.27%	2.99%
6-7	4.99%	4.25%	4.72%	5.07%	6.26%
6-8	3.25%	1.94%	3.82%	3.35%	4.41%
6-9	0.72%	0.12%	3.61%	1.68%	4.83%
6-10	0.68%	0.10%	3.57%	1.65%	4.62%
6-11	3.52%	1.74%	1.03%	4.03%	6.01%
6-12	2.09%	0.67%	4.61%	4.02%	5.43%
7-1	3.06%	0.11%	3.68%	4.05%	6.10%
7-2	1.77%	0.10%	3.83%	2.75%	4.24%
7-3	3.56%	3.10%	4.51%	3.79%	5.71%
7-4	4.33%	0.11%	4.62%	3.54%	2.21%
Sensibilidad					
	59.52	45.24	69.05	4.76	0.00
vim bmp3, sep, TFPI2				97.62%	

FIG. 5F

Dilución de diez veces					
con una especificidad del 97,5 % (+2SD de la media)					
Corte	2.10%	0.34%	3.29%	4.99%	7.63%
Adenoma	Vim	BMP3	Septin9	TFPI2	EYAA
3-4	2.56%	0.12%	7.10%	5.44%	2.01%
3-5	5.43%	0.19%	8.23%	7.78%	5.02%
3-6	2.84%	1.05%	4.96%	4.53%	10.28%
3-7	4.60%	3.87%	5.71%	5.40%	10.71%
3-8	4.56%	0.10%	8.71%	8.21%	6.19%
3-9	0.69%	0.12%	6.58%	4.72%	1.94%
3-10	0.65%	0.10%	6.59%	4.65%	1.84%
3-11	4.60%	0.10%	8.72%	9.06%	9.52%
3-12	9.16%	0.10%	8.90%	7.29%	7.23%
5-1	6.82%	8.20%	8.61%	7.87%	4.56%
5-2	3.28%	1.89%	5.77%	5.78%	3.42%
5-4	1.78%	0.10%	9.25%	8.92%	2.11%
5-11	6.81%	1.20%	8.46%	7.07%	4.28%
5-12	7.77%	0.39%	8.91%	8.28%	2.77%
6-1	8.96%	8.60%	9.45%	9.07%	10.56%
6-2	4.09%	0.14%	5.43%	5.59%	9.48%
6-3	5.89%	7.82%	7.53%	7.46%	10.75%
6-4	4.39%	0.10%	4.41%	3.90%	2.05%
6-5	0.76%	0.10%	2.04%	1.65%	1.87%
6-6	4.79%	2.22%	4.98%	5.59%	9.85%
7-5	6.41%	3.86%	7.55%	6.30%	10.55%
7-6	4.67%	6.56%	7.18%	5.85%	9.87%
7-7	1.57%	1.10%	4.15%	2.62%	6.98%
7-8	1.76%	0.79%	6.06%	2.64%	1.83%
7-9	8.16%	1.54%	8.22%	6.08%	7.70%
7-10	8.35%	0.89%	8.05%	5.72%	7.11%
7-11	0.99%	0.10%	6.20%	4.50%	1.84%
7-12	3.61%	2.46%	3.30%	3.21%	8.75%
8-1	5.15%	5.35%	5.26%	4.64%	10.67%
8-2	8.69%	7.98%	8.32%	1.47%	10.70%
8-3	6.84%	0.10%	7.91%	1.70%	7.07%
Sensibilidad:					
	77.42	58.06	93.55	61.29	38.71
v+B+S+TRPI2				96.77%	

FIG. 5G

Dilución de diez veces con una especificidad del 97,5 % (+2SD de la media)					
Cancer	Vim	BMP3	Septin9	TFPI2	EYA4
1-1	3.99%	0.11%	7.19%	8.15%	10.39%
1-2	2.43%	0.10%	6.90%	6.65%	10.60%
1-3	0.82%	0.10%	7.33%	7.41%	10.76%
1-4	7.06%	0.13%	6.71%	6.01%	10.09%
1-5	8.93%	8.21%	8.19%	8.06%	11.24%
1-6	7.91%	6.63%	7.80%	7.87%	10.82%
1-7	0.82%	0.10%	6.35%	3.24%	1.95%
1-8	0.71%	0.12%	3.62%	3.80%	2.30%
1-9	9.42%	1.12%	9.07%	9.56%	10.29%
1-10	9.48%	0.96%	9.15%	9.45%	10.35%
1-11	8.88%	0.10%	8.85%	5.75%	11.10%
1-12	4.88%	0.11%	4.82%	7.27%	10.61%
2-1	0.70%	0.11%	5.58%	2.33%	3.57%
2-2	2.87%	0.11%	4.61%	1.56%	4.25%
2-3	5.47%	2.67%	5.56%	5.26%	8.22%
2-4	4.67%	0.17%	3.67%	5.01%	8.41%
2-5	0.76%	7.06%	7.26%	7.00%	9.81%
2-6	4.43%	4.20%	1.67%	3.99%	9.62%
2-7	5.91%	5.45%	3.89%	4.86%	7.32%
2-8	6.49%	0.18%	7.24%	6.27%	8.06%
2-9	0.71%	8.16%	6.10%	7.89%	10.39%
2-10	0.66%	8.04%	6.39%	7.56%	10.37%
2-11	6.33%	5.19%	1.08%	5.56%	8.31%
2-12	3.51%	0.11%	5.93%	5.38%	5.65%
3-2	5.01%	5.03%	5.32%	5.09%	9.88%
5-3	3.27%	1.62%	5.50%	3.48%	3.51%
5-5	0.84%	1.46%	2.99%	5.44%	3.03%
5-6	0.77%	0.10%	6.61%	1.73%	3.38%
5-7	3.35%	0.12%	6.15%	6.38%	4.18%
5-8	2.40%	3.27%	3.69%	2.71%	3.67%
5-9	4.46%	0.16%	6.36%	5.28%	4.45%
5-10	4.50%	0.13%	6.28%	5.10%	4.18%
6-7	9.34%	8.41%	8.44%	8.70%	10.72%
6-8	5.84%	3.78%	6.65%	5.26%	7.01%
6-9	0.79%	0.14%	6.23%	1.93%	7.86%
6-10	0.72%	0.11%	6.14%	1.87%	7.43%
6-11	6.39%	3.38%	1.05%	6.63%	10.22%
6-12	3.53%	1.24%	8.23%	6.59%	9.06%
7-1	5.47%	0.12%	6.36%	6.67%	10.40%
7-2	2.89%	0.10%	6.66%	4.07%	6.59%
7-3	6.46%	6.11%	8.03%	6.15%	9.63%
7-4	8.01%	0.12%	8.24%	5.65%	2.52%
Sensibilidad:					
	73.81	47.62	90.48	69.05	59.52
vim bmp3, sep, TFPI2				100.00%	

FIG. 5H

Dilución de cinco veces					
con una especificidad del 97,5 % (+2SD de la media)					
Corte	2.10%	0.34%	3.29%	4.99%	7.63%
Adenoma	Vim	BMP3	Septin9	TFPI2	EYA4
3-4	4.47%	0.14%	13.19%	9.43%	2.21%
3-5	10.22%	0.28%	15.45%	14.13%	8.25%
3-6	5.02%	2.00%	8.92%	7.61%	18.75%
3-7	8.54%	7.65%	10.43%	9.37%	19.62%
3-8	8.47%	0.10%	16.41%	14.98%	10.58%
3-9	0.73%	0.15%	12.15%	7.99%	2.08%
3-10	0.66%	0.10%	12.18%	7.86%	1.87%
3-11	8.55%	0.10%	16.43%	16.68%	17.24%
3-12	17.68%	0.10%	16.80%	13.14%	12.65%
5-1	12.99%	16.31%	16.21%	14.29%	7.33%
5-2	5.92%	3.69%	10.53%	10.13%	5.04%
5-4	2.90%	0.10%	17.49%	16.40%	2.42%
5-11	12.98%	2.29%	15.92%	12.70%	6.76%
5-12	14.90%	0.69%	16.82%	15.12%	3.74%
6-1	17.27%	17.11%	17.90%	16.70%	19.33%
6-2	7.53%	0.18%	9.85%	9.73%	17.16%
6-3	11.13%	15.54%	14.06%	13.48%	19.70%
6-4	8.14%	0.11%	7.81%	6.36%	2.30%
6-5	0.87%	0.10%	3.09%	1.86%	1.94%
6-6	8.93%	4.34%	8.97%	9.74%	17.89%
7-5	12.18%	7.62%	14.11%	11.17%	19.30%
7-6	8.69%	13.02%	13.37%	10.25%	17.94%
7-7	2.50%	2.10%	7.31%	3.81%	12.16%
7-8	2.86%	1.49%	11.12%	3.83%	1.87%
7-9	15.67%	2.98%	15.43%	10.73%	13.60%
7-10	16.04%	1.68%	15.11%	10.01%	12.42%
7-11	1.33%	0.11%	11.41%	7.55%	1.88%
7-12	6.57%	4.82%	5.60%	4.99%	15.70%
8-1	9.66%	10.60%	9.52%	7.84%	19.54%
8-2	16.74%	15.87%	15.63%	1.51%	19.60%
8-3	13.03%	0.10%	14.82%	1.96%	12.34%
Sensibilidad					
	87.10	58.06	96.77	80.65	61.29
	v+B+S+TRPI2		96.77%		

FIG. 6

Individual Markers	BAP3		SEPTIN 9		MUT1		SEPTIN 9		MUT1		TFPI2		EYA4	
	Individual Adenoma	Individual Cancer	Individual Adenoma	Individual Cancer	Individual Adenoma	Individual Cancer	Individual Adenoma	Individual Cancer	Individual Adenoma	Individual Cancer	Individual Adenoma	Individual Cancer	Individual Adenoma	Individual Cancer
Tissue @350	87.10	74.32	73.81	61.29	58.06	57.14	101.00	95.24	101.00	95.24	97.52	90.48	97.62	70.57
Dil 5 veces	71.42	89.05	73.81	51.61	52.06	47.62	83.87	78.57	96.77	95.24	70.97	82.33	64.52	63.24
Dil 10 veces	38.71	85.73	73.81	35.48	38.02	47.62	0.00	0.00	93.15	93.48	36.23	61.79	19.05	35.71
Dil 20 veces	12.90	23.81	67.74	12.99	54.84	45.24	0.00	0.00	74.19	69.25	0.00	6.45	0.00	0.00

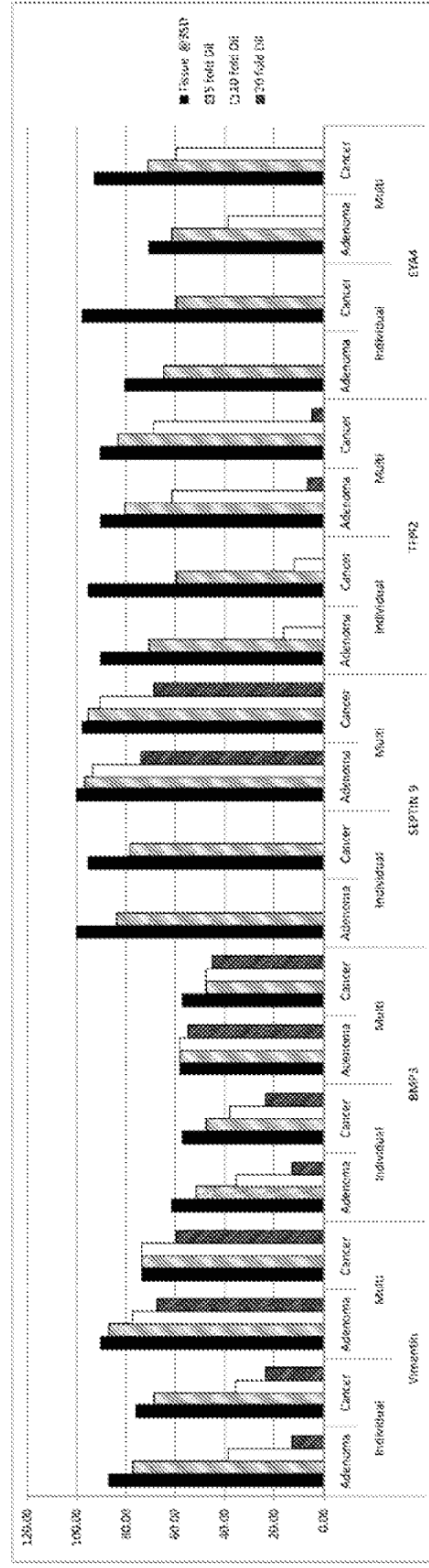


FIG. 7

Combinación de Vimentín, BMP3, Septín9, TFP12

	Adenoma		Multi	
	Individual	Cáncer	Adenoma	Cáncer
Tejido @3SD	100	100	100	100
Dil de 5 veces :	96,8	97,6	96,8	100
Dil de 10 veces :	61,3	54,8	96,8	100
Dil de 20 veces :	12,9	23,8	96,8	97,6

