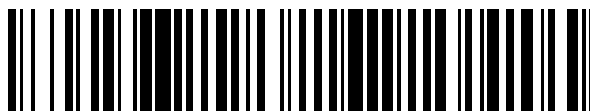


19



OFICINA ESPAÑOLA DE
PATENTES Y MARCAS

ESPAÑA



11 Número de publicación: **2 778 028**

51 Int. Cl.:

C12Q 1/6886 (2008.01)

12

TRADUCCIÓN DE PATENTE EUROPEA

T3

86 Fecha de presentación y número de la solicitud internacional: **17.05.2013 PCT/AU2013/000519**

87 Fecha y número de publicación internacional: **21.11.2013 WO13170314**

96 Fecha de presentación y número de la solicitud europea: **17.05.2013 E 13790927 (1)**

97 Fecha y número de publicación de la concesión europea: **01.01.2020 EP 2850212**

54 Título: **Un método de cribado para cáncer colorrectal**

30 Prioridad:

18.05.2012 US 201261648821 P

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

07.08.2020

73 Titular/es:

**CLINICAL GENOMICS PTY. LTD. (100.0%)
Riverside Life Sciences Building, 11 Julius
Avenue
North Ryde, New South Wales 2113, AU**

72 Inventor/es:

**LAPOINTE, LAWRENCE CHARLES;
PEDERSEN, SUSANNE, K.;
BAKER, ROHAN;
GAUR, SNIGDHA y
THOMAS, MELISSA**

74 Agente/Representante:

ARIAS SANZ, Juan

ES 2 778 028 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

Un método de cribado para cáncer colorrectal

5 Campo de la invención

La presente invención se refiere a un método de clasificar una neoplasia del intestino grueso definido por las reivindicaciones. La presente invención más específicamente proporciona un método para evaluar la probabilidad de que una neoplasia del intestino grueso sea una neoplasia premaligna, una neoplasia maligna de estadio temprano o una neoplasia maligna de estadio tardío como se define mediante las reivindicaciones. El método de la presente invención se basa en cribar para modulación en los niveles de metilación de ADN de uno o más marcadores génicos en muestras de sangre de dicho mamífero.

Antecedentes de la invención

El cáncer colorrectal incluye neoplasias cancerosas en el colon, recto y apéndice. Con 655.000 muertes en el mundo al año, es la cuarta forma más común de cáncer en los Estados Unidos, y la tercera causa principal de muertes por cáncer en el mundo occidental. Los cánceres colorrectales surgen de pólipos adenomatosos en el colon. Estas neoplasias en forma de seta son habitualmente benignas, pero algunas se desarrollan a cáncer con el tiempo. El cáncer de colon localizado habitualmente se diagnostica mediante colonoscopia.

Los cánceres invasivos que están confinados dentro de la pared del colon (estadio I y II) son curables con cirugía. Si no se tratan, se propagan a ganglios linfáticos regionales (estadio III), donde hasta el 73% son curable por cirugía y quimioterapia. El cáncer que metastatiza a sitios distantes (estadio IV) habitualmente no es curable, aunque la quimioterapia puede extender la supervivencia, y en casos raros, la cirugía y la quimioterapia juntas han llevado pacientes a una cura (Markowitz y Bertagnolli, 2009, *N Engl. J. Med.* 361(25): 2449-60). Se usa radiación con cáncer rectal.

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

Los adenomas pueden evolucionar para convertirse en una neoplasia invasiva, y entonces se denominan adenocarcinomas. Según esto, los adenocarcinomas se definen como tumores epiteliales malignos que surgen de estructuras glandulares, que son partes constituyentes de muchos órganos del cuerpo. El término adenocarcinoma también se aplica a tumores que muestran un patrón de crecimiento glandular. Estos tumores se pueden subclasificar según las sustancias que producen, por ejemplo, adenocarcinomas que secretan moco y serosos, o la organización microscópica de sus células en patrones, por ejemplo, adenocarcinomas papilares y foliculares. Estos carcinomas pueden ser sólidos o quísticos (cistoadenocarcinomas). Cada órgano puede producir tumores que muestran una variedad de tipos histológicos, por ejemplo, el ovario puede producir adenocarcinoma tanto mucinoso como quístico.

Los adenomas en diferentes órganos se comportan de forma diferente. En general, la probabilidad global de que un carcinoma esté presente en un adenoma (es decir, un foco de cáncer que se ha desarrollado en una lesión benigna) es aproximadamente el 5%. Sin embargo, esto está relacionado con el tamaño del adenoma. Por ejemplo, en el intestino grueso (colon y recto, específicamente), la aparición de un cáncer en un adenoma es rara en adenomas de menos de 1 centímetro. Tal desarrollo se estima del 40 al 50% en adenomas que son mayores de 4 centímetros y muestran cierto cambio histopatológico tal como cambio veloso, o alto grado de displasia. Los adenomas con grados mayores de displasia tienen una mayor incidencia de carcinoma. En cualquier adenoma colorrectal determinado, los predictores de la presencia de cáncer ahora o la futura aparición de cáncer en el órgano incluyen tamaño (especialmente mayor de 9 mm), grado de cambio de morfología tubular a velosa, presencia de displasia de alto grado y el cambio morfológico descrito como "adenoma dentado". En cualquier individuo determinado, las características adicionales de envejecimiento, aparición familiar de adenoma o cáncer colorrectal, sexo masculino o multiplicidad de adenomas, predicen un riesgo aumentado futuro de cáncer en el órgano -los llamados factores de riesgo para el cáncer. Excepto para la presencia de adenomas y su tamaño, ninguno de estos está definido objetivamente, y todos esos diferentes de número y tamaño están sujetos al error del observador y a confusión respecto a la definición precisa de la característica en cuestión. Puesto que puede ser difícil evaluar y definir tales factores, su valor como predictores de riesgo actual o futuro para cáncer es impreciso.

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

Los síntomas de cáncer colorrectal dependen de la localización del tumor en el intestino, y si ha metastatizado. Desafortunadamente, muchos de los síntomas se pueden producir en otras enfermedades también, y por tanto los síntomas pueden no ser decisivamente diagnósticos de cáncer colorrectal.

- Los síntomas locales son más probables si el tumor está localizado más cerca del ano. Puede haber un cambio en el hábito intestinal (estreñimiento o diarrea de nuevo inicio en ausencia de otra causa), una sensación de defecación incompleta, y reducción en el diámetro de las heces. Tenesmo y cambio en la forma de las heces son ambos característicos de cáncer rectal. La hemorragia gastrointestinal inferior, incluyendo el paso de sangre roja brillante en las heces, puede indicar cáncer colorrectal, como puede la presencia aumentada de moco. Melena, heces negras con un aspecto alquitranado, normalmente se produce en la hemorragia gastrointestinal superior (tal como de una úlcera duodenal), pero a veces se encuentra en cáncer colorrectal cuando la enfermedad está localizada en el principio del intestino grueso.
- Un tumor que es lo suficientemente grande para llenar la luz entera del intestino puede producir obstrucción intestinal. esta situación se caracteriza por estreñimiento, dolor abdominal, distensión abdominal y vómitos. Esto ocasionalmente lleva a que el intestino obstruido y distendido se perfora y cause peritonitis.
- Se producen ciertos efectos locales del cáncer colorrectal cuando la enfermedad ha avanzado más. Es más probable que se sienta un tumor grande al palpar el abdomen, y lo puede sentir un médico en un examen físico. La enfermedad puede invadir otros órganos, y puede producir sangre o aire en la orina o flujo vaginal.
- Si un tumor ha producido sangre oculta en heces crónica, se puede producir anemia por deficiencia en hierro. Esto se puede experimentar como fatiga, palpitaciones y notarse como palidez. El cáncer colorrectal también puede producir pérdida de peso, en general debida a un apetito disminuido.
- Los síntomas constitucionales más inhabituales son fiebre inexplicable y uno de varios síntomas paraneoplásicos. El síndrome paraneoplásico más común es trombosis, habitualmente trombosis venosa profunda.
- El cáncer colorrectal lo más comúnmente se expande al hígado. Esto puede pasar inadvertido, pero grandes depósitos en el hígado pueden producir ictericia y dolor abdominal (debido al estiramiento de la cápsula). Si el depósito tumoral obstruye el conducto biliar, la ictericia puede ir acompañada por otras características de la obstrucción biliar, tal como heces pálidas.
- El cáncer colorrectal puede necesitar muchos años para desarrollarse y la detección temprana del cáncer colorrectal mejora mucho el pronóstico. Incluso esfuerzos modestos para implementar métodos de cribado de cáncer colorrectal pueden producir una caída en las muertes por cáncer. A pesar de esto, las tasas de cribado de cáncer colorrectal permanecen bajas.
- Además de cribar para el inicio de una neoplasia colorrectal, determinar el estadio o grado de una neoplasia también es extremadamente valioso ya que proporciona a un paciente la posibilidad de una pauta de tratamiento mejor ajustada y potencialmente un pronóstico significativamente mejor. Actualmente, la estadificación de neoplasias del intestino grueso es un procedimiento invasivo ya que requiere la recogida de una muestra de tejido que se analiza histológicamente.
- Además, el documento WO 2012/034170 describe marcadores epigenéticos de cánceres colorrectales y métodos diagnósticos usando los mismos. Cassinotti et al. (2012) investigaron el patrón de metilación del ADN en sangre de pacientes con cáncer colorrectal y pólipos colorrectales adenomatosos.
- El sistema de estadificación más comúnmente usado para cáncer colorrectal es el del Comité Conjunto Estadounidense sobre Cáncer (AJCC), algunas veces conocido como el sistema TNM. El sistema TNM describe 3 informaciones clave:
- **T** describe cómo de lejos ha crecido el tumor principal (primario) a través de las capas del intestino y si ha crecido en áreas cercanas. Estas capas, desde la interior a la exterior, incluyen:
 - El revestimiento interno (mucosa)
 - Una capa muscular fina (mucosa muscular)
 - El tejido fibroso debajo de esta capa muscular (submucosa)
 - Una capa muscular gruesa (muscularis propia) que se contrae para forzar los contenidos del intestino adelante
 - Las capas delgadas más externas de tejido conjuntivo (subserosa y serosa) que cubren la mayoría del colon, pero no el recto
 - **N** describe el nivel de propagación a ganglios linfáticos cercanos (regionales), y, si es así, cuantos ganglios linfáticos están implicados.
 - Nx**: No es posible la descripción de implicación de ganglios linfáticos debido a información incompleta.
 - N0**: Sin cáncer en ganglios linfáticos cercanos.
 - N1a**: Se encuentran células cancerosas en 1 ganglio linfático cercano.
 - N1b**: Se encuentran células cancerosas en de 2 a 3 ganglios linfáticos cercanos.
 - N1c**: Se encuentran pequeños depósitos de células cancerosas en áreas de grasa cerca de los ganglios linfáticos, pero no en los ganglios linfáticos mismos.

N2a: Se encuentran células cancerosas en de 4 a 6 ganglios linfáticos cercanos.

N2b: Se encuentran células cancerosas en 7 o más ganglios linfáticos cercanos.

- **M** indica si el cáncer ha metastatizado.

M0: No se ve propagación distante.

M1a: El cáncer se ha extendido a 1 órgano distante o conjunto de ganglios linfáticos distantes.

M1b: El cáncer se ha extendido a más de 1 órgano distante o conjunto de ganglios linfáticos distantes, o se ha extendido a partes distantes del peritoneo (el revestimiento de la cavidad abdominal).

Los números o letras aparecen detrás de T, N y M para proporcionar más detalles sobre cada uno de estos factores. Los números de 0 a 4 indican gravedad creciente. La letra X significa "no se puede evaluar porque la información no está disponible".

Categorías T para cáncer colorrectal

Las categorías **T** de cáncer colorrectal describen el nivel de propagación a través de las capas que forman la pared del colon y el recto.

Agrupamiento de estadio

Una vez se han determinado las categorías T, N y M de una persona, habitualmente después de cirugía, esta información se combina en un proceso llamado *agrupamiento de estadio*. El estadio se expresa en número romanos desde el estadio I (el menos avanzado) hasta el estadio IV (el más avanzado). Algunos estadios se subdividen con letras.

Estadio 0

Tis, N0, M0: El cáncer está en su estadio más temprano. No ha crecido más allá de la capa interna (mucosa) del colon o el recto. Este estadio también se conoce como *carcinoma in situ* o *carcinoma intramucosa*.

Estadio I

T1-T2, N0, M0: El cáncer ha crecido a través de la capa muscular de la mucosa a la submucosa (T1) o también puede haber crecido en la muscularis propia (T2). No se ha extendido a ganglios linfáticos cercanos o sitios distantes.

Estadio IIA

T3, N0, M0: El cáncer ha crecido en las capas más externas del colon o el recto, pero no ha pasado a través de ellas. No ha alcanzado órganos cercanos. No se ha extendido todavía a los ganglios linfáticos cercanos o sitios distantes.

Estadio IIB

T4a, N0, M0: El cáncer ha crecido a través de la pared del colon o el recto, pero no ha crecido en otros tejidos u órganos cercanos. No se ha extendido todavía a los ganglios linfáticos cercanos o sitios distantes.

Estadio IIC

T4b, N0, M0: El cáncer ha crecido a través de la pared del colon o el recto y está unido a o ha crecido en tejidos u órganos cercanos. No se ha extendido todavía a los ganglios linfáticos cercanos o sitios distantes.

Estadio IIIA

Aplica uno de los siguientes.

T1-T2, N1, M0: El cáncer ha crecido a través de la mucosa en la submucosa (T1) o también puede haber crecido en la muscularis propia (T2). Se ha extendido a de 1 a 3 ganglios linfáticos cercanos (N1a/N1b) o en áreas de grasa cerca de los ganglios linfáticos, pero no en los ganglios mismos (N1c). No se ha extendido a sitios distantes.

T1, N2a, M0: El cáncer ha crecido a través de la mucosa en la submucosa. Se ha extendido a de 4 a 6 ganglios linfáticos cercanos. No se ha extendido a sitios distantes.

Estadio IIIB

Aplica uno de los siguientes.

T3-T4a, N1, M0: El cáncer ha crecido en las capas más externas del colon o el recto (T3) o a través del peritoneo visceral (T4a), pero no ha alcanzado órganos cercanos. Se ha extendido a de 1 a 3 ganglios linfáticos cercanos

(N1a/N1b) o en áreas de grasa cerca de los ganglios linfáticos, pero no en los ganglios mismos (N1c). No se ha extendido a sitios distantes.

T2-T3, N2a, M0: El cáncer ha crecido en la muscularis propia (T2) o en las capas más externas del colon o el recto (T3). Se ha extendido a de 4 a 6 ganglios linfáticos cercanos. No se ha extendido a sitios distantes.

T1-T2, N2b, M0: El cáncer ha crecido a través de la mucosa en la submucosa (T1) o también puede haber crecido en la muscularis propia (T2). Se ha extendido a 7 o más ganglios linfáticos cercanos. No se ha extendido a sitios distantes.

Estadio IIIC

Aplica uno de los siguientes.

T4a, N2a, M0: El cáncer ha crecido a través de la pared del colon o el recto (incluyendo el peritoneo visceral), pero no ha alcanzado órganos cercanos. Se ha extendido a de 4 a 6 ganglios linfáticos cercanos. No se ha extendido a sitios distantes

T3-T4a, N2b, M0: El cáncer ha crecido en las capas más externas del colon o el recto (T3) o a través del peritoneo visceral (T4a), pero no ha alcanzado órganos cercanos. Se ha extendido a 7 o más ganglios linfáticos cercanos. No se ha extendido a sitios distantes.

T4b, N1-N2, M0: El cáncer ha crecido a través de la pared del colon o el recto y se ha unido a o ha crecido en otros tejidos u órganos cercanos. Se ha extendido a 1 o más ganglios linfáticos cercanos o en áreas de grasa cerca de los ganglios linfáticos. No se ha extendido a sitios distantes.

Estadio IVA

Cualquier T, cualquier N, M1a: El cáncer puede o no haber crecido a través de la pared del colon o el recto, y puede o no haberse extendido a ganglios linfáticos cercanos. Se ha extendido a 1 órgano distante (tal como el hígado o el pulmón) o conjunto de ganglios linfáticos.

Estadio IVB

Cualquier T, cualquier N, M1b: El cáncer puede o no haber crecido a través de la pared del colon o el recto, y puede o no haberse extendido a ganglios linfáticos cercanos. Se ha extendido a más de 1 órgano distante (tal como el hígado o el pulmón) o conjunto de ganglios linfáticos, o se ha extendido a partes distantes del peritoneo (el revestimiento de la cavidad abdominal).

Otro factor que puede afectar el pronóstico para supervivencia es el grado del cáncer. Grado es una descripción de cuan estrechamente se parece el cáncer al tejido colorrectal normal cuando se mira al microscopio.

La escala usada para clasificar los cánceres colorrectales va de G1 (donde el cáncer se parece mucho al tejido colorrectal normal) a G4 (donde el cáncer parece muy anormal). Los grados G2 y G3 están en algún punto entremedias. El grado con frecuencia se simplifica a "bajo grado" (G1 o G2) o "alto grado" (G3 o G4). Los cánceres de bajo grado tienden a crecer y expandirse más lentamente que los cánceres de alto grado.

En el contexto de neoplasias del intestino grueso, el análisis histológico de muestras de tejido es tanto relativamente lento como muy invasivo. Debido a su invasividad, tampoco es un procedimiento que se querría realizar repetidamente. El desarrollo de un medio para evaluar de forma fiable y rutinaria un paciente para determinar si una neoplasia identificada es premaligna (por ejemplo, adenoma), de estadio temprano o estadio tardío (por ejemplo, metastásica) es muy deseable si se puede realizar rápida y repetidamente, ya que esto permitiría que se tomaran e implementaran decisiones en relación a pautas de tratamiento de forma más precisa. También permitiría que se realizara el seguimiento continuado durante una pauta de tratamiento, tal como en el contexto de tratar un adenoma o cáncer de estadio temprano, para evaluar la transición a un estadio más avanzado sin la necesidad de realizar biopsias invasivas. Esto también permitiría más flexibilidad en términos de adaptar pautas de tratamiento para reflejar los cambios al estadio de la neoplasia.

En el trabajo que conduce a la presente invención, se ha determinado que un panel de marcadores génicos que se sabe que son diagnósticos de neoplasias del intestino grueso pueden, de hecho, también proporcionar información valiosa en relación a la clasificación de una neoplasia. Específicamente, mientras que el nivel de aumento en la metilación del ADN de estos marcadores génicos es similar en la mayoría de las muestras biológicas, independientemente de cómo de avanzada está la neoplasia, cuando se evalúa en una muestra derivada de sangre, tal como plasma, se encuentra un aumento en el nivel de metilación según el estadio de la neoplasia se vuelve más avanzado.

Este hallazgo ha proporcionado ahora por tanto un medio para evaluar la probabilidad de que una neoplasia determinada sea premaligna, maligna de estadio temprano o maligna de estadio tardío. Esta información en relación a la clasificación de la neoplasia puede después informar del desarrollo del tratamiento terapéutico y seguimiento continuado que es apropiado para el paciente. De forma importante, en particular en el contexto de neoplasias premalignas o malignas de estadio temprano, proporciona un medio para seguimiento continuado no invasivo. El método de la presente invención se puede realizar o bien después de un diagnóstico inicial, o puede él mismo formar parte del cribado de pacientes que se presentan para el diagnóstico inicial, pero donde, además del resultado diagnóstico, también se proporciona información de clasificación.

Compendio

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

Como se usa en el presente documento, el término "derivado de" se debe tomar que indica que un número entero particular o grupo de números enteros se ha originado de la especie especificada, pero no se ha obtenido necesariamente de la fuente especificada. Además, como se usa en el presente documento las formas singulares de "un", "una", "el" y "la" incluyen referentes plurales a menos que el contexto claramente dicte otra cosa.

A menos que se defina de otra manera, todos los términos técnicos y científicos usados en el presente documento tienen el mismo significado que entiende comúnmente un experto en la materia a la que pertenece esta invención.

La especificación objeto contiene información de secuencias de nucleótidos preparada usando el programa PatentIn versión 3.5, presentada en el presente documento después de la bibliografía. Cada secuencia de nucleótidos se identifica en la lista de secuencia por el indicador numérico <210> seguido por el identificador de secuencia (por ejemplo, <210> 1, <210> 2, etc.). La longitud, tipo de secuencia (ADN, etc.) y el organismo fuente para cada secuencia está indicada por información proporcionada en los campos indicadores numéricos <211>, <212> y <213>, respectivamente. Las secuencias de nucleótidos a las que se hace referencia en la especificación se identifican por el indicador SEQ ID NO: seguido por el identificador de secuencia (por ejemplo, SEQ ID NO: 1, SEQ ID NO: 2, etc.). El identificador de secuencia a que se hace referencia en la especificación se correlaciona con la información proporcionada en el campo indicador numérico <400> en la lista de secuencias, que está seguido por el identificador de secuencia (por ejemplo, <400> 1, <400> 2, etc.). Es decir, SEQ ID NO: 1 como se detalla en la especificación se correlaciona con la secuencia indicada como <400> 1 en la lista de secuencias. La presente invención se define por las reivindicaciones. Según esto, la presente invención se refiere a un método de determinar una o más probabilidades de clasificaciones respectivas de una neoplasia del intestino grueso en un individuo, dicho método comprende evaluar el estado de metilación de una región de ADN seleccionada de:

- (i) la región, incluyendo 2 kb anteriores del sitio de inicio de la transcripción, definida por al menos una de las coordenadas de Hg19 chr12:24962958..25102393; y
- (ii) la región génica, incluyendo 2 kb anteriores de BCAT1 y

que opcionalmente comprende además evaluar el estado de metilación de al menos una región de ADN seleccionada de:

- (i) la región, incluyendo 2 kb anteriores del sitio de inicio de la transcripción, definida por al menos una de las coordenadas de Hg19: (2) chr7:50344378...50472798; (3) chr6:391739..411443; (4) chr12:52400748..52409671; y (5) chr6:163834097..163834982; o
- (ii) la región génica, incluyendo 2 kb anteriores de al menos uno de: (2) IKZF1 (3) IRF4 (4) GRASP y (5) CAHM

en una muestra derivada de sangre de dicho individuo, en donde un nivel de metilación de al menos una de las regiones de ADN del grupo (i) y/o (ii) relativo a los correspondientes niveles medidos de metilación de una población de individuos con categorías neoplásicas conocidas de neoplasias del intestino grueso correspondientes se usa para determinar una o más probabilidades de clasificaciones respectivas de dicha neoplasia del intestino grueso de dicho individuo en una o más categorías neoplásicas seleccionadas de adenoma, categorías de estadio I, estadio II, estadio III y estadio IV o en uno o más agregados de menos de cinco de dichas categorías neoplásicas.

También se describe en el presente documento un método de determinar una o más probabilidades de clasificaciones respectivas de una neoplasia del intestino grueso en un individuo, dicho método comprende evaluar el estado de metilación de una región de ADN seleccionada de:

- (i) la región, incluyendo 2 kb anteriores del sitio de inicio de la transcripción, definida por al menos una de las coordenadas de Hg19:
 - (1) chr12:24962958..25102393
 - (2) chr7:50344378...50472798

- (3) chr6:391739..411443
- (4) chr12:52400748..52409671; y
- (5) chr6:163834097..163834982; o

(ii) la región génica, incluyendo 2 kb anteriores de al menos uno de:

- (1) BCAT1 (2) IKZF1 (3) IRF4 (4) GRASP y (5) CAHM

en una muestra derivada de sangre de dicho individuo, en donde un nivel de metilación de al menos una de las regiones de ADN del grupo (i) y/o (ii) relativo a los correspondientes niveles medidos de metilación de una población de individuos con categorías neoplásicas conocidas de neoplasias del intestino grueso correspondientes se usa para determinar una o más probabilidades de clasificaciones respectivas de dicha neoplasia del intestino grueso de dicho individuo en una o más categorías seleccionadas de adenoma, categorías de estadio I, estadio II, estadio III y estadio IV o en uno o más agregados de menos de cinco de dichas categorías neoplásicas.

El método se puede dirigir a determinar una o más probabilidades de clasificaciones respectivas de dichas neoplasias del intestino grueso de dicho individuo en uno o más agregados de menos de cinco de dichas categorías neoplásicas.

El método puede además incluir usar dicho nivel de metilación para dicho individuo para determinar una probabilidad de que dicho intestino grueso de dicho individuo se clasificara como no neoplásico, basado en la comparación de dicho nivel de metilación relativo a dichos niveles de metilación medidos correspondientes y a niveles de metilación medidos correspondientes adicionales de una población adicional de individuos cuyos intestinos gruesos se clasificaron como no neoplásicos.

Las subregiones que se ha determinado que muestran utilidad particular se enumeran a continuación con referencia al gen y región cromosómica en las que se encuentran:

- (1) subregiones de BCAT1 chr12:25101992-25102093 (SEQ ID NO:1 o la correspondiente hebra menos) y chr12:25101909-25101995 (SEQ ID NO:2 o la correspondiente hebra menos)
- (2) subregiones de IKZF1: chr7:50343867-50343961 (SEQ ID NO:3 o la correspondiente hebra menos) y chr7:50343804-5033895 (SEQ ID NO:4 o la correspondiente hebra menos)
- (3) subregiones de IRF4: chr6:392036-392145 (SEQ ID NO:5 o la correspondiente hebra menos)
- (4) subregiones de GRASP1: chr12:52399672-52399922, chr12:52400821-52401051 (SEQ ID NO:6 o la correspondiente hebra menos), chr12:52401407-52401664 (SEQ ID NO:7 o la correspondiente hebra menos) chr12:52400866-52400973 y Chr12:52401107-52401664.
- (5) subregiones de CAHM: chr6:163834295-163834500 (SEQ ID NO:8 o la correspondiente hebra menos), chr6:163834621-163834906 chr6:163834393-163834455 y chr6:163834393-163834519.

Sin limitar la presente invención a ninguna teoría o modo de acción, el experto en la materia puede cribar una o más subregiones para cada marcador génico.

En la medida que el método de la presente invención y divulgación incluye analizar la metilación de BCAT1, los residuos objeto:

chr12:25101998	chr12:25102003	chr12:25102006	chr12:25102009
chr12:25102017	chr12:25102022	chr12:25102039	chr12:25102048
chr12:25102050	chr12:25102053	chr12:25102061	chr12:25102063
chr12:25102071	chr12:25101921	chr12:25101934	chr12:25101943
chr12:25101951	chr12:25101962	chr12:25101964	chr12:25101970

o una citosina correspondiente en la posición n+1 de la hebra de ADN opuesta.

En la medida que el método de la presente invención y divulgación incluye analizar la metilación de GRASP, los residuos objeto son:

chr12:52399713	chr12:52399731	chr12:52399749	chr12:52399783
chr12:52399796	chr12:52399808	chr12:52399823	chr12:52399835
chr12:52399891			
chr12:52400847	chr12:52400850	chr12:52400859	chr12:52400866
chr12:52400869	chr12:52400873	chr12:52400881	chr12:52400886
chr12:52400893	chr12:52400895	chr12:52400899	chr12:52400902
chr12:52400907	chr12:52400913	chr12:52400919	chr12:52400932
chr12:52400938	chr12:52400958	chr12:52400962	chr12:52400971
chr12:52400973	chr12:52400976	chr12:52400998	chr12:52401008
chr12:52401010	chr12:52401012	chr12:52401016	chr12:52401019
chr12:52401025	chr12:52401041	chr12:52401044	chr12:52401053
chr12:52401060	chr12:52401064	chr12:52401092	chr12:52401118
chr12:52401438	chr12:52401448	chr12:52401460	chr12:52401465
chr12:52401474	chr12:52401477	chr12:52401479	chr12:52401483
chr12:52401504	chr12:52401514	chr12:52401523	chr12:52401540
chr12:52401553	chr12:52401576	chr12:52401588	chr12:52401595
chr12:52401599	chr12:52401604	chr12:52401606	chr12:52401634
chr12:52401640	chr12:52401644	chr12:52401659	
chr12:52401160	chr12:52401165	chr12:52401174	chr12:52401177
chr12:52401179	chr12:52401183	chr12:52401204	chr12:52401215
chr12:52401223	chr12:52401240	chr12:52401253	chr12:52401288
chr12:52401295	chr12:52401299	chr12:52401304	chr12:52401334
chr12:52401340	chr12:52401344	chr12:52401359	

o una citosina correspondiente en la posición n+1 de la hebra de ADN opuesta.

- 5 En la medida que el método de la presente invención y divulgación incluye analizar la metilación de CAHM, los residuos objeto son:

chr6:163834330	chr6:163834332	chr6:163834357
chr6:163834373	chr6:163834384	chr6:163834390
chr6:163834392	chr6:163834406	chr6:163834412
chr6:163834419	chr6:163834443	chr6:163834448
chr6:163834452	chr6:163834464	chr6:163834483
chr6:163834653	chr6:163834660	chr6:163834672
chr6:163834675	chr6:163834678	chr6:163834681
chr6:163834815	chr6:163834824	chr6:163834835
chr6:163834840	chr6:163834853	chr6:163834855
chr6:163834858	chr6:163834863	chr6:163834869
chr6:163834872		

- 10 o una citosina correspondiente en la posición n+1 de la hebra de ADN opuesta.
- En la medida que el método de la presente invención y divulgación incluye analizar la metilación de IKZF1, los residuos objeto son:

- 15
- | | | |
|---------------|---------------|---------------|
| chr7:50343869 | chr7:50343872 | chr7:50343883 |
| chr7:50343889 | chr7:50343890 | chr7:50343897 |
| chr7:50343907 | chr7:50343909 | chr7:50343914 |
| chr7:50343934 | chr7:50343939 | chr7:50343950 |
| chr7:50343959 | chr7:50343805 | chr7:50343822 |
| chr7:50343824 | chr7:50343826 | chr7:50343829 |
| chr7:50343831 | chr7:50343833 | chr7:50343838 |
| chr7:50343847 | chr7:50343850 | chr7:50343858 |
| chr7:50343864 | chr7:50343869 | chr7:50343872 |
| chr7:50343890 | | |

o una citosina correspondiente en la posición n+1 de la hebra de ADN opuesta.

En la medida que el método de la presente invención y divulgación incluye analizar la metilación de IRF4, los residuos objeto son:

chr6:392036	chr6:392047	chr6:392049
chr6:392057	chr6:392060	chr6:392066
chr6:392080	chr6:392094	chr6:392102
chr6:392131		

5

o una citosina correspondiente en la posición n+1 de la hebra de ADN opuesta.

Breve descripción de los dibujos

10 **Figura 1. Medida de los niveles de metilación de CAHM en muestras de tejido y plasma sanguíneo. A:** Los niveles de CAHM metilado en muestras de tejido colorrectal incluyendo normales (n = 26, círculos sólidos), adenomas (n = 17, cuadrados sólidos), estadio I (n = 20, cuadrados abiertos), estadio II (n = 21, círculos abiertos), estadio III (n = 30 rombos abiertos) y estadio IV (n = 8 cruces) se midieron usando el ensayo de metilación de CAHM específico descrito en M&M en 15 ng de ADN convertido con bisulfito extraído de 122 muestras de tejido (figura izquierda). La salida de señal se convirtió a masa/pocillo usando una curva de calibración. Los datos se dan como el % de CAHM metilado medido en 15 ng de ADN de tejido convertido con bisulfito total por reacción. Los datos son valores medios de triplicado. B: Los niveles de CAHM metilado se midieron en el equivalente de análisis triplicado de 0,5 ml de plasma de pacientes confirmados por colonoscopia incluyendo normales (n = 74, círculos sólidos), adenomas (n = 73, cuadrados sólidos), estadio I (n = 12, cuadrados abiertos), estadio II (n = 21, círculos abiertos), estadio III (n = 23 rombos abiertos) y estadio IV (n = 12 cruces negras). La salida de señal se convirtió a masa/pocillo usando una curva de calibración. Los datos se dan como pg de CAHM metilado por ml de plasma. Los datos son valores medios de triplicado. Se observaron masas aumentadas de CAHM metilado en plasma sanguíneo de pacientes como función de la evolución de la enfermedad (es decir, se calculó que pg/ml de CAHM era mayor en estadio III-IV comparado con estadio I-II). En contraste, se midieron niveles altos y similares de pg de CAHM metilado en tejido colorrectal desde el inicio más temprano de la enfermedad (precanceroso) al cáncer de estadio tardío.

25 **Figura 2. Niveles aumentados de biomarcadores de cáncer colorrectal metilados en plasma sanguíneo como función de evolución de la enfermedad. Medida de los niveles de metilación de CAHM en muestras de tejido y plasma sanguíneo.** Los niveles de IRF4 (A), GRASP (B), BCAT1 (C) e IKZF1 (D) metilados se midieron en el equivalente de análisis triplicado de 0,5 ml de plasma de pacientes confirmados por colonoscopia incluyendo normales (círculos sólidos), adenomas (cuadrados sólidos), estadio I (cuadrados abiertos), estadio II (círculos abiertos), estadio III (rombos abiertos) y estadio IV (cruces). La salida de señal se convirtió a masa/pocillo usando una curva de calibración. Los datos se dan como pg de biomarcador metilado por ml de plasma. Los datos son valores medios de triplicado. Como se ejemplifica en la figura 1 para CAHM, la figura 2 demuestra otros cuatro biomarcadores, es decir, GRASP, IRF4, BCAT1 e IKZF1, donde la medida de los niveles de metilación en plasma sanguíneo puede ser indicativa de evolución de cáncer colorrectal.

30 **Figura 3. Distribuciones de densidad de CAHM metilado agrupadas por clasificación de fenotipo estimadas de niveles de metilación determinados en ensayo. A)** Curvas de densidad de probabilidad empírica para CAHM basadas en los niveles de metilación previamente determinados por ensayos de CAHM metilado (cf Fig. 1B). La densidad se estima usando solo valores de ensayo positivos para muestras de plasma no neoplásicas (negro); adenomas malignos (azul); cánceres de estadio temprano incluyendo plasma de pacientes diagnosticados con estadio 1 o estadio 2 (rojo); y cánceres de estadio tardío incluyendo plasma de pacientes diagnosticados con estadio 3 o estadio 4 (púrpura). **B)** Distribución normal estimada (gaussiana) usando estimaciones de media y desviación estándar determinadas de niveles de metilación positivos medidos en plasma extraído de pacientes con lesiones neoplásicas premalignas (azul); cánceres de estadio temprano (rojo) y cánceres de estadio tardío (púrpura).

Descripción detallada

50 La presente invención se define mediante las reivindicaciones y se basa, en parte, en la determinación de que varios genes que se sabe muestran niveles aumentados de metilación en individuos que muestran neoplasias del intestino grueso también son un indicador de la clasificación de la neoplasia. Específicamente, se ha determinado sorprendentemente que aunque el aumento relativo en los niveles de metilación de ADN en un marcador génico determinado es relativamente consistente en una biopsia de tejido independientemente del estadio o grado de la neoplasia en cuestión, lo mismo no es cierto si se analiza una muestra derivada de sangre, tal como plasma. En particular, mientras que una muestra derivada de sangre también mostrará niveles aumentados de metilación de ADN en el contexto de la presencia de un tumor maligno en el intestino grueso, estos niveles de metilación aumentados aumentan progresivamente más según el tumor maligno se vuelve más avanzado. Esto no se observa en muestras de tejido. Según esto, al evaluar los niveles de metilación de ADN según el método de la presente invención, se puede determinar no solo si se ha producido la transformación maligna, sino además la probabilidad plausible de que el tumor maligno se clasificara como estadio temprano o estadio tardío.

60

Según esto, un aspecto de la presente invención se dirige a un método de determinar una o más probabilidades de clasificaciones respectivas de una neoplasia del intestino grueso en un individuo, dicho método comprende evaluar el estado de metilación de una región de ADN seleccionada de:

- 5 (i) la región, incluyendo 2 kb anteriores del sitio de inicio de la transcripción, definida por al menos una de las coordenadas de Hg19 chr12:24962958..25102393; y
- (ii) la región génica, incluyendo 2 kb anteriores de BCAT1 y

10 que opcionalmente comprende además evaluar el estado de metilación de al menos una región de ADN seleccionada de:

- 15 (i) la región, incluyendo 2 kb anteriores del sitio de inicio de la transcripción, definida por al menos una de las coordenadas de Hg19:
(2) chr7:50344378...50472798;
(3) chr6:391739..411443;
(4) chr12:52400748..52409671; y
(5) chr6:163834097..163834982; o
- 20 (ii) la región génica, incluyendo 2 kb anteriores de al menos uno de:
(2) IKZF1 (3) IRF4 (4) GRASP y (5) CAHM

25 en una muestra derivada de sangre de dicho individuo, en donde un nivel de metilación de al menos una de las regiones de ADN del grupo (i) y/o (ii) relativo a los correspondientes niveles medidos de metilación de una población de individuos con categorías neoplásicas conocidas de neoplasias del intestino grueso correspondientes se usa para determinar una o más probabilidades de clasificaciones respectivas de dicha neoplasia del intestino grueso de dicho individuo en una o más categorías seleccionadas de adenoma, categorías de estadio I, estadio II, estadio III y estadio IV o en uno o más agregados de menos de cinco de dichas categorías neoplásicas.

30 En una forma de realización, el método se dirige a determinar una o más probabilidades de respectivas clasificaciones de dichas neoplasias de intestino grueso de dicho individuo en uno o más agregados de menos de cinco de dichas categorías neoplásicas.

35 El método puede incluir además incluir usar dicho nivel de metilación para dicho individuo para determinar la probabilidad de que dicho intestino grueso de dicho individuo se clasificara como no neoplásico, basado en la comparación de dicho nivel de metilación relativo a dichos niveles de metilación medidos correspondientes y a niveles de metilación medidos correspondientes adicionales de una población adicional de individuos cuyos intestinos gruesos se clasificaron como no neoplásicos.

40 Las categorías de agregado pueden incluir uno o más agregados de menos de cinco de dichas categorías neoplásicas y un agregado de la categoría no neoplásica con al menos la categoría de adenoma.

Las categorías de agregado pueden incluir una categoría de neoplasia premaligna que consiste en un agregado de categorías no neoplásica y adenoma.

45 Las categorías de agregado pueden incluir una categoría de neoplasia maligna de estadio temprano que consiste en un agregado de categorías de estadio I y estadio II.

Las categorías de agregado pueden incluir una categoría de neoplasia maligna de estadio tardío que consiste en un agregado de categorías de estadio III y estadio IV.

50 Las categorías de agregado pueden incluir una categoría de neoplasia premaligna, categoría de neoplasia maligna de estadio temprano, y categorías de neoplasias malignas de estadio tardío.

55 Los niveles de metilación medidos determinados en una población de individuos con clasificaciones conocidas de neoplasias de intestino grueso en categorías neoplásicas seleccionadas de adenoma, categorías de estadio I, estadio II, estadio III y estadio IV o agregados de menos de cinco de dichas categorías neoplásicas, y niveles de metilación medidos adicionales en una población adicional de individuos cuyos intestinos gruesos se clasificaron como no neoplásicos, las relaciones estadísticas anteriores entre los niveles de metilación medidos y las correspondientes categorías conocidas para las poblaciones de individuos se pueden usar para determinar una o más probabilidades de que un nivel de metilación medido adicional de un individuo corresponda a las respectivas de las mismas categorías de neoplasia de intestino grueso o intestino grueso no neoplásico de dicho individuo. Como será aparente para los expertos en la materia, la determinación se puede hacer usando cualquiera de una variedad de métodos estadísticos estándar, incluyendo estadística bayesiana y aprendizaje automático.

65 El método estadístico puede incluir generar histogramas en donde los niveles de metilación medidos correspondientes a categorías conocidas se asignan en archivos de intervalos respectivos de niveles de metilación y usar estos histogramas para estimar al menos una probabilidad de que un nivel de metilación medido adicional corresponda a al

menos una de las categorías conocidas. Como será aparente para los expertos en la materia, hay muchos métodos para estimar las probabilidades de clasificación. Por ejemplo, al añadir los tamaños totales de los archivos correspondientes a niveles de metilación de niveles iguales o menores al nivel de metilación en cuestión y dividir esta suma por el total a través de todos los archivos, se puede estimar la proporción de niveles de metilación en o por debajo de un nivel determinado que son de una categoría conocida y por tanto la probabilidad de que un nivel de metilación medido sea de dicha categoría.

Las distribuciones estadísticas de dichos niveles de metilación medidos se pueden modelar por distribuciones estadísticas estándar tal como una distribución gaussiana, por ejemplo, y se usa un ajuste estándar o procedimiento de regresión tal como la probabilidad máxima para determinar los parámetros de las distribuciones, que después se pueden aplicar a un nivel de metilación medido adicional de un individuo para determinar una o más probabilidades de que el intestino grueso de ese individuo se clasificara como los respectivos de las categorías neoplásicas y la categoría no neoplásica.

El método puede incluir usar las probabilidades determinadas para clasificar automáticamente la neoplasia del intestino grueso del individuo en una de las clasificaciones conocidas previas, sea neoplásica o no neoplásica. Sin embargo, dado el solapamiento entre los niveles de metilación medidos para las diferentes categorías, las probabilidades en general son más útiles para la selección de posibles opciones de tratamiento médico adicional.

Las asociaciones estadísticas entre los niveles de metilación medidos, por una parte, y las correspondientes categorías observadas por colonoscopia o cirugía, por la otra, se pueden usar como un conjunto de entrenamiento para aprendizaje supervisado. Los pesos resultantes se aplican después a al menos un nivel de metilación medido adicional para al menos un individuo adicional con el fin de determinar las probabilidades correspondientes para miembro de esas categorías para al menos un individuo. Como será aparente para los expertos en la materia, se puede usar cualquiera de un número de método de entrenamiento supervisado.

Las categorías usadas para el aprendizaje supervisado pueden incluir las cinco categorías neoplásicas y la categoría no neoplásica, o agregados de esas seis categorías, tal como las categorías de agregado descritas anteriormente. La selección de qué categorías usar para el entrenamiento supervisado se pueden basar en requisitos de diagnóstico/tratamiento y/o el número disponible y/o la confianza de la clasificación de las categorías observadas (por ejemplo, con el fin de mejorar la sensibilidad y especificidad de la clasificación). En cualquier caso, los pesos generados por el aprendizaje supervisado también se pueden proporcionar como entradas a un clasificador estándar con el fin de clasificar el intestino grueso del individuo en una clase o categoría neoplásica o no neoplásica basado en el correspondiente nivel de metilación medido.

Se debe entender la referencia a "neoplasia" como una referencia a una lesión, tumor u otra masa encapsulada o no encapsulada u otra forma de crecimiento que comprende células neoplásicas. Se debe entender una "célula neoplásica" como una referencia a una célula que muestra crecimiento anómalo. Se debe entender el término "crecimiento" en su sentido más amplio e incluye referencia a proliferación. A este respecto, un ejemplo de crecimiento celular anómalo es la proliferación incontrolada de una célula. Otro ejemplo es la apoptosis fallida de una célula, prolongando así su tiempo de vida habitual. La célula neoplásica puede ser una célula benigna o una célula maligna. En una forma de realización preferida, la neoplasia objeto es un adenoma o un adenocarcinoma. Sin limitar la presente invención a ninguna teoría o modo de acción, un adenoma es en general un tumor benigno de origen epitelial que o bien deriva de tejido epitelial o muestra estructuras epiteliales claramente definidas. Estas estructuras pueden asumir un aspecto glandular. Puede comprender una población de células malignas en el adenoma, tal como se produce con la evolución de un adenoma benigno o legión neoplásica benigna a un adenocarcinoma maligno.

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

- (i) el ciego;
- (ii) el colon ascendente;
- (iii) el colon transversal;
- (iv) el colon descendente;
- (v) el colon sigmoide;
- (vi) el recto;
- (vii) el ángulo esplénico; y
- (viii) el ángulo hepático.

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

Se debe entender la referencia a "región de ADN" como una referencia a una sección específica del ADN genómico. Estas regiones de ADN se especifican o bien por referencia a un nombre de gen o un conjunto de coordenadas cromosómicas. Tanto los nombres de genes como las coordenadas cromosómicas serían conocidas para, y las entenderían, un experto en la materia. Como se he detallado anteriormente en el presente documento, las

coordenadas cromosómicas corresponden a la versión Hg19 del genoma. En general, un gen se puede identificar rutinariamente por referencia a su nombre, a través del cual tanto sus secuencias como su localización cromosómica se pueden obtener rutinariamente, o por referencia a sus coordenadas cromosómicas, a través de las cuales también se pueden obtener rutinariamente tanto el nombre del gen como su secuencia.

Se debe entender la referencia a cada uno de los genes/regiones de ADN detalladas anteriormente como una referencia a todas las formas de estas moléculas y a fragmentos o variantes de las mismas. Como apreciará el experto en la materia, se sabe que algunos genes muestran variación alélica entre individuos o polimorfismos de nucleótido único. Los SNP abarcan inserciones y deleciones de tamaño variable y repeticiones de secuencia sencilla, tal como repeticiones de dinucleótidos y trinucleótidos. Las variantes incluyen secuencias de ácido nucleico de la misma región que comparten al menos el 90%, 95%, 98%, 99% de identidad de secuencia, es decir, que tienen una o más deleciones, adiciones, sustituciones, secuencias invertidas, etc., relativas a las regiones de ADN descritas en el presente documento. Según esto, se debe entender que la presente divulgación se extiende a tales variantes que, en términos de las presentes aplicaciones diagnósticas, alcanzan el mismo desenlace a pesar del hecho de que pueden existir variaciones genéticas minoritarias entre las secuencias de ácido nucleico reales entre individuos. Por tanto, se debe entender que la presente divulgación se extiende a todas las formas de ADN que surgen de cualquier otra mutación, variación polimórfica o alélica.

Se debe entender que el “individuo” que es el sujeto de ensayo puede ser cualquier mamífero humano o no humano. Los ejemplos de mamíferos no humanos incluyen primates, animales de ganadería (por ejemplo, caballos, vacas, ovejas, cerdos, burros), animales de ensayo de laboratorio (por ejemplo, ratones, ratas, conejos, cobayas), animales de compañía (por ejemplo, perros, gatos) y animales salvajes cautivos (por ejemplo, ciervos, zorros).

Preferiblemente dicho mamífero es un ser humano.

Como se ha detallado anteriormente en el presente documento, el método de la presente invención permite evaluar la probabilidad de que una neoplasia sea una neoplasia premaligna, neoplasia maligna de estadio temprano o neoplasia maligna de estadio tardío. Aunque los sistemas de estadificación y clasificación que se usan comúnmente los patólogos en el contexto de neoplasias de intestino grueso (tal como cánceres colorrectales) pueden supuestamente organizar tales cánceres de forma bastante precisa, el hecho es que requieren que se recoja una muestra de biopsia, siendo este un procedimiento que es invasivo. Puesto que la evaluación que se requiere que se realice es la preparación y análisis histológico de una sección de tejido, también puede llevar algún tiempo obtener resultados. En términos de evaluar de forma exacta muestras histológicas, la interpretación de las secciones es subjetiva y puede ser extremadamente difícil y poco fiable, en particular en el contexto de cánceres de grado moderado, en oposición a cánceres en estadio muy temprano o cánceres metastásicos. Según esto, la identificación de una base molecular sobre la que clasificar una neoplasia es un avance significativo debido al hecho de tales análisis no son subjetivos. Aún más, puesto que los niveles de metilación del ADN de los genes en cuestión se evalúan en una muestra de sangre, este es el primer medio no invasivo disponible de clasificar una neoplasia de intestino grueso.

Sin limitar la presente invención a ninguna teoría o modo de acción, el sistema de estadificación más comúnmente usado para cáncer colorrectal es el del Comité Conjunto Estadounidense sobre Cáncer (AJCC), algunas veces también conocido como el sistema TNM. El sistema TNM describe 3 informaciones clave:

- **T** describe cómo de lejos ha crecido el tumor principal (primario) a través de las capas del intestino y si ha crecido en áreas cercanas.
- **N** describe el nivel de propagación a ganglios linfáticos cercanos (regionales).
- **M** indica si el cáncer ha metastatizado.

Los números o letras aparecen detrás de T, N y M para proporcionar más detalles sobre cada uno de estos factores. Los números de 0 a 4 indican gravedad creciente.

Una descripción detallada en relación a cómo se aplica el sistema TNM se ha detallado antes.

Una vez se han determinado las categorías T, N y M de una persona, habitualmente después de cirugía, esta información se combina en un proceso llamado agrupamiento de estadio. El estadio se expresa en números romanos desde el estadio I (el menos avanzado) hasta el estadio IV (el más avanzado). No obstante, a pesar de la aparente precisión teórica con la que los parámetros de estadificación se clasifican, la realidad en términos de evaluar estos parámetros es mucho menos precisa. El método presente ha permitido hacer disponible un sistema de estadificación más sencillo y más fiable. Específicamente, un paciente se evalúa para determinar la probabilidad de que una neoplasia sea una “neoplasia premaligna”, “neoplasia maligna de estadio temprano” o “neoplasia maligna de estadio tardío”. Basado en estos resultados, se puede elegir también realizar una biopsia o algún otro procedimiento diagnóstico. Alternativamente se pueden usar estos resultados para informar qué pauta terapéutica o de cuidado paliativo se debe diseñar e implementar. De ventaja particular es el hecho de que este método permite que se realice ensayo continuado. Esto puede ser particularmente relevante donde se ha identificado una neoplasia premaligna y se ha tomado una decisión de no eliminar quirúrgicamente la neoplasia en primer lugar, sino intentar tratarla.

En el contexto de la presente invención, se debe entender la referencia a “neoplasia premaligna” como una referencia a una neoplasia que no es maligna. Un ejemplo de una neoplasia no maligna es un adenoma. Sin limitar la presente invención en modo alguno, las características histológicas y funcionales de una neoplasia premaligna de intestino grueso son evidencia de crecimiento tisular nuevo, anómalo sin evidencia de invasión.

La referencia a una “neoplasia maligna de estadio temprano” es una referencia a una neoplasia del intestino grueso que se ha vuelto maligna, pero que es improbable que se extienda más allá de la pared intestinal.

Se debe entender la referencia a una “neoplasia maligna de estadio tardío” como una referencia a una neoplasia del intestino grueso que es maligna y que se ha extendido a los ganglios linfáticos u órganos distantes. La referencia a neoplasias malignas de estadio tardío incluye, por ejemplo, neoplasias que se han vuelto metastásicas.

En términos de cribar para la metilación de estas regiones génicas, se debe entender que los ensayos se pueden diseñar para cribar las regiones específicas enumeradas en el presente documento (que corresponden a la hebra “más” del gen) o la hebra “menos” complementaria. Está dentro de la capacidad del experto en la materia elegir que hebra analizar y dirigirse a esa hebra basado en las coordenadas cromosómicas proporcionadas en el presente documento. En algunas circunstancias, se pueden establecer ensayos para cribar ambas hebras.

Sin limitar la presente invención a ninguna teoría o modo de acción, aunque medir los niveles de metilación a través de estas regiones de ADN es diagnóstico de la clasificación de un estado neoplásico del intestino grueso, se ha determinado qué subregiones discretas son particularmente útiles a este respecto ya que estas subregiones contienen una alta densidad de dinucleótidos CpG que con frecuencia están hipermetilados en neoplasias del intestino grueso, tal como cánceres colorrectales. Este hallazgo hace estas subregiones una diana particularmente útil para análisis ya que tanto simplifica el proceso de cribado debido a que una región de ADN más corta más claramente definida requiere análisis como, además, el hecho de que los resultados de estas regiones proporcionarán un resultado significativamente más definitivo en relación a la presencia, o no, de hipermetilación de los que se obtendrían si el análisis se realizara a través de la región de ADN como un todo. Por tanto, este hallazgo tanto simplifica el proceso de cribado como aumenta la sensibilidad del diagnóstico de neoplasia de intestino grueso.

Las subregiones que se ha determinado que muestran utilidad particular se enumeran a continuación con referencia al gen y región cromosómica en la que se encuentran:

- (1) subregiones de BCAT1 chr12:25101992-25102093 (SEQ ID NO:1 o la correspondiente hebra menos) y chr12:25101909-25101995 (SEQ ID NO:2 o la correspondiente hebra menos)
- (2) subregiones de IKZF1: chr7:50343867-50343961 (SEQ ID NO:3 o la correspondiente hebra menos) y chr7:50343804-5033895 (SEQ ID NO:4 o la correspondiente hebra menos)
- (3) subregiones de IRF4: chr6:392036-392145 (SEQ ID NO:5 o la correspondiente hebra menos)
- (4) subregiones de GRASP1: chr12:52399672-52399922, chr12:52400821-52401051 (SEQ ID NO:6 o la correspondiente hebra menos), chr12:52401407-52401664 (SEQ ID NO:7 o la correspondiente hebra menos) y chr12:52400866-52400973 y Chr12:52401107-52401664.
- (5) subregiones de CAHM: chr6:163834295-163834500 (SEQ ID NO:8 o la correspondiente hebra menos), chr6:163834621-163834906 chr6:163834393-163834455 y chr6:163834393-163834519.

Sin limitar la presente invención a ninguna teoría o modo de acción, el experto en la materia puede cribar una o más subregiones para cada marcador génico.

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

El 70-80% de todos los CpG están metilados. Los CpG se pueden agrupar en grupos llamados “islas de CpG” que están presentes en las regiones reguladoras 5' de muchos genes y con frecuencia están sin metilar. En muchos procesos de enfermedad tal como cáncer, los promotores de genes y/o islas CpG adquieren hipermetilación anómala, que se asocia con silenciamiento transcripcional heredable. La metilación de ADN puede tener impacto en la transcripción de genes de dos maneras. Primero, la metilación de ADN puede ella misma impedir físicamente la unión de proteínas transcripcionales al gen, bloqueando así la transcripción. Segundo, el ADN metilado se puede unir a proteínas conocidas como proteínas de dominio de unión a metil-CpG (MBD). Las proteínas MBD reclutan después proteínas adicionales al locus, tal como histona desacetilasas y otras proteínas remodeladoras de cromatina que pueden modificar histonas, formando de esta manera cromatina compacta, inactiva llamada cromatina silenciosa. Este vínculo entre metilación de ADN y estructura de cromatina es muy importante. En particular, la pérdida de proteína 2

de unión de metil-CpG (MeCP2) se ha implicado en el síndrome de Rett y la proteína 2 con dominio de unión a metil-CpG (MBD2) media el silenciamiento transcripcional de genes hipermetilados en cáncer.

En seres humanos, el proceso de metilación de ADN se lleva a cabo por tres enzimas, ADN metiltransferasa 1, 3a y 3b (DNMT1, DNMT3a, DNMT3b). Se piensa que DNMT3a y DNMT3b son las metiltransferasas *de novo* que establecen patrones de metilación de ADN pronto en el desarrollo. DNMT1 es la metiltransferasa de mantenimiento propuesta que es responsable de copiar patrones de metilación de ADN a las hebras hijas durante la replicación del ADN. DNMT3L es una proteína que es homóloga a las otras DNMT3, pero no tiene actividad catalítica. En su lugar, DNMT3L ayuda a las metiltransferasas *de novo* al aumentar su capacidad de unirse a ADN y estimular su actividad. Por último, DNMT2 se ha identificado como un homólogo de ADN metiltransferasa “enigmática”, que contiene los 10 motivos de secuencia comunes a todas las ADN metiltransferasas; sin embargo, DNMT2 no puede metilar ADN, sino en su lugar se ha mostrado que metila un ARN pequeño.

Por tanto, se debe entender “estado de metilación” como una referencia a la presencia, ausencia y/o cantidad de metilación en un nucleótido, o nucleótidos, particular en una región de ADN. El estado de metilación de una secuencia de ADN particular (por ejemplo, región de ADN como se describe en el presente documento) puede indicar el estado de metilación de cada base en la secuencia o puede indicar el estado de metilación de un subconjunto de pares de bases (por ejemplo, de citosinas o el estado de metilación de una o más secuencias de reconocimiento de enzimas de restricción específicas) en la secuencia, o puede indicar información respecto a la densidad de metilación regional en la secuencia sin proporcionar información precisa de dónde en la secuencia se produce la metilación. El estado de metilación se puede opcionalmente representar o indicar por un “valor de metilación”. Un valor de metilación se puede generar, por ejemplo, al cuantificar la cantidad de ADN intacto presente después de digestión de restricción con una enzima de restricción dependiente de metilación. En este ejemplo, si una secuencia particular en el ADN se cuantifica usando PCR cuantitativa, una cantidad de ADN molde aproximadamente igual a un control sin tratar indica que la secuencia no está muy metilada mientras que una cantidad de molde sustancialmente menor del que se produce en la muestra sin tratar indica la presencia de ADN metilado en la secuencia. Según esto, un valor, es decir, un valor de metilación, por ejemplo, del ejemplo descrito anteriormente, representa el estado de metilación y por tanto se puede usar como un indicador cuantitativo del estado de metilación. Esto es de uso particular cuando es deseable comparar el estado de metilación de una secuencia en una muestra a un valor umbral.

Se debe tomar que el término “metilación” significa la presencia de un grupo metilo añadido por la acción de una enzima ADN metiltransferasa a una base o bases de citosina en una región de ácido nucleico, por ejemplo, ADN genómico. Como se describe en el presente documento, hay varios métodos que conocen los expertos en la materia para determinar el nivel o grado de metilación de ácido nucleico.

Mediante “alto nivel” se quiere decir que hay un mayor número de dinucleótidos CpG metilados en el sujeto diagnosticado que en una muestra control, es decir, o bien la proporción de moléculas de ADN metiladas en un sitio CpG particular es mayor o hay un número mayor de sitios CpG separados metilados en el sujeto. Se debe entender que los términos “potenciado” y “aumentado” se usan de forma intercambiable con el término “mayor”.

La presente invención no tiene que estar limitada por un número preciso de residuos metilados que se considera que son diagnósticos de neoplasia en un sujeto, porque se puede producir alguna variación entre muestras de pacientes. La presente invención tampoco está limitada por posicionamiento del residuo metilado.

No obstante, también se ha identificado un número de residuos de citosina específicos que experimentan hipermetilación en estas subregiones. Por tanto, se puede emplear un método de cribado que específicamente se dirige a evaluar el estado de metilación de uno o más de cualquiera de estos residuos o la correspondiente citosina en la posición n+1 en la hebra de ADN opuesta.

Para este fin, en la tabla 2 se detallan los residuos de citosina que se han identificado a este respecto. El experto en la materia debe apreciar que estos residuos individuales están numerados mediante referencia a Hg19, que también corresponde a la numeración de las subregiones específicas enumeradas en el presente documento anteriormente y que se pueden identificar adicionalmente cuando la numeración de coordenadas para cada subregión se aplica a las secuencias de la subregión correspondiente que se proporcionan en la lista de secuencias. Se debe entender que estos residuos se han identificado en el contexto del ADN de la subregión. Sin embargo, hay otros residuos que están hipermetilados fuera de las subregiones mismas, pero dentro de la región de ADN más larga de la que derivan las subregiones. Según esto, estos residuos específicos representan un subconjunto particularmente útil de residuos de citosina individuales que experimentan hipermetilación en el contexto de las regiones y subregiones de ADN divulgadas en el presente documento. Estos residuos individuales se agrupan a continuación según la región de ADN en la que se producen. Estas regiones de ADN se identifican mediante referencia tanto a las coordenadas cromosómicas de Hg19 como al nombre de la región del gen.

En la medida que el método de la presente invención y divulgación incluye analizar la metilación de BCAT1, los residuos objeto:

chr12:25101998	chr12:25102003	chr12:25102006	chr12:25102009
chr12:25102017	chr12:25102022	chr12:25102039	chr12:25102048
chr12:25102050	chr12:25102053	chr12:25102061	chr12:25102063
chr12:25102071	chr12:25101921	chr12:25101934	chr12:25101943
chr12:25101951	chr12:25101962	chr12:25101964	chr12:25101970

o una citosina correspondiente en la posición n+1 de la hebra de ADN opuesta.

5 En la medida que el método de la presente invención y divulgación incluye analizar la metilación de GRASP, los residuos objeto son:

chr12:52399713	chr12:52399731	chr12:52399749	chr12:52399783
chr12:52399796	chr12:52399808	chr12:52399823	chr12:52399835
chr12:52399891			
chr12:52400847	chr12:52400850	chr12:52400859	chr12:52400866
chr12:52400869	chr12:52400873	chr12:52400881	chr12:52400886
chr12:52400893	chr12:52400895	chr12:52400899	chr12:52400902
chr12:52400907	chr12:52400913	chr12:52400919	chr12:52400932
chr12:52400938	chr12:52400958	chr12:52400962	chr12:52400971
chr12:52400973	chr12:52400976	chr12:52400998	chr12:52401008
chr12:52401010	chr12:52401012	chr12:52401016	chr12:52401019
chr12:52401025	chr12:52401041	chr12:52401044	chr12:52401053
chr12:52401060	chr12:52401064	chr12:52401092	chr12:52401118
chr12:52401438	chr12:52401448	chr12:52401460	chr12:52401465
chr12:52401474	chr12:52401477	chr12:52401479	chr12:52401483
chr12:52401504	chr12:52401514	chr12:52401523	chr12:52401540
chr12:52401553	chr12:52401576	chr12:52401588	chr12:52401595
chr12:52401599	chr12:52401604	chr12:52401606	chr12:52401634
chr12:52401640	chr12:52401644	chr12:52401659	
chr12:52401160	chr12:52401165	chr12:52401174	chr12:52401177
chr12:52401179	chr12:52401183	chr12:52401204	chr12:52401215
chr12:52401223	chr12:52401240	chr12:52401253	chr12:52401288
chr12:52401295	chr12:52401299	chr12:52401304	chr12:52401334
chr12:52401340	chr12:52401344	chr12:52401359	

10 o una citosina correspondiente en la posición n+1 de la hebra de ADN opuesta.

En la medida que el método de la presente invención y divulgación incluye analizar la metilación de CAHM, los residuos objeto son:

chr6:163834330	chr6:163834332	chr6:163834357
chr6:163834373	chr6:163834384	chr6:163834390
chr6:163834392	chr6:163834406	chr6:163834412
chr6:163834419	chr6:163834443	chr6:163834448
chr6:163834452	chr6:163834464	chr6:163834483
chr6:163834653	chr6:163834660	chr6:163834672
chr6:163834675	chr6:163834678	chr6:163834681
chr6:163834815	chr6:163834824	chr6:163834835
chr6:163834840	chr6:163834853	chr6:163834855
chr6:163834858	chr6:163834863	chr6:163834869
chr6:163834872		

15 o una citosina correspondiente en la posición n+1 de la hebra de ADN opuesta.

En la medida que el método de la presente invención y divulgación incluye analizar la metilación de IKZF1, los residuos objeto son:

chr7:50343869	chr7:50343872	chr7:50343883
chr7:50343889	chr7:50343890	chr7:50343897
chr7:50343907	chr7:50343909	chr7:50343914
chr7:50343934	chr7:50343939	chr7:50343950
chr7:50343959	chr7:50343805	chr7:50343822
chr7:50343824	chr7:50343826	chr7:50343829
chr7:50343831	chr7:50343833	chr7:50343838
chr7:50343847	chr7:50343850	chr7:50343858
chr7:50343864	chr7:50343869	chr7:50343872
chr7:50343890		

o una citosina correspondiente en la posición n+1 de la hebra de ADN opuesta.

- 5 En la medida que el método de la presente invención y divulgación incluye analizar la metilación de IRF4, los residuos objeto son:

chr6:392036	chr6:392047	chr6:392049
chr6:392057	chr6:392060	chr6:392066
chr6:392080	chr6:392094	chr6:392102
chr6:392131		

- 10 o una citosina correspondiente en la posición n+1 de la hebra de ADN opuesta.

El método de detección de la presente invención se puede realizar en cualquier muestra de sangre adecuada. Para este fin, la referencia a una "muestra de sangre" se debe entender como una referencia a cualquier muestra que deriva de sangre tal como, pero no limitada a, sangre completa, suero o plasma. La muestra de sangre que se ensaya según el método de la presente invención se puede ensayar directamente o puede requerir alguna forma de tratamiento previo al ensayo. Por ejemplo, puede requerir permeabilización previa al ensayo. La muestra de sangre puede ser una muestra de plasma.

- 20 En la medida que la región de ADN de interés está presente en una muestra biológica, la muestra biológica se puede ensayar directamente o si no todo o parte del ácido nucleico presente en la muestra biológica se puede aislar antes del ensayo. En aún otro ejemplo, la muestra se puede purificar parcialmente o enriquecer de otra manera antes del análisis. Por ejemplo, en la medida que una muestra biológica comprende una población celular muy diversa, puede ser deseable enriquecer para una subpoblación de interés particular. Está dentro del ámbito de la presente invención para la población celular diana o moléculas derivadas de la misma ser tratadas antes del ensayo, por ejemplo, inactivación de virus vivos. También se debe entender que la muestra biológica puede ser recién recogida o se puede haber almacenado (por ejemplo, por congelación) antes del ensayo o tratar de otra manera antes del ensayo (tal como experimentar cultivo).

- 30 La elección de qué tipo de muestra es la adecuada para ensayar según el método divulgado en el presente documento dependerá de la naturaleza de la situación.

- 35 Aunque el presente método se dirige a clasificar una neoplasia de intestino grueso, el método de la invención también es útil como un medio para seguir la evolución de la enfermedad. Esto puede ser importante en situaciones tales como donde se ha tomado una decisión de no extirpar un tumor de estadio temprano o, incluso donde se ha realizado cirugía sobre el tumor primario, para seguir el desarrollo de metástasis que pueden no haber sido visualmente detectables en el momento en que se identificó el tumor primario. También se puede buscar seguir un paciente durante una pauta de tratamiento para una neoplasia premaligna o maligna de estadio temprano con el fin de detectar probable transición a una neoplasia maligna de estadio superior.

- 40 El método de la invención se puede usar para evaluar individuos que se sabe o sospecha que tienen una neoplasia o como un ensayo clínico rutinario, es decir, en un individuo que no necesariamente se sospecha tiene una neoplasia.

- 45 Además, los métodos presentes se pueden usar para evaluar la eficacia de un curso de tratamiento. Por ejemplo, se puede evaluar la eficacia de un tratamiento anticáncer al seguir la metilación de ADN de las secuencias descritas en el presente documento a lo largo del tiempo en un mamífero que tiene cáncer.

- 50 El método de la presente invención es, por tanto, útil como un ensayo de una vez o como un seguimiento continuado de esos individuos que se piensa tienen riesgo de desarrollo de neoplasia o como un seguimiento de la eficacia de pautas de tratamiento terapéutico o profiláctico dirigidas a inhibir o ralentizar de otra manera el desarrollo de neoplasia. En estas situaciones, mapear la modulación de los niveles de metilación en una o más clases de muestras biológicas es un indicador valioso del estado de un individuo o la eficacia de una pauta terapéutica o profiláctica que está actualmente en uso.

Se puede usar cualquier método para detectar metilación de ADN en los métodos de la presente invención. Está disponible un número de métodos para la detección de ADN diferencialmente metilado en loci específicos en muestras de tejidos primarios o en muestras de pacientes tal como sangre, orina, heces o saliva (revisado en Kristensen y Hansen *Clin Chem.* 55:1471-83, 2009; Ammerpohl *et al. Biochim Biophys Acta.* 1790:847-62, 2009; Shames *et al. Cancer Lett.* 251:187-98, 2007; Clark *et al. Nat Protoc.* 1:2353-64, 2006). Para el análisis de la proporción o extensión de metilación de ADN en un gen diana, el ADN normalmente se trata con bisulfito de sodio y las regiones de interés se amplifican usando cebadores y condiciones de PCR que amplificarán independientemente del estado de metilación del ADN. La metilación del amplicón global o sitios CpG individuales se puede evaluar después por secuenciación, incluyendo pirosecuenciación, digestión con enzimas de restricción (COBRA) o por análisis de la curva de fusión. Alternativamente, se pueden usar métodos basados en ligación para el análisis de metilación en sitios CpG específicos. La detección de ADN anómalamente metilado liberado de tumores y en fluidos corporales se está desarrollando como un medio de diagnóstico de cáncer. Aquí, en el caso de secuencias hipermetiladas, es necesario usar métodos sensibles que permitan la amplificación selectiva de la secuencia de ADN metilado de un fondo de ADN celular normal que está sin metilar. Tales métodos basados en ADN tratado con bisulfito, por ejemplo, incluyen PCR selectiva de metilación (MSP), PCR Heavymethyl, PCR Headloop y reacción en cadena dependiente de auxiliar (documento PCT/AU2008/001475).

Brevemente, los métodos para detectar metilación pueden incluir cortar aleatoriamente o fragmentar aleatoriamente el ADN genómico, cortar el ADN con una enzima de restricción dependiente de metilación o sensible a metilación y posteriormente identificar y/o analizar selectivamente el ADN cortado o sin cortar. La identificación selectiva puede incluir, por ejemplo, separar el ADN cortado y sin cortar (por ejemplo, por tamaño) y cuantificar una secuencia de interés que se cortó o, alternativamente, que no se cortó. Véase, por ejemplo, la patente en EE UU No. 7.186.512. Alternativamente, el método puede abarcar amplificar ADN intacto después de digestión con enzima de restricción, amplificando de esta manera solo el ADN que no se cortó por la enzima de restricción en el área amplificada. Véase, por ejemplo, la publicación de patente en EE UU 2005/0153316; la publicación de patente en EE UU 2005/0272065; y la publicación de patente en EE UU 2005/0158739. La amplificación se puede realizar usando cebadores que son específicos de gen. Alternativamente, se pueden añadir adaptadores a los extremos del ADN fragmentado al azar, el ADN se puede digerir con una enzima de restricción dependiente de metilación o sensible a metilación, el ADN intacto se puede amplificar usando cebadores que hibridan con las secuencias adaptadoras. En este caso, se puede realizar una segunda etapa para determinar la presencia, ausencia o cantidad de un gen particular en un conjunto amplificado de ADN. El ADN se puede amplificar usando PCR cuantitativa en tiempo real.

El método puede comprender cuantificar la densidad de metilación media en una secuencia diana en una población de ADN genómico. El método puede comprender poner en contacto ADN genómico con una enzima de restricción dependiente de metilación o una enzima de restricción sensible a metilación en condiciones que permiten que al menos algunas copias de potenciales sitios de corte de enzima de restricción en el locus permanezcan sin cortar; cuantificar copias intactas del locus; y comparar la cantidad de producto amplificado a un valor control que representa la cantidad de metilación del ADN control, cuantificando de esta manera la densidad de metilación media en el locus comparado con la densidad de metilación del ADN control.

La cantidad de metilación de un locus de ADN se puede determinar al proporcionar una muestra de ADN genómico que comprende el locus, cortar el ADN con una enzima de restricción que es sensible a metilación o dependiente de metilación, y después cuantificar la cantidad de ADN intacto o cuantificar la cantidad de ADN cortado en el locus de ADN de interés. La cantidad de ADN intacto o cortado dependerá de la cantidad inicial de ADN genómico que contiene el locus, la cantidad de metilación en el locus, y el número (es decir, la fracción) de nucleótidos en el locus que están metilados en el ADN genómico. La cantidad de metilación en un locus de ADN se puede determinar al comparar la cantidad de ADN intacto o ADN cortado con un valor control que representa la cantidad de ADN intacto o ADN cortado en una muestra de ADN tratada de forma similar. El valor control puede representar un número conocido o predicho de nucleótidos metilados. Alternativamente, el valor control puede representar la cantidad de ADN intacto o cortado del mismo locus en otra célula (por ejemplo, normal, no enferma) o un segundo locus.

Al usar al menos una enzima de restricción sensible a metilación o dependiente de metilación en condiciones que permiten que al menos algunas copias de potenciales sitios de corte de enzimas de restricción en el locus permanezcan sin cortar y posteriormente cuantificar las copias intactas restantes y comparar la cantidad a un control, se puede determinar la densidad de metilación media de un locus. Una enzima sensible a metilación es una que corta ADN si su secuencia de reconocimiento está sin metilar mientras que una enzima dependiente de metilación corta ADN si su secuencia de reconocimiento está metilada. Si la enzima de restricción sensible a metilación se pone en contacto con copias de un locus de ADN en condiciones que permiten que al menos algunas copias de los potenciales sitios de corte de la enzima de restricción en el locus permanezcan sin cortar, entonces el ADN intacto restante será directamente proporcional a la densidad de metilación, y por tanto se puede comparar a un control para determinar la densidad de metilación relativa del locus en la muestra. De forma similar, si una enzima de restricción dependiente de metilación se pone en contacto con copias de un locus de ADN en condiciones que permiten que al menos algunas copias de los potenciales sitios de corte de la enzima de restricción en el locus permanezcan sin cortar, entonces el ADN intacto restante será inversamente proporcional a la densidad de metilación, y por tanto se puede comparar a un

control para determinar la densidad de metilación relativa del locus en la muestra. Tales ensayos se divulgan, por ejemplo, en la publicación de patente en EE UU 2005/0153316.

5 Los kits para los métodos anteriores pueden incluir, por ejemplo, uno o más de enzimas de restricción dependientes de metilación, enzimas de restricción sensibles a metilación, reactivos de amplificación (por ejemplo, PCR), sondas y/o cebadores.

10 Se pueden usar métodos de amplificación cuantitativa (por ejemplo, PCR cuantitativa o amplificación lineal cuantitativa) para cuantificar la cantidad de ADN intacto en un locus flanqueado por cebadores de amplificación después de digestión de restricción. Los métodos de amplificación cuantitativa se divulgan, por ejemplo, en las patentes en EE UU No. 6.180.340; 6.033.854; y 5.972.602, así como en, por ejemplo, Gibson *et al.*, *Genome Research* 6:995-1001 (1996); DeGraves, *et al.*, *Biotechniques* 34(1):106-10, 112-5 (2003); Deiman B, *et al.*, *Mol. Biotechnol.* 20(2):163-79 (2002). Las amplificaciones se pueden seguir en "tiempo real".

15 Los métodos adicionales para detectar la metilación de ADN pueden implicar secuenciación genómica antes y después del tratamiento del ADN con bisulfito. Véase, por ejemplo, Frommer *et al.*, *Proc. Natl. Acad. Sci. USA* 89:1827-1831 (1992). Cuando se pone en contacto bisulfito de sodio con ADN, la citosina sin metilar se convierte a uracilo, mientras que la citosina metilada no se modifica.

20 La digestión con enzimas de restricción de productos de PCR amplificados de ADN convertido con bisulfito se puede usar para detectar metilación de ADN. Véase, por ejemplo, Sadri & Hornsby, *Nucl. Acids Res.* 24:5058-5059 (1996); Xiong & Laird, *Nucleic Acids Res.* 25:2532-2534 (1997).

25 Se puede usar una reacción de PCR específica de metilación ("MSP") sola o en combinación con otros métodos para detectar metilación de ADN. Un ensayo MSP implica la modificación inicial de ADN por bisulfito de sodio, que convierte todas las citosinas sin metilar, pero no las metiladas, a uracilo, y posterior amplificación con cebadores específicos para ADN metilado frente a sin metilar. Véase, Herman *et al.* *Proc. Natl. Acad. Sci. USA* 93:9821-9826 (1996); patente en EE UU No. 5.786.146.

30 Un ensayo MethyLight se puede usar solo o en combinación con otros métodos para detectar metilación de ADN (véase, Eads *et al.*, *Cancer Res.* 59:2302-2306 (1999)). Brevemente, en el proceso MethyLight el ADN genómico se convierte en una reacción con bisulfito de sodio (el proceso de bisulfito convierte los residuos de citosina sin metilar a uracilo). Se realiza después la amplificación de una secuencia de ADN de interés usando cebadores de PCR que hibridan con los dinucleótidos CpG. Al usar cebadores que hibridan solo con secuencias resultantes de conversión con bisulfito de ADN metilado (o alternativamente a secuencias sin metilar) la amplificación puede indicar el estado de metilación de secuencias donde los cebadores hibridan. Además, el producto de amplificación se puede detectar con una sonda que se une específicamente a una secuencia resultante del tratamiento con bisulfito de un ADN sin metilar. Si se desea, se pueden usar tanto cebadores como sondas para detectar el estado de metilación. Por tanto, los kits para uso con MethyLight pueden incluir bisulfito de sodio, así como cebadores o sondas detectablemente marcadas (incluyendo, pero no limitadas a, sondas Taqman o balizas moleculares) que distinguen entre ADN metilado y sin metilar que se han tratado con bisulfito. Otros componentes del kit pueden incluir, por ejemplo, reactivos necesarios para la amplificación del ADN incluyendo, pero no limitados a, tampones de PCR, desoxinucleótidos; y una polimerasa termoestable.

45 Una reacción Ms-SNuPE (extensión de cebador de nucleótido único sensible a metilación) se puede usar sola o en combinación con otros métodos para detectar metilación de ADN (véase, Gonzalgo & Jones, *Nucleic Acids Res.* 25:2529-2531 (1997)). La técnica Ms-SNuPE es un método cuantitativo para evaluar diferencias de metilación en sitios CpG específicos basada en el tratamiento con bisulfito de ADN, seguido por extensión de cebador de nucleótido único (Gonzalgo & Jones, anteriormente). Brevemente, el ADN genómico se hace reaccionar con bisulfito de sodio para convertir la citosina sin metilar a uracilo mientras deja la 5-metilcitosina sin cambiar. La amplificación de la secuencia diana deseada se realiza después usando cebadores de PCR específicos para ADN convertido con bisulfito, y el producto resultante se aísla y usa como molde para el análisis de metilación en el/los sitio(s) CpG de interés.

55 Los reactivos típicos (por ejemplo, como se podrían encontrar en un kit basado en Ms-SNuPE típico) para el análisis por Ms-SNuPE pueden incluir, pero no están limitados a: cebadores de PCR para gen específico (o secuencia de ADN alterada por metilación o isla CpG); tampones de PCR optimizados y desoxinucleótidos; kit de extracción de gel; cebadores control positivo; cebadores de Ms-SNuPE para un gen específico; tampón de reacción (para la reacción de Ms-SNuPE); y nucleótidos detectablemente marcados. Además, los reactivos de conversión con bisulfito pueden incluir: tampón de desnaturalización de ADN; tampón de sulfonación; reactivos o kit de recuperación de ADN (por ejemplo, precipitación, ultrafiltración, columna de afinidad); tampón de desulfonación; y componentes de recuperación de ADN.

65 Los métodos de detección de metilación adicionales incluyen, pero no están limitados a, amplificación de islas CpG metiladas (véase, Toyota *et al.*, *Cancer Res.* 59:2307-12 (1999)) y los descritos en, por ejemplo, publicación de patente en EE UU 2005/0069879; Rein, *et al.* *Nucleic Acids Res.* 26 (10): 2255-64 (1998); Olek, *et al.* *Nat. Genet.* 17(3): 275-6 (1997); y la publicación PCT No. WO 00/70090.

Se proporciona información más detallada en relación a varios de estos métodos generalmente descritos a continuación:

5 (a) Diseño y/o producción de sonda o cebador

Varios métodos descritos en el presente documento para el diagnóstico de una neoplasia usan una o más sondas y/o cebadores. Los métodos para diseñar sondas y/o cebadores para uso en, por ejemplo, PCR o hibridación se conocen en la técnica y se describen, por ejemplo, en Dieffenbach y Dveksler (Eds) (En: PCR Primer: A Laboratory Manual, Cold Spring Harbor Laboratories, NY, 1995). Además, varios paquetes de software están públicamente disponibles que diseñan sondas y/o cebadores óptimos para una variedad de ensayos, por ejemplo, Primer 3 disponible del Centro para Investigación Genómica, Cambridge, Mass., EE UU.

Claramente, el potencial uso de la sonda o cebador se debe considerar durante su diseño. Por ejemplo, si la sonda o cebador se produce para uso en un ensayo de PCR específico de metilación o reacción en cadena de la ligasa (LCR) el nucleótido en el extremo 3' (o extremo 5' en el caso de LCR) debe corresponder preferiblemente a un nucleótido metilado en un ácido nucleico.

Se evalúan sondas y/o cebadores útiles para la detección de una secuencia asociada con una neoplasia, por ejemplo, para determinar las que no forman horquillas, autocebado o forman dímeros de cebador (por ejemplo, con otra sonda o cebador usado en un ensayo de detección). Además, una sonda o cebador (o la secuencia de los mismos) con frecuencia se evalúa para determinar la temperatura a la que se desnaturaliza de un ácido nucleico diana (es decir, la temperatura de fusión de la sonda o cebador, o T_m). Los métodos para estimar la T_m se conocen en la técnica y se describen, por ejemplo, en Santa Lucia, *Proc. Natl. Acad. Sci. USA*, 95: 1460-1465, 1995 o Bresslauer *et al.*, *Proc. Natl. Acad. Sci. USA*, 83: 3746-3750, 1986.

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

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

45 (b) Digestión de ADN con endonucleasa sensible a metilación

En un ejemplo, la metilación aumentada en una muestra se determina usando un proceso que comprende tratar el ácido nucleico con una cantidad de una enzima endonucleasa de restricción sensible a metilación en condiciones suficientes para que el ácido nucleico se digiera y después detectar los fragmentos producidos. Las endonucleasas sensibles a metilación ejemplares incluyen, por ejemplo, HhaI o HpaII. Preferiblemente, los ensayos incluyen controles internos que se digieren con una enzima insensible a metilación que tiene la misma especificidad que la enzima sensible a metilación empleada. Por ejemplo, la enzima insensible a metilación MspI es un isoesquizómero de la enzima sensible a metilación HpaII.

55 Formatos de ensayo de hibridación

En un ejemplo, la digestión de ácido nucleico se detecta por hibridación selectiva de una sonda o cebador al ácido nucleico sin digerir. Alternativamente, la sonda hibrida selectivamente con el ácido nucleico tanto digerido como sin digerir, pero facilita la diferenciación entre ambas formas, por ejemplo, por electroforesis. Los métodos de detección adecuados para lograr la hibridación selectiva a una sonda de hibridación incluyen, por ejemplo, Southern u otra hibridación de ácido nucleico (Kawai *et al.*, *Mol. Cell. Biol.* 14:7421-7427, 1994; Gonzalgo *et al.*, *Cancer Res.* 57:594-599, 1997).

Las condiciones de hibridación adecuadas se determinan basándose en la temperatura de fusión (T_m) de un dúplex de ácido nucleico que comprende la sonda. El experto en la materia será consciente de que las condiciones de la reacción de hibridación óptimas se deben determinar empíricamente para cada sonda, aunque se pueden aplicar

algunas generalidades. Preferiblemente, las hibridaciones que emplean sondas de oligonucleótidos cortas se realizan de baja a media rigurosidad. En el caso de una sonda o cebador rico en GC o una sonda o cebador más largo se prefiere una hibridación y/o lavado de alta rigurosidad. Se define una rigurosidad alta en el presente documento como que es una hibridación y/o lavado llevado a cabo en tampón aproximadamente SSC 0,1 X y/o SDS a aproximadamente el 0,1% (p/v), o menor concentración de sal, y/o a una temperatura de al menos 65°C, o condiciones equivalentes. La referencia en el presente documento a un nivel particular de rigurosidad abarca condiciones equivalentes que usan soluciones de lavado/hibridación diferentes a SSC conocidas a los expertos en la materia.

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

Formatos de ensayo de amplificación

En un ejemplo alternativo, los fragmentos producidos por la enzima de restricción se detectan usando un sistema de amplificación, tal como, por ejemplo, reacción en cadena de la polimerasa (PCR), amplificación por círculo rodante (RCA), reacción en cadena de la polimerasa inversa (iPCR), PCR in situ (Singer-Sam *et al.*, *Nucl. Acids Res.* 18:687, 1990), amplificación por desplazamiento de hebra (SDA) o tecnología de sonda de ciclo.

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

La amplificación por desplazamiento de la hebra (SDA) utiliza cebadores de oligonucleótido, una ADN polimerasa y una endonucleasa de restricción para amplificar una secuencia diana. Los oligonucleótidos se hibridan a un ácido nucleico diana y la polimerasa se usa para producir una copia de la región entremedias de los sitios de hibridación de los cebadores. Los dúplex de ácido nucleico copiado y ácido nucleico diana se mellan después con una endonucleasa que específicamente reconoce una secuencia al principio del ácido nucleico copiado. La ADN polimerasa reconoce el ADN mellado y produce otra copia de la región diana al mismo tiempo que desplaza el ácido nucleico previamente generado. La ventaja de la SDA es que se produce en un formato isotérmico, facilitando mediante ello el análisis de alto rendimiento automatizado.

La tecnología de sonda de ciclo usa un cebador sintético quimérico que comprende ADN-ARN-ADN que es capaz de hibridar a una secuencia diana. Tras la hibridación a una secuencia diana el dúplex ARN-ADN formado es una diana para RNasaH que corta de esta manera el cebador. El cebador cortado se detecta después, por ejemplo, usando espectrometría de masas o electroforesis.

Para cebadores que flanquean o están adyacentes a un sitio de reconocimiento de endonucleasa sensible a metilación, se prefiere que tales cebadores flanqueen solo esos sitios que están hipermetilados en neoplasia para asegurar que se produce un producto de amplificación diagnóstico. A este respecto, un producto de amplificación solo se producirá cuando el sitio de restricción no se corta, es decir, cuando está metilado. Según esto, la detección de un producto de amplificación indica que el/los dinucleótido(s) CpG de interés está(n) metilado(s).

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

Los ácidos nucleicos amplificados en general se analizan usando, por ejemplo, electroforesis en gel de agarosa no desnaturante, electroforesis en gel de poliacrilamida no desnaturante, espectrometría de masas, cromatografía líquida (por ejemplo, HPLC o dHPLC), o electroforesis capilar (por ejemplo, MALDI-TOF). Los métodos de detección de alto rendimiento, tal como, por ejemplo, desorción/ionización láser asistida por matriz tiempo de vuelo (MALDI-TOF), ionización de electrospray (ESI), espectrometría de masas (incluyendo espectrometría de masas en tandem, por ejemplo, LC MS/MS), tecnología de biosensores, tecnología de fibra óptica evanescente o tecnología de chip de

ADN (por ejemplo, documentos WO98/49557; WO 96/17958; Fodor *et al.*, *Science* 767-773, 1991; patente en EE UU No. 5.143.854; y patente en EE UU No. 5.837.832), son especialmente preferidos para todos los formatos de ensayo descritos en el presente documento. Alternativamente, la amplificación de un ácido nucleico se puede seguir de forma continua usando un método de análisis de curva de fusión como se describe en el presente documento y/o en, por ejemplo, la patente en EE UU No. 6.174.670.

(c) *Otros formatos de ensayo*

En un ejemplo alternativo, la metilación aumentada en una muestra se determina al realizar un proceso que comprende tratar cromatina que contiene el ácido nucleico con una cantidad de DNasa I en condiciones suficientes para que el ácido nucleico se digiera y después detectar los fragmentos producidos. Este formato de ensayo está basado en el entendimiento que la cromatina que contiene ADN metilado, por ejemplo, ADN hipermetilado, tiene una conformación más herméticamente cerrada que el ADN no hipermetilado y, como consecuencia, es menos susceptible a la digestión por DNasa I.

Según este método, se producen fragmentos de ADN de diferentes longitudes por la digestión con DNasa I de ADN metilado comparado con no metilado. Tales diferentes fragmentos de ADN se detectan, por ejemplo, usando un ensayo descrito anteriormente. Alternativamente, los fragmentos de ADN se detectan usando PCR-SSCP esencialmente como se describe, por ejemplo, en Gregory y Feil, *Nucleic Acids Res.*, 27, e32i-e32iv, 1999. Al adaptar PCR-SSCP a la presente invención, los cebadores de amplificación que flanquean o comprenden uno o más dinucleótidos CpG en un ácido nucleico que son resistentes a digestión con DNasa I en una muestra de neoplasia, pero no resistentes a digestión con DNasa I en un control sano/normal o muestra de prueba sano/normal se usan para amplificar los fragmentos generados por DNasa I. En este caso, la producción de un fragmento de ácido nucleico específico usando DNasa I es diagnóstico de neoplasia, porque el ADN no se degrada de forma eficaz. En contraste, un ADN molde de una muestra de un sujeto sano/normal se degrada por la acción de DNasa I y, como consecuencia, la amplificación falla para producir un producto de amplificación discreto. Métodos alternativos a PCR-SSCP, tal como, por ejemplo, PCR-dHPLC también son conocidos en la técnica y contemplados por la presente invención.

(d) *Mutagénesis selectiva de ADN no metilado*

En un método alternativo la metilación aumentada en una muestra se determina usando un proceso que comprende tratar el ácido nucleico con una cantidad de un compuesto que selectivamente muta un residuo de citosina no metilada en un dinucleótido CpG en condiciones suficientes para inducir mutagénesis.

Los compuestos preferidos mutan citosina a uracilo o timidina, tal como, por ejemplo, una sal de bisulfito, por ejemplo, bisulfito de sodio o bisulfito de potasio (Frommmer *et al.*, 1992, anteriormente). Se sabe que el tratamiento con bisulfito de ADN distingue residuos de citosina metilada de no metilada, al mutar los residuos de citosina que no están protegidos por metilación, incluyendo residuos de citosina que no están en un dinucleótido CpG o que está colocados en un dinucleótido CpG que no es objeto de metilación.

Detección basada en secuencia

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

Como el tratamiento de ácido nucleico con un compuesto tal como, por ejemplo, bisulfito produce que las citosinas no metiladas muten a uracilo (y por tanto timidina después de un proceso de amplificación), el análisis de la secuencia determina la presencia o ausencia de un nucleótido metilado. Por ejemplo, comparar la secuencia obtenida usando una muestra control o una muestra que no se ha tratado con bisulfito, o la secuencia de nucleótidos conocida de la región de interés con una muestra tratada facilita la detección de diferencias en la secuencia de nucleótidos. Cualquier residuo de timidina detectado en el sitio de una citosina en la muestra tratada comparada con una muestra control o sin tratar se puede considerar que está causada por mutación como resultado del tratamiento con bisulfito. Los métodos adecuados para la detección de metilación usando secuenciación de ácido nucleico tratado con bisulfito se describen, por ejemplo, en Frommmer *et al.*, 1992, anteriormente o Clark *et al.*, *Nucl. Acids Res.* 22:2990-2997, 1994.

En otro método la presencia de un nucleótido mutado o no mutado en una muestra tratada con bisulfito se detecta usando pirosecuenciación, tal como, por ejemplo, se describe en Uhlmann *et al.*, *Electrophoresis*, 23: 4072-4079, 2002. Esencialmente este método es una forma de secuenciación en tiempo real que usa un cebador que hibrida con un sitio adyacente o cercano al sitio de una citosina que está metilada. Después de la hibridación del cebador y el molde en presencia de una ADN polimerasa cada uno de los cuatro desoxinucleótidos trifosfato modificados se añaden por separado según un orden de dispensación predeterminado. Solo un nucleótido añadido que es complementario a

la muestra tratada con bisulfito se incorpora y se libera pirofosfato inorgánico (PPi). El PPi después dirige una reacción resultante en la producción de niveles detectables de luz. Tal método permite la determinación de la identidad de un nucleótido específico adyacente al sitio de hibridación del cebador.

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

10 Un método relacionado para determinar la secuencia de un nucleótido tratado con bisulfito es la extensión de cebador de nucleótido único sensible a metilación (Me-SnuPE) o SNaPmeth. Los métodos adecuados se describen, por ejemplo, en Gonzalgo y Jones, 1997, anteriormente, o Uhlmann *et al.*, *Electrophoresis*, 23:4072-4079, 2002. Se usa un oligonucleótido que hibrida con la región de un ácido nucleico adyacente al sitio de una citosina que está metilada. Este oligonucleótido se usa después en un protocolo de extensión de cebador con una polimerasa y un nucleótido difosfato libre o didesoxinucleótido trifosfato que corresponde a cualquiera de las posibles bases que se producen en este sitio después de tratamiento con bisulfito (es decir, timina o citosina). Preferiblemente, el nucleótido difosfato está marcado con un marcador detectable (por ejemplo, un fluoróforo). Después de la extensión del cebador, los nucleótidos difosfato marcados no unidos se eliminan, por ejemplo, usando cromatografía de exclusión molecular o electroforesis, o se hidrolizan, usando, por ejemplo, fosfatasa alcalina, y la incorporación del nucleótido marcado al oligonucleótido se detecta, lo que indica la base que está presente en el sitio.

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

25 Formato de ensayo basado en endonucleasa de restricción

En un método, la presencia de una secuencia no mutada se detecta usando análisis de restricción con bisulfito combinado (COBRA) esencialmente como se describe en Xiong y Laird, 2001, anteriormente. Este método explota las diferencias en los sitios de reconocimiento de enzimas de restricción entre ácido nucleico metilado y no metilado después de tratamiento con un compuesto que selectivamente muta un residuo de citosina no metilada, por ejemplo, bisulfito.

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

45 Forma de ensayo de lectura positiva

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

La metilación aumentada en una muestra de un sujeto se puede determinar usando un proceso que comprende:

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

En este contexto, el término "hibridación selectiva" significa que la hibridación de un sonda o cebador al ácido nucleico no mutado se produce a una mayor frecuencia o tasa, o tiene una velocidad de reacción máxima mayor, que la hibridación de la misma sonda o cebador a la secuencia mutada correspondiente. Preferiblemente, la sonda o cebador no hibrida con la secuencia no metilada que lleva la(s) mutación(es) en las condiciones de reacción usadas.

Formato de ensayo basado en hibridación

La hibridación se puede detectar usando Southern, transferencia en mancha, transferencia por ranura u otros medios de hibridación de ácidos nucleicos (Kawai *et al.*, 1994, anteriormente; Gonzalgo *et al.*, 1997, anteriormente). Sujeto a selección de sonda apropiada, tales formatos de ensayo en general se describen en el presente documento anteriormente y se aplican, mutatis mutandis, al enfoque de mutagénesis selectiva actualmente descrito.

Preferiblemente, se emplea un formato de reacción en cadena de la ligasa para distinguir entre un ácido nucleico mutado y no mutado. La reacción en cadena de la ligasa (descrita en el documento EP 320.308 y la patente en EE UU No. 4.883.750) usa al menos dos sondas oligonucleotídicas que hibridan con un ácido nucleico diana de tal modo que están yuxtapuestas en el ácido nucleico diana. En un ensayo de reacción en cadena de la ligasa, el ácido nucleico diana se hibrida con una primera sonda que es complementaria a una porción diagnóstica de la secuencia diana (la sonda diagnóstica), por ejemplo, un ácido nucleico que comprende uno o más dinucleótido(s) CpG metilado(s), y con una segunda sonda que es complementaria a una secuencia de nucleótidos contigua a la porción diagnóstica (la sonda contigua), en condiciones en donde la sonda diagnóstica permanece unida sustancialmente solo al ácido nucleico diana. Las sondas diagnóstica y contigua pueden ser de diferentes longitudes y/o tener diferentes temperaturas de fusión de modo que la rigurosidad de la hibridación se puede ajustar para permitir su hibridación selectiva a la diana, en donde la sonda que tiene la mayor temperatura de fusión hibrida a mayor rigurosidad y, después de lavar para eliminar la sonda no unida y/o no selectivamente unida, la otra sonda que tiene la temperatura de fusión menor se hibrida a menor rigurosidad. La sonda diagnóstica y la sonda contigua se ligan después covalentemente tal como, por ejemplo, usando ADN ligasa T4, para producir de esta manera una sonda diana más larga que es complementaria a la secuencia diana, y las sondas que no se ligan se eliminan modificando la rigurosidad de hibridación. A este respecto, las sondas que no se han ligado hibridarán selectivamente en condiciones de hibridación menos rigurosas que las sondas que se han ligado. Según esto, la rigurosidad de la hibridación se puede aumentar a una rigurosidad que es al menos tan alta como la rigurosidad usada para hibridar la sonda más larga, y preferiblemente a una mayor rigurosidad debido a la longitud aumentada contribuida por la sonda más corta después de la ligación.

En otro ejemplo, una o ambas de las sondas se marca(n) de modo que la presencia o ausencia de la secuencia diana se puede ensayar al fundir el dúplex diana-sonda, eluir la sonda disociada, y ensayar para el/los marcador(es). Donde ambas sondas están marcadas, se usan diferentes ligandos para permitir la distinción entre las sondas ligadas y no ligadas, en cuyo caso la presencia de ambos marcadores en la misma fracción de eluato confirma el suceso de ligación. Si el ácido nucleico diana está unido a una matriz sólida, por ejemplo, en formato de ensayo de hibridación por Southern, hibridación por ranuras, hibridación en mancha o microchip, la presencia de las sondas tanto diagnóstica como contigua se puede determinar directamente.

Las micromatrices específicas de metilación (MSO) también son útiles para diferenciar entre una secuencia mutada y no mutada. Se describe un método adecuado, por ejemplo, en Ardojan *et al. Nucl. Acids Res.*, 30: e21, 2002. MSO usa ácido nucleico que se ha tratado con un compuesto que selectivamente muta un residuo de citosina no metilada (por ejemplo, bisulfito) como molde para una reacción de amplificación que amplifica ácido nucleico tanto mutante como no mutado. La amplificación se realiza con al menos un cebador que comprende un marcador detectable, tal como, por ejemplo, un fluoróforo, por ejemplo, Cy3 o Cy5.

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

Los productos de amplificación marcados se hibridan después a los oligonucleótidos en la micromatriz en condiciones que permiten la detección de diferencias de nucleótidos únicos. Después de lavar para eliminar el producto de amplificación no unido, la hibridación se detecta usando, por ejemplo, un escáner de micromatriz. Este método no solo permite la determinación del estado de metilación de un gran número de dinucleótidos CpG, también es semicuantitativo, lo que permite la determinación del grado de metilación en cada dinucleótido CpG analizado. Como puede haber algún grado de heterogeneidad de metilación en una muestra única, tal cuantificación puede ayudar en el diagnóstico de cáncer.

Formato de ensayo basado en amplificación

En un ejemplo alternativo, la hibridación se detecta usando un sistema de amplificación. En formatos de PCR específica de metilación (MSP; Herman *et al. Proc. Natl. Acad. Sci. USA* 93:9821-9826, 1992), la hibridación se detecta usando un proceso que comprende amplificar el ADN tratado con bisulfito. Según esto, al usar una o más sondas o cebadores que hibridan específicamente con la secuencia sin mutar en condiciones de rigurosidad moderada y/o alta un producto de amplificación solo se produce usando una muestra que comprende un nucleótido metilado. Se proporcionan ensayos alternativos que proporcionan la amplificación selectiva del componente metilado o sin metilar de una mezcla de ADN tratado con bisulfito por Cottrell *et al., Nucl. Acids Res.* 32: e10, 2003 (HeavyMethyl PCR),

Rand *et al.* *Nucl. Acids Res.* 33:e127, 2005 (Headloop PCR), Rand *et al.* *Epigenetics* 1:94-100, 2006 (PCR con desnaturalización diferencial con bisulfito) y documento PCT/AU07/000389 (PCR específica de extremo).

Cualquier formato de ensayo de amplificación descrito en el presente documento se puede usar, tal como, por ejemplo, reacción en cadena de la polimerasa (PCR), amplificación por círculo rodante (RCA), reacción en cadena de la polimerasa inversa (iPCR), PCR in situ (Singer-Sam *et al.*, 1990, anteriormente), amplificación por desplazamiento de la hebra, o tecnología de sonda en ciclo. Se han desarrollado técnicas de PCR para la detección de mutaciones génicas (Kuppuswamy *et al.*, *Proc. Natl. Acad. Sci. USA* 88:1143-1147, 1991) y cuantificación de expresión alélica específica (Szabo y Mann, *Genes Dev.* 9: 3097-3108, 1995; y Singer-Sam *et al.*, *PCR Methods Appl.* 1: 160-163, 1992). Tales técnicas usan cebadores internos, que hibridan a un molde generado por PCR y terminan inmediatamente 5' del nucleótido único que se va a ensayar. Tal formato se combina fácilmente con la reacción en cadena de la ligasa como se ha descrito en el presente documento anteriormente. El uso de un formato de ensayo cuantitativo en tiempo real también es útil. Sujeto a la selección de cebadores apropiados, tales formatos de ensayo en general se describen en el presente documento anteriormente y se aplican, mutatis mutandis, al enfoque de mutagénesis selectiva actualmente descrito.

El análisis de curvas de fusión específicas de metilación (esencialmente como se describe en Worm *et al.*, *Clin. Chem.*, 47:1183-1189, 2001) también se contempla por la presente invención. Este proceso explota la diferencia en temperatura de fusión en los productos de amplificación producidos usando ácido nucleico metilado o no metilado tratado con bisulfito. En esencia, se realiza una amplificación no discriminatoria de una muestra tratada con bisulfito en presencia de un colorante fluorescente que específicamente se une a ADN bicatenario (por ejemplo, SYBR Green I). Al aumentar la temperatura del producto de amplificación mientras se sigue la fluorescencia las propiedades de fusión y por tanto la secuencia del producto de amplificación se determina. Una disminución en la fluorescencia refleja fusión de al menos un dominio en el producto de amplificación. La temperatura a la que la fluorescencia disminuye es indicativa de la secuencia de nucleótidos del ácido nucleico amplificado, permitiendo de esta manera determinar el nucleótido en el sitio de uno o más dinucleótidos CpG.

La presente invención también abarca el uso de formas cuantitativas en tiempo real de PCR tal como, por ejemplo, TaqMan (Holland *et al.*, *Proc. Natl. Acad. Sci. USA*, 88:7276-7280, 1991; Lee *et al.*, *Nucleic Acid Res.* 21:3761-3766, 1993) para realizar este aspecto. Por ejemplo, el método MethylLight de Eads *et al.*, *Nucl. Acids Res.* 28: E32, 2000 usa un ensayo TaqMan modificado para detectar metilación de un dinucleótido CpG. Esencialmente, este método comprende tratar una muestra de ácido nucleico con bisulfito y amplificar el ácido nucleico que comprende uno o más dinucleótidos CpG que están metilados en una célula neoplásica y no en una muestra control usando una reacción de amplificación, por ejemplo, PCR. La reacción de amplificación se realiza en presencia de tres oligonucleótidos, un cebador directo e inverso que flanquean la región de interés y una sonda que hibrida entre los dos cebadores al sitio de uno o más dinucleótidos CpG metilados. La sonda está marcada dual con un indicador fluorescente en 5' y un extinguidor en 3' (o viceversa). Cuando la sonda está intacta, el colorante extinguidor absorbe la fluorescencia del indicador debido a su proximidad. Después de hibridación al producto de PCR la sonda se corta por la actividad exonucleasa 5' a 3' de, por ejemplo, ADN polimerasa Taq. Este corte libera el indicador del extinguidor produciendo de esta manera una señal de fluorescencia aumentada que se puede usar para estimar el nivel de metilación del molde inicial. Al usar una sonda o cebador que selectivamente hibrida con el ácido nucleico sin mutar (es decir, ácido nucleico metilado) el nivel de metilación se determina, por ejemplo, usando una curva estándar.

Alternativamente, más que usar una sonda marcada que requiere corte, se usa una sonda, tal como, por ejemplo, una baliza molecular (véase, por ejemplo, Mhlanga y Malmberg, *Methods* 25:463-471, 2001). Las balizas moleculares son moléculas de ácido nucleico monocatenario con una estructura de tallo y bucle. La estructura de bucle es complementaria a la región que rodea el uno o más dinucleótidos CpG que están metilados en una muestra neoplásica y no en una muestra control. La estructura de tallo se forma al hibridar dos "brazos" complementarios entre sí, que están en cada lado de la sonda (bucle). Una fracción fluorescente está unida a un brazo y una fracción extinguidora que suprime cualquier fluorescencia detectable cuando la baliza molecular no está unida a la secuencia diana está unida al otro brazo. Tras la unión de la región bucle a su ácido nucleico diana los brazos se separan y la fluorescencia es detectable. Sin embargo, incluso un mal emparejamiento de una única base altera significativamente el nivel de fluorescencia detectada en una muestra. Según esto, la presencia o ausencia de una base particular se determina por el nivel de fluorescencia detectada. Tal ensayo facilita la detección de uno o más sitios mutados (es decir, nucleótidos metilados) en un ácido nucleico.

Las moléculas de ácido nucleico bloqueado (ANB) fluorescentemente marcadas o moléculas de ácido proteínucleico (APN) fluorescentemente marcado son útiles para la detección de diferencias de nucleótidos (por ejemplo, como se describe en Simeonov y Nikiforov, *Nucleic Acids Research*, 30(17):1-5, 2002). Las moléculas de ANB y APN se unen, con alta afinidad, a ácido nucleico, en particular, ADN. Los fluoróforos (en particular, rodamina o hexaclorofluoresceína) conjugados a la sonda de ANB o APN fluorescen a un nivel significativamente mayor tras la hibridación de la sonda al ácido nucleico diana. Sin embargo, el nivel de aumento de la fluorescencia no está aumentado al mismo nivel cuando se produce un mal emparejamiento incluso de un único nucleótido. Según esto, el grado de fluorescencia detectado en una muestra es indicativo de la presencia de un mal emparejamiento entre la sonda de ANB o APN y el ácido nucleico diana, tal como, en presencia de una citosina mutada en un dinucleótido CpG metilado. Preferiblemente, la tecnología de ANB o APN fluorescentemente marcado se usa para detectar al menos un cambio de una sola base en

un ácido nucleico que se ha amplificado previamente usando, por ejemplo, un método de amplificación conocido en la técnica y/o descrito en el presente documento.

Como será aparente para el experto en la materia, la tecnología de detección de ANB o APN es sensible a detección de alto rendimiento de uno o más marcadores inmovilizando una sonda de ANB o APN a un soporte sólido, como se describe en Orum *et al.*, *Clin. Chem.* 45:1898-1905, 1999.

Alternativamente, se usa un ensayo en tiempo real, tal como, por ejemplo, el denominado ensayo HeavyMethyl (Cottrell *et al.*, 2003, anteriormente) para determinar la presencia o nivel de metilación de un ácido nucleico en una muestra de prueba. Esencialmente, este método usa uno o más bloqueadores de ácido nucleico no extensibles (por ejemplo, oligonucleótidos) que se unen al ácido nucleico tratado con bisulfito de una manera específica de metilación (es decir, el/los bloqueador(es) se une(n) específicamente a ADN no mutado en condiciones de rigurosidad moderada a alta). Se realiza una reacción de amplificación usando uno o más cebadores que opcionalmente pueden ser específicos de metilación, pero que flanquean el uno o más bloqueadores. En presencia de ácido nucleico no metilado (es decir, ADN no mutado), el/los bloqueador(es) se une(n) y no se produce producto de PCR. Usando un ensayo TaqMan esencialmente como se ha descrito anteriormente se determina el nivel de metilación de ácido nucleico en una muestra.

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

Como con otros formatos de ensayo basados en amplificación, el producto de amplificación se analiza usando una gama de procedimientos, incluyendo electroforesis en gel, filtración en gel, espectrometría de masas, y en el caso de cebadores marcados, identificar el marcador en el producto de amplificación. Alternativamente, la digestión con enzimas de restricción de los productos de PCR amplificados de un ADN convertido por bisulfito se realiza esencialmente como se describe por Sadri y Hornsby, *Nucl. Acids Res.* 24:5058-5059, 1996; y Xiong y Laird, *Nucl. Acids Res.* 25:2532-2534, 1997), para analizar el producto formado.

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

Como con los otros formatos de ensayo descritos en el presente documento que utilizan sistemas de detección de hibridación y/o amplificación, las combinaciones de tales procesos como se describen en el presente documento anteriormente están particularmente contempladas por los formatos de ensayo basados en mutagénesis selectiva de la presente divulgación. En un ejemplo, la metilación aumentada se detecta al realizar un proceso que comprende:

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

Ensayos de lectura negativa

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

Preferiblemente, la metilación reducida se determina usando un proceso que comprende:

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

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

Formato de ensayo basado en hibridación

La hibridación se puede detectar usando Southern, transferencia en mancha, transferencia por ranura u otros medios de hibridación de ácidos nucleicos (Kawai *et al.*, 1994, anteriormente; Gonzalgo *et al.*, 1997, anteriormente). Sujeto a selección de sonda apropiada, tales formatos de ensayo en general se describen en el presente documento anteriormente y se aplican, mutatis mutandis, al enfoque de mutagénesis selectiva actualmente descrito. Preferiblemente, se emplea un formato de reacción en cadena de la ligasa para distinguir entre un ácido nucleico no mutado y mutado. A este respecto, los requisitos y condiciones del ensayo son como se han descrito en el presente documento anteriormente para ensayos de lectura positiva y aplica, mutatis mutandis, al presente formato. Sin embargo, la selección de sondas será diferente. Para ensayos de lectura negativa, se seleccionan una o más sondas que selectivamente hibridan con la secuencia mutada más que con la secuencia no mutada.

Preferiblemente, la(s) sonda(s) de la reacción en cadena de la ligasa tienen secuencias 3'-terminal y/o 5'-terminal que comprenden un dinucleótido CpG que no está metilado en una muestra control sana, pero está hipermetilado en cáncer, de modo que la sonda diagnóstica y la sonda contigua son capaces de ligarse solo cuando la citosina del dinucleótido CpG está mutada a timidina, por ejemplo, en el caso de un residuo de citosina no metilada.

Como será aparente para el experto en la materia, el método MSO descrito anteriormente es para cualquiera o ambos ensayos de lectura positiva y/o negativa. Esto es porque el ensayo descrito detecta secuencias tanto mutadas como no mutadas facilitando de esta manera determinar el nivel de metilación. Sin embargo, la divulgación contempla un ensayo que detecta solo secuencias metiladas o no metiladas.

Formato de ensayo basado en amplificación

En un ejemplo alternativo, la hibridación se detecta usando un sistema de amplificación que usa cualquier formato de ensayo de amplificación como se ha descrito en el presente documento para ensayo de lectura positiva, aunque usando cebadores (y sondas donde sea aplicable) que selectivamente hibridan a un ácido nucleico mutado.

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

En un ejemplo, la metilación reducida en el sujeto control normal/sano se detecta al realizar un proceso que comprende:

- (i) tratar el ácido nucleico con una cantidad de un compuesto que selectivamente muta un residuo de citosina no metilada en condiciones suficientes para inducir mutagénesis produciendo mediante ello un ácido nucleico mutado;
- (ii) hibridar el ácido nucleico con dos cebadores no solapantes y no complementarios cada uno de los cuales comprende una secuencia de nucleótidos que es complementaria a una secuencia en el ADN que comprende un residuo de citosina mutada en condiciones tales que se produce la hibridación del ácido nucleico mutado;
- (iii) amplificar el ácido nucleico intermedio de los cebadores hibridados produciendo mediante ello un fragmento de ADN que consiste en una secuencia que comprende una secuencia de cebador;
- (iv) hibridar el fragmento de ADN amplificado a una sonda que comprende una secuencia de nucleótidos que corresponde o es complementaria a una secuencia que comprende un residuo de citosina mutada en condiciones tales que se produce la hibridación al ácido nucleico no mutado; y
- (v) detectar la hibridación.

Como será aparente para el experto en la materia, un ensayo de lectura negativa preferiblemente incluye una muestra control adecuada para asegurar que el resultado negativo está producido por ácido nucleico metilado más que una reacción que falla.

- 5 También se describen en el presente documento kits para la detección y/o cuantificación de las secuencias diagnósticas de la divulgación, o expresión o metilación de las mismas usando los métodos descritos en el presente documento.

10 Para kits para la detección de metilación, los kits pueden comprender al menos un polinucleótido que hibrida con al menos una de las secuencias diagnósticas descritas en el presente documento y al menos un reactivo para la detección de metilación génica. Los reactivos para la detección de metilación incluyen, por ejemplo, bisulfito de sodio, polinucleótidos diseñados para hibridar con una secuencia que es el producto de una secuencia biomarcadora descrita en el presente documento si la secuencia biomarcadora no está metilada (por ejemplo, que contiene al menos una conversión C→U), y/o una enzima de restricción sensible a metilación o dependiente de metilación. Los kits también
15 pueden incluir secuencias de ADN natural o sintético control que representan formas metiladas o sin metilar de la secuencia. Los kits pueden proporcionar soportes sólidos en forma de un aparato de ensayo que se adapta para uso en el ensayo. Los kits pueden además comprender marcadores detectables, opcionalmente unidos a un polinucleótido, por ejemplo, una sonda, en el kit. Otros materiales útiles en la realización de los ensayos también pueden estar incluidos en los kits, incluyendo, tubos de ensayo, pipetas de transferencia, y similares. Los kits también pueden incluir
20 instrucciones escritas para el uso de uno o más de estos reactivos en cualquiera de los ensayos descritos en el presente documento.

La presente invención se describe además mediante referencia a los siguientes ejemplos no limitantes.

25 Ejemplos

Materiales y Métodos

Recogida de muestras

30 Se adquirieron muestras de ADN de tejidos a través de un banco de muestras comercial (BioServe, @, EE UU) y un banco de tejidos de hospital de referencia terciario en Adelaida, Australia. Las muestras de plasma sanguíneo se adquirieron de un banco de muestras comercial (Proteogenex, Culver City, CA) y hospital de referencia terciario en Adelaida, Australia. Las muestras de sangre se clasificaron como normal, adenoma o cáncer basado en resultados de colonoscopia verificados (donde fuera apropiado) por histopatología. Esto también identificó el estadio del cáncer. Se
35 sacó sangre periférica en tubos de sangre VACUETTE con K₃EDTA (Greiner-One, Monroe, NC) y se transportó al laboratorio de procesamiento en hielo. La sangre completa se centrifugó a 1.500 g (4°C) durante 10 minutos a las 4 horas de la extracción de sangre y se recogió el plasma. El plasma se centrifugó una segunda vez a 1.500 g (4°C) durante 10 minutos, donde después el plasma se recogió y almacenó a -80°C hasta uso posterior.

Extracción de ADN de tejido & conversión con bisulfito

Las muestras de tejido se homogenizaron usando un homogenizador de bolas y el ADN genómico se extrajo con un kit de purificación de ADN genómico Wizard® (Promega, Sidney, Australia).

45 El ADN comercialmente adquirido fue extraído por BioServe (MD, EE UU). La concentración de ADN se determinó por un espectrofotómetro Nanodrop ND 1000 20 (Nanodrop Technologies, Wilmington, DE). Se usó el kit EZ DNA Methylation-Gold (Zymo Research Corporation, Orange, CA, EE UU) para la conversión con bisulfito de 1 µg de ADN extraído de tejido según las instrucciones del fabricante con la siguiente modificación a las condiciones de ciclo de la reacción de bisulfito: 99°C durante 5 minutos, 60°C durante 25 minutos, 99°C durante 5 minutos, 60°C durante 85 minutos, 99°C durante 5 minutos y 60°C durante 175 minutos. La concentración del ADN convertido con bisulfito purificado se determinó por qPCR usando cebadores específicos de conversión con bisulfito para beta-actina [ACTB1] como se describe en la tabla 1 previamente por Devos *et al.* (*Clin. Chem.*, 2009; 55(7):1337-1346). Las muestras de
50 ADN convertido con bisulfito se almacenaron a -80°C hasta uso posterior.

Extracción de ADN de plasma & conversión con bisulfito

Se preparó ADN de 4 ml de plasma usando el kit QiAamp Circulating Nucleic Acid (QIAGEN, Dusseldorf, Alemania) según las especificaciones del fabricante con las siguientes modificaciones: La columna se lavó dos veces con 750 µl de ACW2 y dos veces con 750 µl de etanol absoluto (200 proof). El ADN resultante se eluyó en 35 µl de tampón AVE y este eluato se reaplicó después a la columna y se eluyó de nuevo para aumentar la concentración del ADN. El protocolo optimizado produjo una mejora del 20% en el rendimiento de ADN comparado con el protocolo del fabricante recomendado (datos no mostrados). El volumen final de ADN de plasma fue ~32 µl por 4 ml de plasma de paciente. Se usó PCR en tiempo real para medir la recuperación de ADN total: se usaron 2 x alícuotas de 1 µl del ADN de
65 plasma resultante en un ensayo CFF1 previamente descrito (Devos *et al.* 2009. *Clin Chem*) (Tabla 1).

Todas las PCR se realizaron en el sistema de PCR en tiempo real LightCycler 480, modelo II (Roche). Se usó una dilución en serie de 4 veces de ADN de sangre genómico sonicado (Roche, Mannheim, Alemania) como un estándar para determinar la cantidad (ng) de ADN extraído por ml de plasma. 30 µl de ADN extraído de 4 ml de plasma se limpiaron de proteínas de unión a ADN por incubación a 37°C durante 1 hora después de añadir 3 µl de un tampón de lisis que consistía en ARNt 1 mg/ml, proteinasa K 2 mg/ml y SDS al 10%. Las muestras se convirtieron con bisulfito posteriormente usando o bien el kit EZ DNA Methylation-Gold Kit™ como recomienda el fabricante (Zymo Research Corporation, Orange, CA, EE UU), con la misma modificación a las condiciones de ciclos térmicos descritas anteriormente, o el kit Epitect Plus DNA Bisulfite usando el reactivo de bisulfito Epitect Fasta (QIAGEN, Dusseldorf, Alemania) usando las condiciones recomendadas por el fabricante. En ambos casos, el ADN purificado se eluyó con 40 µl de agua sin nucleasa. La concentración de ADN de bisulfito resultante se calculó analizando 2 µl en el ensayo de PCR de ACTB como se ha descrito anteriormente. Alícuotas de 5 µl por triplicado de los 36 µl resultantes de ADN convertido con bisulfito extraído de 4 ml de plasma (el equivalente de 555 µl de plasma por alícuota) se analizaron en ensayos de qPCR específicos de metilación como se describe posteriormente.

Medida de metilación

Se diseñaron los cebadores y sondas oligonucleotídicos específicos de metilación para preguntar el estado de metilación de sitios en CAHM, GRASP, IRF4, BCTA1 e IKZF1. Se realizó PCR en triplicado en ADN de tejido convertido con bisulfito (5 ng) o 5 µl de ADN de plasma en un volumen total de 15 µl (véase la tabla 1 para secuencias de cebador/sonda y condiciones de reacción). Los picos de fusión de 78,4°C $\pm$ 0,9° (CAHM) y 82,9° $\pm$ 0,3° (IKZF1) eran característicos para los amplicones que se corrieron sin sonda. Los niveles de metilación se cuantificaron frente a una curva estándar interna que consistía en una dilución en serie de ADN metilado cortado convertido con bisulfito (ADN metilado universal CpGenome, Chemicon, Temecula, CA, EE UU) en un fondo de ADN de glóbulos blancos convertido con bisulfito cortado (Roche, Mannheim, Alemania). La curva estándar contenía los siguientes puntos de dilución 5000-, 1250-, 312,5-, 78,125, 19,53-, 4,88-, 1,22-, y 0 pg de mCpG en un fondo de ADN de GB (5 ng de ADN total por reacción).

Estimación de probabilidades de clase

Se instaló el lenguaje de programación de fuente abierta R y medio para computación estadística y gráficos (<http://www.r-project.org>) en un sistema de ordenador personal estándar Intel IA-32 y se usó para acceder y procesar datos de entrada que representan los niveles de metilación medidos y categorías no neoplásicas y neoplásicas observadas correspondientes, como se describe a continuación.

Específicamente, la masa de CAHM metilada observada por clasificación de fenotipo (Fig. 1B) se usó para determinar los gráficos de densidad de probabilidad empírica para clases de fenotipo (pre maligno, cáncer de estadio temprano, cáncer de estadio tardío) (Fig. 3A), y los valores estimados de media y desviación estándar se usaron después para generar los gráficos de densidad modelada de la figura 3B asumiendo que los niveles de metilación observados se extraían de una distribución normal. Las distribuciones de densidad se usaron después para estimar la probabilidad que un nivel de metilación de CAHM ensayado para una muestra de paciente se extrae de una de estas clasificaciones.

Usando solo niveles de metilación positivos (es decir, mayores de cero) determinados para muestras de plasma de fenotipo conocido (y mostrado en la figura 1B), los perfiles de distribución estimados correspondientes se muestran en la figura 3B. Estas funciones de densidad se usaron para calcular la probabilidad relativa de que una muestra de plasma con un nivel de CAHM metilada de 2,8 pg, 148 pg o 22.000 pg es probable que se extraiga de un paciente diagnosticado con lesiones colorrectales clasificadas como premalignas (es decir, adenoma), cáncer de estadio temprano (estadio 1 o estadio 2), o cáncer de estadio tardío (estadio 3 o estadio 4).

Log(metil-CAHM pg)	Probabilidad relativa (normalizada a premaligno)		
	Premaligno	Cáncer de estadio temprano	Cáncer de estadio tardío
1,0 (2,8 pg)	1,0	1,0	0,175
5,0 (148 pg)	1,0	3,2	4,95
10,0 (22.000 pg)	1,0	8,3	627

Estos datos también se usaron para estimar la probabilidad de que una muestra de plasma de una clasificación conocida diera un nivel de metilación observado igual a o mayor que los niveles de metilación de CAHM hipotéticos. Usando las funciones de densidad de probabilidad mostradas en la figura 3B y determinadas de los niveles de metilación de CAHM en bruto mostrados en la figura 1B, se determinó que solo el 3,0% de las muestras de plasma premalignas se encontraron que contenían al menos 148 pg de CAHM metilada, mientras que el 66% de los cánceres de estadio tardío muestra 148 pg de metilación o más (valor relativo de 23:1). Además, una muestra de plasma que da 22 ng de CAHM metilada es aproximadamente 1600 veces más probable que se extraiga de un paciente con cáncer tardío que un paciente con una neoplasia premaligna.

	Probabilidad acumulada de que CAHM metilada sea mayor que o igual a (proporción respecto a premaligno)		
Log(metil-CAHM pg)	Premaligno	Cáncer de estadio temprano	Cáncer de estadio tardío
1,0	36% (1,0)	68% (1,8)	96% (2,6)
5,0	3% (1),0	12% (4,1)	66% (23,2)
10,0	0,0058% (1,0)	0,052% (8)	9% (1600)

Los expertos en la materia apreciarán que la invención descrita en el presente documento es susceptible a variaciones y modificaciones diferentes de las específicamente descritas. Se debe entender que la invención incluye todas tales variaciones y modificaciones. La invención también incluye todas las etapas, características, composiciones y compuestos a que se hace referencia o indicados en esta especificación, individual o colectivamente, y cualquiera y todas las combinaciones de cualesquiera dos o más de dichas etapas o características.

Tabla 1: Secuencias de oligonucleótidos y condiciones de reacción para PCR, PCR específica de metilación y ensayos de metilación

PCR	Secuencia de cebador/sonda	Mezcla maestra	Condiciones de ciclado
CAHM	Directo: GAAGGAAGTATTTTCGAGTACGATTGAC Inverso: CCCGAACGCAACGACTTAA	Cada reacción de 15 µl contenía: 0,1 µl de ADN polimerasa Platinum Taq 5 U/µl (Invitrogen), 1,5 µl de tampón Platinum 10X (Invitrogen), 0,9 µl de MgCl ₂ 50 mM (f 3 mM final, Invitrogen), 0,3 µl de dNTPs 10 mM (200 uM, final, Promega), 0,1 µl de cebadores directo e inverso (50 uM/200 nM, final) y 0,125 µl de SYBR Green 1/1000 y agua sin nucleasa	Activación - 95°C 2 min 3 ciclos: 92°C 15 seg (4,4°C/seg), 62°C 15 seg (2,2°C/seg), 72°C 20 seg 50 ciclos: 82°C 15 seg (4,4°C/seg), 63°C 15 seg (2,2°C/seg), 72°C 20 seg Enfriamiento - 40°C 5 seg (2,2°C/seg) seguido por análisis de fusión para confirmar el producto correcto
GRASP	Directo: CGGAAGTCGCGTTCGTC Inverso: GCGTACAACCTCGTCCGCTAA Sonda: [HEX] TTCGATTTCGGGATTTTTGTCGTAGTC[BHQ1]	Cada reacción de 15 µl contenía: 0,1 µl de ADN polimerasa Platinum Taq 5 U/µl (Invitrogen), 1,5 µl de tampón Platinum 10X (Invitrogen), 1,2 µl de MgCl ₂ 50 mM (4 mM final, Invitrogen), 0,3 µl de dNTPs 10 mM (0,2 mM, final, Promega), 0,06 µl de cebadores directo e inverso (50 uM/200 nM, final) y 0,03 ul de sonda (sol. madre 50 uM/final 100 nM)	Activación - 95°C 2 min 3 ciclos: 92°C 15 seg (4,4°C/seg), 64°C 15 seg (2,2°C/seg), 72°C 20 seg (4,4°C/seg) 47 ciclos: 85°C 15 seg (4,4°C/seg), 64°C 15 seg (2,2°C/seg), 72°C 20 seg (4,4°C/seg) Enfriamiento - 40°C 10 seg (2,2°C/seg)
IRF4	Directo: TGGGTGTTTTGGACGGTTTC Inverso: CGCCTACCCTCCGCG Sonda: [HEX] TCGTTTAGTTTGTGGCGATTCGTCG {BHQ1}	Cada reacción de 15 µl contenía: 0,1 µl de ADN polimerasa Platinum Taq 5 U/µl (Invitrogen), 1,5 µl de tampón Platinum 10X (Invitrogen), 1,2 µl de MgCl ₂ 50 mM (4 mM final, Invitrogen), 0,3 µl de dNTPs 10 mM (0,2 mM, final, Promega), 0,12 µl de cebadores directo e inverso (50 uM/400 nM, final) y 0,3 ul de sonda (sol. madre 10 uM/final 200 nM)	Activación - 95°C 2 min 3 ciclos: 95°C 15 seg (4,4°C/seg), 64°C 30 seg (2,2°C/seg), 72°C 30 seg (4,4°C/seg) 50 ciclos: 86°C 15 seg (4,4°C/seg), 62°C 30 seg (2,2°C/seg), 72°C 30 seg (4,4°C/seg) Enfriamiento - 40°C 10 seg (2,2°C/seg)
BCAT1	Directo: GTTTTTTTGTTGATGTAATTCGTTAGGTC Inverso: CAATACCCGAAACGACGACG Sonda: HEX-5' TTCGTCGCGAGAGGGTCCGTT-BHQ	Cada reacción de 15 µl contenía: 0,1 µl de ADN polimerasa Platinum Taq 5 U/µl (Invitrogen), 1,5 µl de tampón Platinum 10X (Invitrogen), 1,2 µl de MgCl ₂ 50 mM (4 mM final, Invitrogen), 0,3 µl de dNTPs 10 mM (0,2 mM, final, Promega), 0,06 µl de cebadores directo e inverso (50 uM/200 nM, final) y 0,15 ul de sonda (sol. madre 10 uM/final 100 nM)	Activación - 95°C 2 min 50 ciclos: 95°C 15 seg (4,4°C/seg), 62°C 30 seg (2,2°C/seg), 72°C 30 seg (4,4°C/seg) Enfriamiento - 40°C 5 seg (2,2°C/seg)
IKZF1	Directo: GACGACGTATTTTTTCGTGTTTC Inverso: GCGCACCTCTCGACCG	Cada reacción de 15 µl contenía: 7,5 µl de tampón Go Taq Hot Start 2X sin MgCl ₂ , 0,3 µl de MgCl ₂ 50 mM (4 mM final, Invitrogen), 0,06 µl de cebadores	Activación - 95°C 2 min 50 ciclos: 95°C 15 seg (4,4°C/seg), 62°C 30 seg (2,2°C/seg), 72°C 30 seg (4,4°C/seg)

PCR	Secuencia de cebador/sonda	Mezcla maestra	Condiciones de ciclado
		directo e inverso (50 uM/200 nM, final) y 0,15 ul de SYBR (1:1000 sol. madre/1:100.000 final)	<u>Enfriamiento</u> - 40°C 5 seg (2,2°C/seg)
CFFI	Directo: TAAGAGTAATAATGGATGGATGATG Inverso: CCTCCCATCTCCCTTCC Sonda: 6FAM-ATGGATGAAGAAAGAAAGGATGAGT-BHQ-1	Cada reacción de 15 µl contenía: 0,15 µl de ADN polimerasa Platinum Taq 5 U/µl (Invitrogen), 1,5 µl de tampón Platinum 10X (Invitrogen), 0,9 µl de MgCl ₂ 50 mM (3 mM final, Invitrogen), 0,3 µl de dNTPs 10 mM (0,2 mM, final, Promega), 0,189 µl de cebadores directo e inverso (50 uM/200 nM, final) y 0,3 ul de sonda (sol. madre 10 uM/final 200 nM)	<u>Activación</u> - 95°C 2 min <u>50 ciclos</u> : 95°C 10 seg (4,4°C/seg), 58°C 60 seg (2,2°C/seg) <u>Enfriamiento</u> - 40°C 5 seg (2,2°C/seg)
β-actina	Directo: GTGATGGAGGAGGTTTAGTAAGTT Inverso: CCAATAAACCTACTCCTCCCTTAA Sonda: FAM-ACCACCACCAACACACAATAACAAACACA-BHQ 1	Cada reacción de 15 µl contenía: 0,15 µl de ADN polimerasa Platinum Taq 5 U/µl (Invitrogen), 1,5 µl de tampón Platinum 10X (Invitrogen), 0,6 µl de MgCl ₂ 50 mM (2 mM final, Invitrogen), 0,3 µl de dNTPs 10 mM (0,2 mM, final, Promega), 0,27 µl de cebadores directo e inverso (50 uM/900 nM, final) y 0,15 ul de sonda (sol. madre 10 uM/final 100 nM)	<u>Activación</u> - 95°C 2 min <u>60 ciclos</u> : 95°C 10 seg (4,4°C/seg), 57°C 40 seg (2,2°C/seg), 72°C 10 seg (4,4°C/seg) <u>Enfriamiento</u> - 40°C 5 seg (2,2°C/seg)

Gen	Hebra genómica	Subregión(es) actuales de interés (secuencia genómica)	Coordenadas de subregión(es)	Secuencia convertida con bisulfito resultante (hebras ya no complementarias)	Secuencias de oligonucleótidos para medida de los niveles de metilación
1					
2					
3					
4					
5					
6					
7					
8					
9					
10					
11					
12					
13					
14					
15					
16					
17					
18					
19					
20					
21					
22					
23					
24					
25					
26					
27					
28					
29					
30					
31					
32					
33					
34					
35					
36					
37					
38					
39					
40					
41					
42					
43					
44					
45					
46					
47					
48					
49					
50					
51					
52					
53					
54					
55					
56					
57					
58					
59					
60					
61					
62					
63					
64					
65					
66					
67					
68					
69					
70					
71					
72					
73					
74					
75					
76					
77					
78					
79					
80					
81					
82					
83					
84					
85					
86					
87					
88					
89					
90					
91					
92					
93					
94					
95					
96					
97					
98					
99					
100					

BCAT1	hebra superior	5'-cagtgccCtaggcCgGcGgCgagtaacCgtagC GagctgagcagacCgcccctCgGgCgagacCgC GacctagCCgattgcatcagcaggaagac (SEQ ID No: 1)	25,101,992 - 25,102,093		5'-tagtgcCtaggcCgGcGgCgagtaacCgtagCgagtgga tgtagatCggtttt CGCgCgagatCCGattagCGatt gatttaggaagat	5'-gattttgttgatgaattcgttagctc 5'-caataccggaacgacgacg 5'-ttcgtcgcagagagcgggt 5'-ttttgttgatgaattcgttagctc 5'-attacaaccgacctctcg
	hebra menos	3'-gtcagcggCctccGcCgCgCcaatgCcaacGCc cgactaacctgGcCgaggagatCGCgCctctgaCGCGCt ggatcCGctaaccagtagctgctctcg			3'-gttaggcCtttGCtGCtGCtgcgtGatGatGcttagttaag ttg GCtggagagCGGCtGCtga CGCGtggatGcttaagt agttgtttttg	
	hebra superior	5'-agatcccaagggtCtagcccttgccCgttgtagcCg gtctgcGctctcagacCGCGctccCGctgcagcagacctgg ggcagt (SEQ ID No: 2)	25,101,909 - 25,101,995		Esta secuencia es para medir niveles de metilación de CpG usando enzimas de restricción sensibles a metilación (por ejemplo, HpaII, HhaI (subrayado))	5'-agatcccaagggtgcttagc 5'-actgccccagctctgct
	hebra menos	3'-tctagggttccaCGatcggggaccgCacacctgGCc cagacGCcagcgtctCGCcgaggGcagcgtcttgagacc ccgtca				
	hebra superior	5'-gaCGaCGacacctctCgtgtccCGctctCGccctt ctgCGCtccctCGctctcagacCGagcagCGatcCGggag gCGgcCGagaggtcGc (SEQ ID No: 3)	50,343,867 - 50,343,961		5'-gacGacGaatttt tCgtgtGctt gCGttttttgCGCG tttCgtttttgtatCGgagtagCGatCGggaggtGgtCGagagg tgCGt	5'-gaagcagtaatttttctgcttc 5'-gcgacctctcgaccg 5'-ttgtatcggagtagcgttcgggag
IKZF1	hebra menos	3'-ctGtGcGtggggagagGacagagCGagacCGgg gaagacCGCGgggGcggagacagGCGctctgGctagGc ctctccGcgGctctcaacGcG			3'-ttGCGCgtagggagagGatagagCGagatGcgggaa gatGCGgggGcggagagGcttgtGctagGcttttGct ggCtt ttatCGg	
	hebra superior	5'-cCGagtgCGcagagaCGCGGcCGCGG agcCGggggacCGcGacGgggCGgggaCGggaCGa CGacctctCGtccGctct (SEQ ID No: 4)	50,343,804 - 50,343,895		Esta secuencia es para medir niveles de metilación de CpG usando enzimas de restricción sensibles a metilación (por ejemplo, HpaII, HhaI (subrayado))	5'-ggagtgctgctgagac 5'-agagcggacacggaga

Gen	Hebra genómica	Subregión(es) actuales de interés (secuencia genómica)	Coordenadas de subregión(es)	Secuencia convertida con bisulfito resultante (hebras ya no complementarias)	Secuencias de oligonucleótidos para medida de los niveles de metilación
	hebra superior	5'-gacagagacacagccagcaggttaggtgctcCgagagcccccGggtgagagCggtcCggtgctgCgcCGcGgCgttcctactcttgagagagtgCgtgagagcCctctgactcCgatagacacactcCgagggagactccCgattctggcctggagggctgCgtctggcccccCgtctgacGtaCggtggCgtCgagggccacgtctctggactctgCggaacCGacCGacgtggaggggtCCgagg (SEQ ID No: 7)	52,401,407 - 52,401,664	5'-gatagagatattttagaagttagaagttCgagagtttCggtgggagagCggtcCggtggtgCgtcCGcgtgCgtttttgaggaagcGgtggggagcCgtgattCgagatgattttCgagggattttCgatttgggtgggggtgCgttgggtttacCgtgaCgtacCggtcCGCgaggggttgggatttggcGgaacCGacGtagtggaggggtCgagg	5'-gagagtaggggtttttacg 5'-cgataaaaaaacgaaccga 5'-aggatgagaaacgtacgtggc
	hebra menos	3'-ctgtctctgtgggggtgcttgcacttccagCctctgggggGtaccctcttCccgGtccagcagCgCGGacGCaaggtgagactcttcaacGtaccctctgGgagtgagCctatgtgtggagGtCctccctgggggGtCtaagagaccaccccccagcGcggaggggggtCgagactGCaGcccGCGctccgggtacgagggagctgaagacaGccttgGctGctGctaccctcccaGCGtcc		3'-tgtttgtgtgggggttttaatttggCgtggggGctatttttGctgGCGattgatGcGCGCgtacGaaagagagagattttatGCaatttGCGgagagGctattgtgtgggaagCcttttggagggGctaaagattgatttttggagGCGggatgggggtGcagatGCaGctttGCGcttgggtgaggggattgaagataGcttggCcttGcttattttttaGCGgtt	5'-cgaagtaggggtttttacg 5'-cgataaaaaaacgaaccga 5'-aggatgagaaacgtacgtggc
	hebra superior	5'-gacagagacagcccccagcaggttaggtgctcCgagagccccCGgtggggagagCGggccGgtgggtgCgcCGCgtgCcttctactcttgagagagtgCgtggggagcCctgactcCGgataagacacactcCgagggagactccCgattctgggttgggggtccctgCcttggggcccccCctctgacGtaCgtggcCGCgagggccactgctctctggactctgCtggaaCggaCgaggtggaggggtgCgagg		Esta secuencia es para medir niveles de metilación de CpG usando enzimas de restricción sensibles a metilación (por ejemplo, HhaII, HhaI (subrayado))	5'-cgaagtaggggtttttacg 5'-cgaagtaggggtttttacg
	hebra menos	3'-ctgtctctgtgggggtgcttgcacttccagCctctgggggGtaccctcttCccgGtccagcagCgCGGacGCaaggtgagactcttcaacGtaccctctgGgagtgagCctatgtgtggagagCtCctccctgggggGtCtaagagaccaccccccagcGcggaggggggtCgagactGCaGcccGCGctccgggtacgagggagctgaagacaGccttgGctGctGctaccctcccaGCGtcc			
	hebra superior	5'-atctgtaaaaaagtgactcttgcctttcagactaCGCgaacagctctatttctactcagCgctctacttcccaCgtgaaacacGccacCGCgaagagagacattCgagcaCGactgaCGctccccctattattgtctaaGcGtgcCGctCgtgctgtgctacCGatttttttcaagaa (SEQ ID No: 8)	163,834,295 - 163,834,500		5'-gagagtaggggtttttacg 5'-cgataaaaaaacgaaccga 5'-aggatgagaaacgtacgtggc
CARM	hebra superior	5'-atctgtaaaaaagtgactcttgcctttcagactaCGCgaacagctctatttctactcagCgctctacttcccaCgtgaaacacGccacCGCgaagagagacattCgagcaCGactgaCGctccccctattattgtctaaGcGtgcCGctCgtgctgtgctacCGatttttttcaagaa (SEQ ID No: 8)			5'-gagagtaggggtttttacg 5'-cgataaaaaaacgaaccga 5'-aggatgagaaacgtacgtggc

Gen	Hebra genómica	Subregión(es) actuales de interés (secuencia genómica)	Coordenadas de subregión(es)	Secuencia convertida con bisulfito resultante (hebras ya no complementarias)	Secuencias de oligonucleótidos para medida de los niveles de metilación
	hebra menos	3'-tagacatttttaactgaagacgaaagctctgatGCGCg tgtcggagaataaaggatgacGc cgaagtaaggagatGccttg actGcggtaGCGCttccttcgtaaaGcctgGcctgactGcggag gggaataaataacgattcGc gacGCGgaGccagaccgatGcT aaacgaaagtctttatGccttcacgttgtct		3'-tagaatttttaantgaagatgaanagtttgaGCGcgttggag aaataaaggatGcctgaagtaaggagatGccttgatGcggta GCGCttt tgaataaGcctt GcctgattGcgaaggaataaataag attgGCGatGCGgaGCGcttagattgatGc'aaatgaagttttatGcTt tta igtgttt	5'-gaacacataacccatcg 5'-cgtagtagattcgaagcgtag 5'-aggaggaggttagtcgtgtcgaaa
	hebra menos	3'-cgGcAcgaacgaagtcggagagtcgttttagtGcctgt gGccttcttggtGcCgCgCtGcctcccccGcAGCGCG CacgaagggaGc cGcTgtttcGcctcggGc cccGCGCGCGC cgGcctccGCGCGcGcgtcaggGcgtctccGcctGCGg GCGCGcgtGCGCGgaGccttcggagttgagataggaGCGg agaggGCGgggggtggagGCGggGcgtcgtcttgGCGCGg CaccGc cggGCGcGcggcttcttgggggtggcggggagGCG tgGcAc	163.834.621 163.834.906	tgCatagaagaagttgagagttgatttagGccttgGcctttttggt GcctGcctGcctttttGcAcGCGCGcgaaggggaGcTGC tgtttGccttg GcctGCGCGcGcgtGcctttGcGCGcgttt taggGcgtttttGcctGCGCGcgtGcctGCGcgaGccttttgag tttgaataagggaGcctgaagaggGcggggtagagGcgggGcgttg gttttgGCGCGcGcctGccttttgGccttgGccttttttgggttg ggagGCG tgGcAc	5'-gttttttggcgataaagc 5'-cgctctacgaactctacg 5'-cgctggtcgaaggcgcttc

Bibliografía

- Adorjan *et al.* *Nucl. Acids Res.*, 30: e21, 2002
 Ammerpohl *et al.* *Biochim Biophys Acta.* 1790:847-62, 2009
 5 Beaucage, *et al.* *Tetrahedron Letters* 22:1859-1862, 1981
 Caruthers, M. H., *et al.*, *Methods in Enzymology*, Vol. 154, pp. 287-314 (1988)
 Chen y Kwok, *Nucleic Acids Res.* 25:347-353, 1997
 Clark *et al.* *Nat Protoc.* 1:2353-64, 2006
 Cottrell *et al.*, *Nucl. Acids Res.* 32: e10, 2003
 10 DeGraves, *et al.*, *Biotechniques* 34(1):106-10, 112-5 (2003)
 Deiman B, *et al.*, *Mol. Biotechnol.* 20(2):163-79 (2002)
 Devos *et al.* (*Clin. Chem.*, 2009; 55(7):1337-1346
 Eads *et al.*, *Cancer Res.* 59:2302-2306 (1999)
 Eads *et al.*, *Nucl. Acids Res.* 28: E32, 2000
 15 Egholm *et al.*, *Am. Chem. Soc.*, 114:1895, 1992
 Egholm *et al.*, *Nature*, 365:566, 1993
 Fodor *et al.*, *Science* 267:767-773, 1991
 Frommer *et al.*, *Proc. Natl. Acad. Sci. USA* 89:1827-1831 (1992)
 Gibson *et al.*, *Genome Research* 6:995-1001 (1996)
 20 Golub *et al.*, *Science*, 286:531-537, 1999
 Gonzalgo & Jones, *Nucleic Acids Res.* 25:2529-2531 (1997)
 Gonzalgo *et al.*, *Cancer Res.* 57:594-599, 1997
 Gregory y Feil, *Nucleic Acids Res.*, 27, e32i-e32iv, 1999
 Herman *et al.* *Proc. Natl. Acad. Sci. USA* 93:9821-9826, 1992
 25 Holland *et al.*, *Proc. Natl. Acad. Sci. USA*, 88:7276-7280, 1991
 Kawai *et al.*, *Mol. Cell. Biol.* 14:7421-7427, 1994
 Kristensen y Hansen *Clin Chem.* 55:1471-83, 2009
 Kuppaswamy *et al.*, *Proc. Natl. Acad. Sci. USA* 88:1143-1147, 1991
 Landegren *et al.*, *Genome Res.*, 8(8): 769-776, 1998
 30 Lee *et al.*, *Nucleic Acid Res.* 21:3761-3766, 1993
 Markowitz y Bertagnoli (2009). *N. Engl. J. Med.* 361(25):2449-60
 Messing, *Methods Enzymol*, 101, 20-78, 1983
 Mhlanga y Malmberg, *Methods* 25:463-471, 2001
 Narang, *et al.* *Meth. Enzymol* 68: 90, 1979
 35 Nielsen *et al.* *J. Chem. Soc. Perkin Trans.*, 1:3423, 1997
 Olek, *et al.* *Nat. Genet.* 17(3): 275-6 (1997)
 Orum *et al.*, *Clin. Chem.* 45:1898-1905, 1999
 Orum *et al.*, *Nucl. Acids Res.*, 21:5332, 1993
 Rand *et al.* *Epigenetics* 1:94-100, 2006
 40 Rand *et al.* *Nucl. Acids Res.* 33:e127, 2005
 Rein, *et al.* *Nucleic Acids Res.* 26 (10): 2255-64 (1998)
 Sadri y Hornsby, *Nucl. Acids Res.* 24:5058-5059, 1996
 Sambrook *et al.*, *Molecular Cloning, A Laboratory Manual* (2ª Ed., CSHP, Nueva York 1989)
 Shames *et al.* *Cancer Lett.* 251:187-98, 2007
 45 Simeonov y Nikiforov, *Nucleic Acids Research*, 30(17):1-5, 2002
 Singer-Sam *et al.*, *Nucl. Acids Res.* 18:687, 1990
 Singer-Sam *et al.*, *PCR Methods Appl.* 1: 160-163, 1992
 Singh y Wengel, *Chem. Commun.* 1247, 1998
 Southern *et al.*, *Genomics*, 13:1008-1017, 1992
 50 Szabo y Mann, *Genes Dev.* 9: 3097-3108, 1995
 Toyota *et al.*, *Cancer Res.* 59:2307-12 (1999)
 Uhlmann *et al.*, *Electrophoresis*, 23: 4072-4079, 2002
 Worm *et al.*, *Clin. Chem.*, 47:1183-1189, 2001
 Xiong y Laird, *Nucl. Acids Res.* 25:2532-2534, 1997
 55 Zyskind *et al.*, *Recombinant DNA Laboratory Manual*, (Acad. Press, 1988)

Lista de secuencias

- <110> Clinical Genomics Pty. Ltd.
 60 Baker, Rohan
 Pedersen, Susanne
 LaPointe, Lawrence
 Gaur, Snigdha
 Thomas, Melissa
 65
 <120> UN MÉTODO DE CRIBADO

<130> 35203180/TDO

<150> 61/648821

5 <151> 18-05-2012

<160> 8

<170> PatentIn versión 3.5

10 <210> 1
<211> 102
<212> ADN
<213> humano

15 <400> 1
cagtgtcccga ggcggcgggc agtacacgtg gcgggctgga ttgcagaccg gccctctcgc 60
ggcggagact cgcgacctag cggattgcat cagcaggaag ac 102

20 <210> 2
<211> 87
<212> ADN
<213> humano

<400> 2
agatcccaag ggtcgtagcc cctggccgtg tggaccgggt ctgcggctgc agagcgcggt 60
cccggctgca gcaagacctg gggcagt 87

25 <210> 3
<211> 95
<212> ADN
<213> humano

30 <400> 3
gacgacgcac cctctccgtg tcccgctctg cgcccttctg cgcgccccgc tccctgtacc 60
ggagcagcga tccgggaggc ggccgagagg tgcgc 95

35 <210> 4
<211> 92
<212> ADN
<213> humano

40 <400> 4
ccggagtgtc ggctgagacg cgcgccgcgc gagccggggg actcggcgac ggggcgggga 60
cgggacgacg caccctctcc gtgtcccgct ct 92

45 <210> 5
<211> 110
<212> ADN
<213> humano

<400> 5
cgcctgccct ccgcgtcct gcgacggggc cgccacaagc tggacgggat gagctaaccg 60
gactgtcggg gcccaggag tggtgaggc ggggccgtcc aaggcaccca 110

50 <210> 6
<211> 299
<212> ADN
<213> humano

55

	<400> 6		
	caggaagctg cagcagaagg aggaggcggc ggccaccccg gaccccgccg cccggactcc	60	
	cgactcggaa gtcgcgcccg ccgctccggt cccgaccccg ggacccctg ccgcagccgc	120	
	caccctggg ccccagcgg acgagctgta cgcggcgctg gaggactatc accctgccga	180	
	gctgtaccgc gcgctgcgcg tgtccggggg caccctgcc cgcgaaagg tgcgtcccc	240	
	gcccgccttc aggatctgct cagccctct cgcactccct acagggcctg ctgactccg	299	
5	<210> 7 <211> 258 <212> ADN <213> humano		
10	<400> 7		
	gacagagaca gcccagga agttgaaggt ccgagagccc ccggtgggag aagcgggccc	60	
	gtggctgcgc cgcgtgcgtt ctactctga ggaagtgcgt ggggagccgc tgactccgga	120	
	tagcacacc ttccgagggg actccccgat tctgggctg ggggcctgcc gcctggcccc	180	
	acgtctgacg tacggggcgc gagggccact gctccctgga cttctgtcgg aaccggacgc	240	
	agtgggaggg gtcgcagg	258	
15	<210> 8 <211> 206 <212> ADN <213> humano		
	<400> 8		
	atctgtaaaa atgttgactt ctgcttttca gactacgcgc acagcctctt tatttctac	60	
	tgcggcttca ttccctcacg gaacactgac gccatcgca aggaagcatt tcgagcacga	120	
	ctgacgctcc cttattatt tgetaagccg ctgcgctcgg gtctggctac gatttgcttt	180	
20	cagaataacg ggaaggtgca acaaga	206	

REIVINDICACIONES

1. Un método de determinar una o más probabilidades de clasificaciones respectivas de una neoplasia del intestino grueso en un individuo, dicho método comprende evaluar el estado de metilación de una región de ADN seleccionada de:
 - (i) la región, incluyendo 2 kb anteriores del sitio de inicio de la transcripción, definida por al menos una de las coordenadas de Hg19 chr12:24962958..25102393; y
 - (ii) la región génica, incluyendo 2 kb anteriores de BCAT1

y opcionalmente que comprende además evaluar el estado de metilación de al menos una región de ADN seleccionada de:

 - (i) la región, incluyendo 2 kb anteriores del sitio de inicio de la transcripción, definida por al menos una de las coordenadas de Hg19:
 (2) chr7:50344378...50472798;
 (3) chr6:391739..411443;
 (4) chr12:52400748..52409671; y
 (5) chr6:163834097..163834982; o
 - (ii) la región génica, incluyendo 2 kb anteriores de al menos uno de:
 (2) IKZF1 (3) IRF4 (4) GRASP y (5) CAHM

en una muestra derivada de sangre de dicho individuo, en donde un nivel de metilación de al menos una de las regiones de ADN del grupo (i) y/o (ii) relativo a los correspondientes niveles medidos de metilación de una población de individuos con categorías neoplásicas conocidas de neoplasias del intestino grueso correspondientes se usa para determinar una o más probabilidades de clasificaciones respectivas de dicha neoplasia del intestino grueso de dicho individuo en una o más categorías neoplásicas seleccionadas de adenoma, categorías de estadio I, estadio II, estadio III y estadio IV o en uno o más agregados de menos de cinco de dichas categorías neoplásicas.
2. El método según la reivindicación 1 en donde dicha metilación se evalúa en una o más de las subregiones cromosómicas seleccionadas de:
 - (1) subregiones de BCAT1 chr12:25101992-25102093 (SEQ ID NO:1 o la correspondiente hebra menos) y chr12:25101909-25101995 (SEQ ID NO:2 o la correspondiente hebra menos), y

opcionalmente dicha metilación se evalúa además en una o más subregiones cromosómicas seleccionadas de

 - (2) subregiones de IKZF1: chr7:50343867-50343961 (SEQ ID NO:3 o la correspondiente hebra menos) y chr7:50343804-5033895 (SEQ ID NO:4 o la correspondiente hebra menos)
 - (3) subregiones de IRF4: chr6:392036-392145 (SEQ ID NO:5 o la correspondiente hebra menos)
 - (4) subregiones de GRASP1: chr12:52399672-52399922, chr12:52400821-52401051 (SEQ ID NO:6 o la correspondiente hebra menos), chr12:52401407-52401664 (SEQ ID NO:7 o la correspondiente hebra menos) chr12:52400866-52400973 y Chr12:52401107-52401664
 - (5) subregiones de CAHM: chr6:163834295-163834500 (SEQ ID NO:8 o la correspondiente hebra menos), chr6:163834621-163834906 chr6:163834393-163834455 y chr6:163834393-163834519.
3. El método según la reivindicación 2 en donde dicha subregión se selecciona de SEQ ID NO. 1, SEQ ID NO: 2 o las correspondientes hebras menos y opcionalmente además de SEQ ID NO. 3, SEQ ID NO. 4, SEQ ID NO. 5, SEQ ID NO. 6, SEQ ID NO. 7 o SEQ ID NO. 8 o las correspondientes hebras menos.
4. El método según la reivindicación 2 o 3, dicho método comprende evaluar la metilación de uno o más residuos de citosina seleccionados de:

(BCAT1)

chr12:25101998	chr12:25102003	chr12:25102006
chr12:25102009		
chr12:25102017	chr12:25102022	chr12:25102039
chr12:25102048		
chr12:25102050	chr12:25102053	chr12:25102061
chr12:25102063		
chr12:25102071	chr12:25101921	chr12:25101934
chr12:25101943		
chr12:25101951	chr12:25101962	chr12:25101964
chr12:25101970		

o una citosina correspondiente en la posición n+1 en la hebra de ADN opuesta,

- 5 y que opcionalmente comprende además evaluar la metilación de uno o más residuos de citosina seleccionados de:

(GRASP)

chr12:52399713	chr12:52399731	chr12:52399749
chr12:52399783	chr12:52399796	chr12:52399808
chr12:52399823	chr12:52399835	chr12:52399891
chr12:52400847	chr12:52400850	chr12:52400859
chr12:52400866	chr12:52400869	chr12:52400873
chr12:52400881	chr12:52400886	chr12:52400893
chr12:52400895	chr12:52400899	chr12:52400902
chr12:52400907	chr12:52400913	chr12:52400919
chr12:52400932	chr12:52400938	chr12:52400958
chr12:52400962	chr12:52400971	chr12:52400973
chr12:52400976	chr12:52400998	chr12:52401008
chr12:52401010	chr12:52401012	chr12:52401016
chr12:52401019	chr12:52401025	chr12:52401041
chr12:52401044	chr12:52401053	chr12:52401060
chr12:52401064	chr12:52401092	chr12:52401118
chr12:52401438	chr12:52401448	chr12:52401460
chr12:52401465	chr12:52401474	chr12:52401477
chr12:52401479	chr12:52401483	chr12:52401504
chr12:52401514	chr12:52401523	chr12:52401540
chr12:52401553	chr12:52401576	chr12:52401588
chr12:52401595	chr12:52401599	chr12:52401604
chr12:52401606	chr12:52401634	chr12:52401640
chr12:52401644	chr12:52401659	

chr12:52401160	chr12:52401165	chr12:52401174
chr12:52401177		
chr12:52401179	chr12:52401183	chr12:52401204
chr12:52401215		
chr12:52401223	chr12:52401240	chr12:52401253
chr12:52401288		
chr12:52401295	chr12:52401299	chr12:52401304
chr12:52401334		
chr12:52401340	chr12:52401344	chr12:52401359

(CAHM)

chr6:163834330	chr6:163834332	chr6:163834357
chr6:163834373	chr6:163834384	chr6:163834390
chr6:163834392	chr6:163834406	chr6:163834412
chr6:163834419	chr6:163834443	chr6:163834448
chr6:163834452	chr6:163834464	chr6:163834483
chr6:163834653	chr6:163834660	chr6:163834672
chr6:163834675	chr6:163834678	chr6:163834681
chr6:163834815	chr6:163834824	chr6:163834835
chr6:163834840	chr6:163834853	chr6:163834855
chr6:163834858	chr6:163834863	chr6:163834869
chr6:163834872		

(IKZF1)

chr7:50343869	chr7:50343872	chr7:50343883
chr7:50343889	chr7:50343890	chr7:50343897
chr7:50343907	chr7:50343909	chr7:50343914
chr7:50343934	chr7:50343939	chr7:50343950
chr7:50343959	chr7:50343805	chr7:50343822
chr7:50343824	chr7:50343826	chr7:50343829
chr7:50343831	chr7:50343833	chr7:50343838
chr7:50343847	chr7:50343850	chr7:50343858
chr7:50343864	chr7:50343869	chr7:50343872
chr7:50343890		

(IRF4)

chr6:392036	chr6:392047	chr6:392049
chr6:392057	chr6:392060	chr6:392066
chr6:392080	chr6:392094	chr6:392102
chr6:392131		

5. El método según una cualquiera de las reivindicaciones 1 a 4, en donde una cualquiera de dichas regiones de ADN muestra un nivel mayor de metilación, o en donde cualesquiera dos o más de dichas regiones de ADN muestran un nivel mayor de metilación.
- 5 6. El método según una cualquiera de las reivindicaciones 1 a 5, en donde dicha neoplasia es un adenoma o un adenocarcinoma.
7. El método según una cualquiera de las reivindicaciones 1 a 6, en donde dicha neoplasia es una neoplasia colorrectal.
- 10 8. El método según una cualquiera de las reivindicaciones 1 a 7, en donde dicho nivel de metilación se usa para determinar una o más probabilidades de clasificaciones respectivas de dicha neoplasia del intestino grueso de dicho individuo en una o más categorías neoplásicas seleccionadas de adenoma, categorías de estadio I, estadio II, estadio III y estadio IV.
- 15 9. El método según una cualquiera de las reivindicaciones 1 a 8, en donde dicho nivel de metilación se usa para determinar una o más probabilidades de clasificaciones respectivas de dicha neoplasia del intestino grueso de dicho individuo en uno o más agregados de menos de cinco de dichas categorías neoplásicas.
- 20 10. El método según una cualquiera de las reivindicaciones 1 a 9, en donde dicho nivel de metilación se usa para determinar una probabilidad de que dicho intestino grueso de dicho individuo se clasifique como no neoplásico, basado en la comparación de dicho nivel de metilación relativo a dichos correspondientes niveles de metilación medidos y a correspondientes niveles de metilación medidos adicionales de una población adicional de individuos cuyos intestinos gruesos se clasificaron como no neoplásicos.
- 25 11. El método según una cualquiera de las reivindicaciones 1 a 10, en donde dichos agregados incluyen uno o más de:
 - 30 (i) uno o más agregados de menos de cinco de dichas categorías neoplásicas y un agregado de la categoría no neoplásica con al menos la categoría de adenoma;
 - (ii) una categoría de neoplasia premaligna que consiste en un agregado de las categorías no neoplásica y adenoma;
 - (iii) una categoría de neoplasia maligna de estadio temprano que consiste en un agregado de las categorías de estadio I y estadio II;
 - 35 (iv) una categoría de neoplasia maligna de estadio tardío que consiste en un agregado de las categorías de estadio III y estadio IV; y
 - (v) la categoría de neoplasia premaligna, la categoría de neoplasia maligna de estadio temprano y la categoría de neoplasia maligna de estadio tardío.
- 40 12. El método según una cualquiera de las reivindicaciones 1 a 11, en donde las probabilidades se determinan usando estadística bayesiana o aprendizaje automático.
- 45 13. El método según una cualquiera de las reivindicaciones 1 a 12, que incluye usar un ajuste estándar o procedimiento de regresión para determinar parámetros de una o más funciones de distribución estadística estándar para modelar las distribuciones estadísticas de dichos niveles de metilación medidos correspondientes, en donde dicha una o más probabilidades se determinan en base de los parámetros determinados.

FIGURA 1

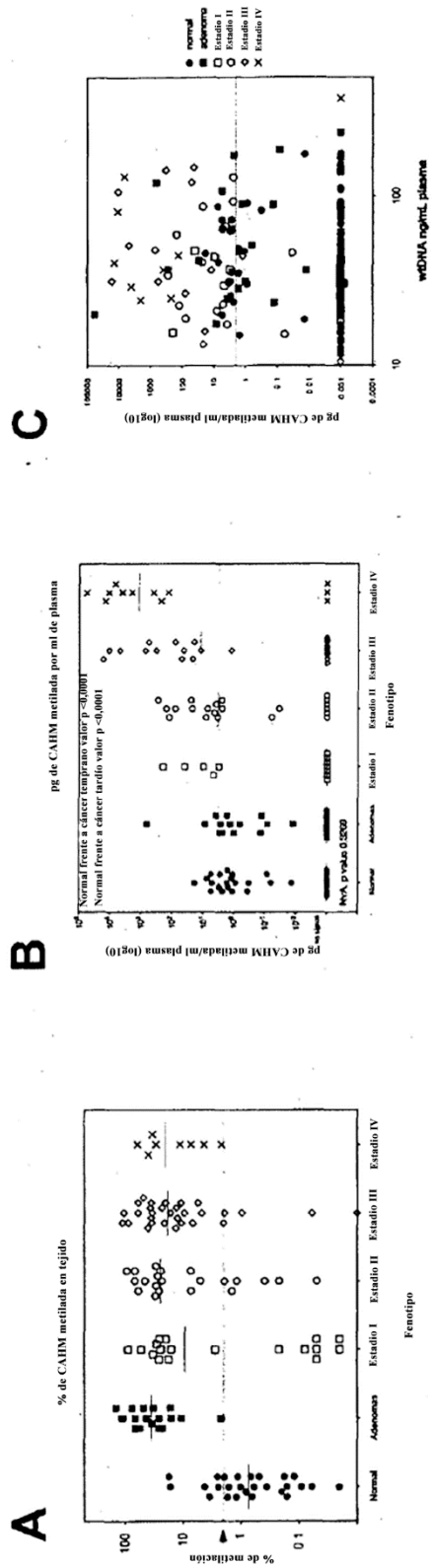


FIGURA 2

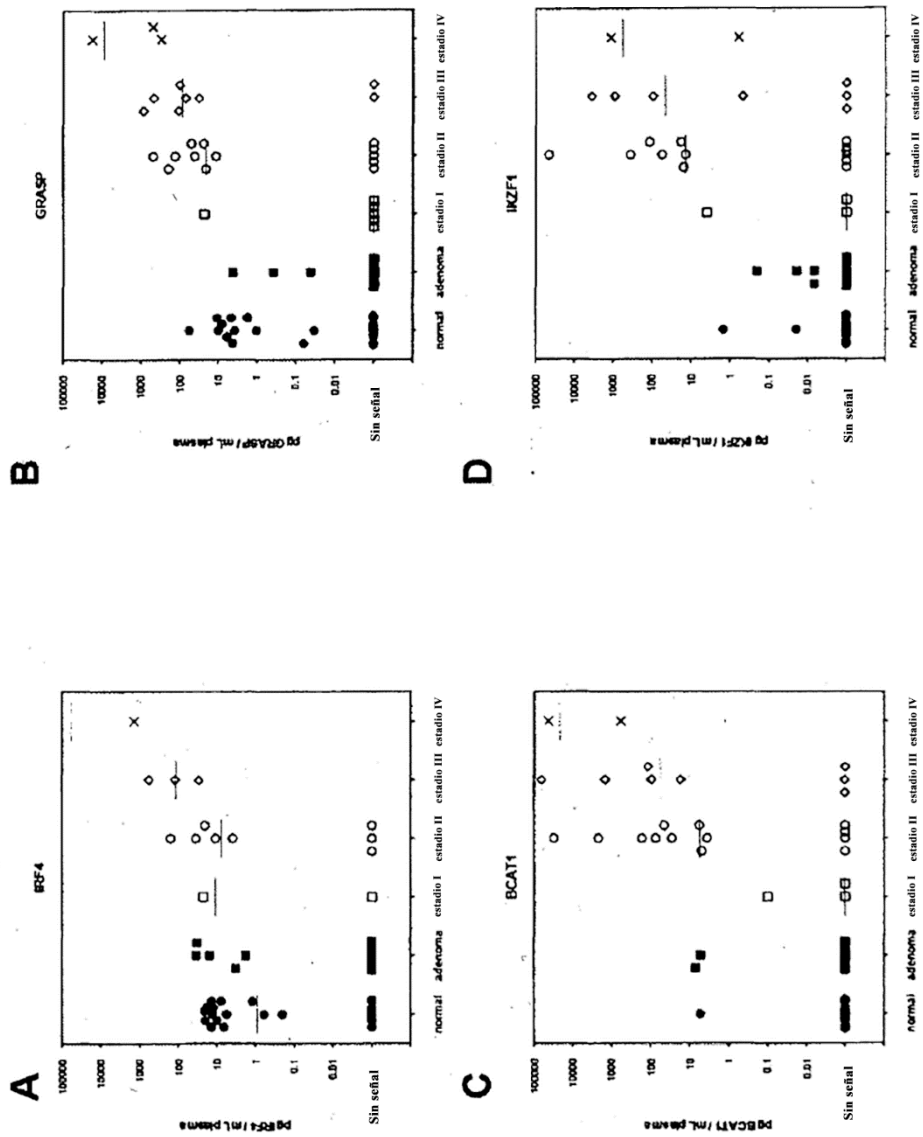


FIGURA 3A

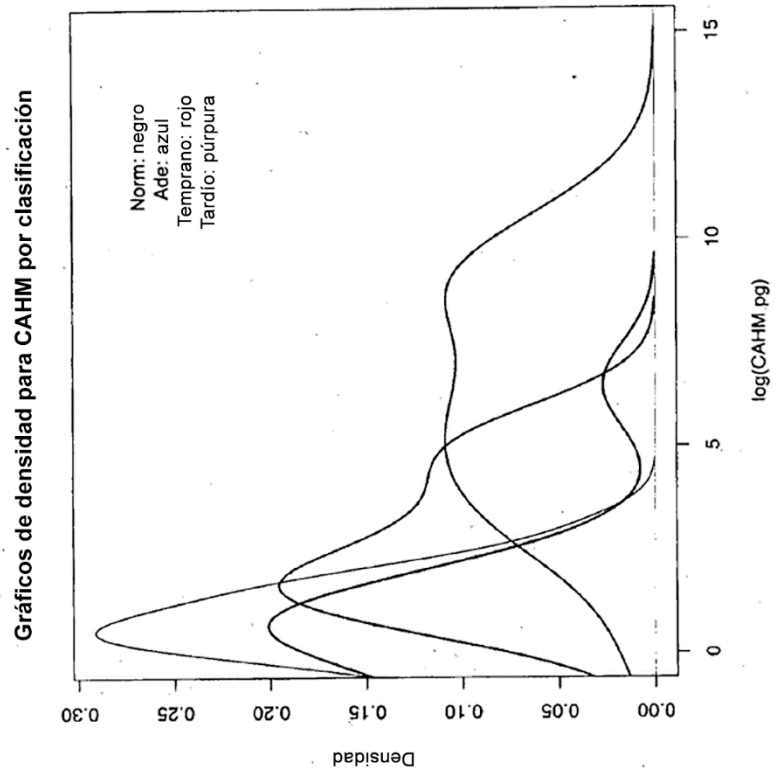


FIGURA 3B

Densidades de probabilidad estimadas

