

19



OFICINA ESPAÑOLA DE
PATENTES Y MARCAS

ESPAÑA



11 Número de publicación: **2 813 829**

51 Int. Cl.:

A61N 5/10 (2006.01)

G01N 33/574 (2006.01)

C12Q 1/68 (2008.01)

12

TRADUCCIÓN DE PATENTE EUROPEA

T3

86 Fecha de presentación y número de la solicitud internacional: **21.08.2015** **PCT/US2015/046301**

87 Fecha y número de publicación internacional: **25.02.2016** **WO16029117**

96 Fecha de presentación y número de la solicitud europea: **21.08.2015** **E 15757396 (5)**

97 Fecha y número de publicación de la concesión europea: **03.06.2020** **EP 3183578**

54 Título: **Métodos para la detección temprana del cáncer colorrectal**

30 Prioridad:

22.08.2014 US 201462040874 P

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

25.03.2021

73 Titular/es:

ABBOTT LABORATORIES (25.0%)

100 Abbott Park Road

Abbott Park, IL 60064, US;

HVIDOVRE HOSPITAL (25.0%);

UNIVERSITY OF COPENHAGEN (25.0%) y

RIGSHOSPITALET (25.0%)

72 Inventor/es:

DAVIS, GERARD J.;

GAWEL, SUSAN H.;

YANG, XIAOQING;

NIELSEN, HANS JØRGEN y

CHRISTENSEN, IB JARLE

74 Agente/Representante:

UNGRÍA LÓPEZ, Javier

ES 2 813 829 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

Métodos para la detección temprana del cáncer colorrectal

5 Referencia a solicitudes relacionadas

La presente solicitud reivindica el beneficio de la Solicitud Provisional de Patente de los Estados Unidos n.º 62/040.874, presentada el 22 de agosto de 2014.

10 Campo de la invención

La presente invención se refiere a métodos y plataformas de inmunoensayo para determinar o ayudar en la determinación de un pronóstico, diagnóstico o identificación de riesgo de adenomas de alto riesgo y cáncer colorrectal en un paciente mediante la detección de biomarcadores de antígeno carcinoembrionario (CEA; del inglés, carcinoembryonic antigen), fragmento de citoqueratina 19 (CYFRA; del inglés, cytokeratin 19 fragment), proteína reactiva con C (CRP; del inglés, c-reactive protein) y ferritina en el paciente. Los biomarcadores del antígeno carcinoembrionario (CEA), del fragmento de citoqueratina 19 (CYFRA), de la proteína reactiva con C (CRP) y de la ferritina se pueden utilizar para identificar, diagnosticar o ayudar en la identificación o diagnóstico de un paciente con cáncer colorrectal (CRC; del inglés, colorectal cancer), para identificar o ayudar en la identificación de si un paciente sufre de CRC o de adenomas de alto riesgo.

Antecedentes

El cáncer colorrectal (CRC) es la tercera enfermedad cancerosa más frecuente en Dinamarca, con 4.200 casos nuevos al año. A pesar de que un 80% de los pacientes se someterán a una resección curativa prevista, a la mitad de estos pacientes se les diagnosticará enfermedad recurrente o metastásica en los próximos 5 años. La Organización Mundial de la Salud informa de más de 1 millón de casos de CRC a nivel mundial. Los países desarrollados contabilizan aproximadamente dos tercios de los casos. Un 55-60% de los CRC se diagnostican en una etapa avanzada, lo que da como resultado una mortalidad elevada y un aumento de los costes de la atención médica. El CRC es muy tratable si se diagnostica a tiempo. En comparación con las tasas de supervivencia a 5 años en las etapas individuales donde es posible la operación curativa (estadio I: 90 %, estadio II: 70 %, estadio III: 35 - 40%) estos hechos indican que incluso a pesar de la ausencia de hallazgos clínicos y/o de laboratorio en el momento de la operación, una gran proporción de pacientes debe de tener una enfermedad diseminada oculta en el momento de la intervención quirúrgica. El pronóstico para los pacientes con enfermedad diseminada verificada (estadio IV) es desalentador y rara vez se logra una supervivencia prolongada. Aproximadamente el 50% de los pacientes diagnosticados con CRC no sobrevivirán los próximos 5 años. Por tanto, es urgente mejorar la estrategia de tratamiento conjunto para pacientes con CRC.

La distribución dependiente del estadio de los pacientes con CRC es: estadio I: 10 %, estadio II: 38 %, estadio III: 33 % y estadio IV: 19 %. La tasa de supervivencia mejoraría significativamente si se pudieran identificar más pacientes en los primeros estadios de la enfermedad (estadios I o II). Dentro de estos grupos de pacientes la cirugía, como única intervención, curaría a una proporción mucho mayor de la población total de pacientes. Hasta ahora se ha podido aumentar la cuota de pacientes con estadios tempranos de la enfermedad y por tanto la tasa de supervivencia total simplemente utilizando la prueba de "sangre oculta en heces" (SOH; en inglés, FOBT) con endoscopia posterior. La SOH tiene una especificidad elevada (85 %), pero una sensibilidad menos favorable (40-65 %). Las tasas de cumplimiento, sin embargo, son bastante limitadas. Recientemente, dos estudios daneses de cribado de viabilidad con una invitación enviada por correo para remitir una SOH han mostrado un cumplimiento inferior al 50%. Esto significa que la sensibilidad clínica está restringida al 20-33%, dado que la sensibilidad de la prueba debe multiplicarse por el cumplimiento.

El análisis de biomarcadores es potencialmente un elemento de tal estrategia de diagnóstico, pero el descubrimiento y validación de marcadores específicos de tumores ha sido difícil. Por consiguiente, sigue existiendo una gran necesidad de marcadores más precisos y precisos para la detección y el cribado del cáncer colorrectal en pacientes. El documento WO 2006/066915 divulga la utilización del ensayo de CYFRA 21-1 en la evaluación del cáncer colorrectal. También se refiere a un método para evaluar el cáncer colorrectal *in vitro* utilizando una muestra líquida, derivada de un individuo mediante la medición de CYFRA 21-1 en dicha muestra. CLEMENS GIESSEN ET AL, "Evaluation of preoperative serum markers for individual patient prognosis in stage I-III rectal cancer", TUMOR BIOLOGY, CH, (20140717), Vol. 35, n.º 10, páginas 10237 - 10248, divulgan el CEA como factor de pronóstico para supervivencia específica de cáncer y libre de enfermedad en pacientes con cáncer rectal que se sometieron a cirugía para supervivencia con intención curativa.

El documento WO 2007/071367 divulga la utilización de una combinación de marcadores que comprende osteopontina y antígeno carcinoembrionario en la evaluación del cáncer colorrectal. El documento US 2012/021929 divulga un método que ayuda en la evaluación de la presencia de cáncer utilizando el complejo de proteína de DPPIV/seprasa soluble (DPPIV/seprase) como un marcador universal de distintos tipos de cáncer. El documento WO 2009/074276 divulga un método para evaluar cáncer colorrectal (CRC) *in vitro* que comprende medir en una muestra la concentración y/o actividad de un polipéptido seprasa y/o fragmentos del mismo y de anti-p53 y/o

osteopontina y/o Ferritina, de opcionalmente uno o más de otros marcadores de CRC y utilizar el resultado de la medición combinada en la evaluación de CRC.

El documento EP 2071337 (A1) divulga un método que ayuda en la evaluación del cáncer de colon o del cáncer colorrectal utilizando la proteína de activación de fibroblastos (FAP/seprasa) como un marcador y la utilización de la medición de seprasa en la detección temprana de cáncer o en la vigilancia de pacientes que se sometieron a cirugía. El documento WO 2010/127782 divulga un método que ayuda en la evaluación del cáncer utilizando un "complejo proteico de DPPIV/Seprasa soluble" (= DPPIV/Seprasa) como un marcador universal de diferentes tipos de cáncer y la utilización de la medición de DPPIV/Seprasa en la detección temprana o diagnóstico de cáncer o en la vigilancia de pacientes que se sometieron a cirugía.

El documento WO 2010/054789 divulga la utilización de la proteína adaptadora de caspasa proapoptótica (= PACAP) como un marcador universal de cáncer de colon y la utilización de la medición de PACAP en la detección temprana de cáncer o en la vigilancia de pacientes que se sometieron a cirugía.

El documento US 2006/154245 divulga un método para cribar y/o detectar y/o vigilar un cáncer en un individuo, el método que comprende determinar un primer parámetro representado por la concentración de TIMP-1 en al menos una excreción, por ejemplo, saliva, del individuo.

El documento EP1439393 desvela un método para detectar la presencia de cáncer colorrectal en un individuo, en donde se detecta el cáncer colorrectal mediante la detección de la presencia de moléculas de ácidos nucleicos o aminoácidos de Reg1 alfa o TIMP1 en una muestra clínica obtenida del paciente, en donde la expresión de Reg1 alfa o TIMP1 es indicativa de la presencia de cáncer colorrectal.

Sumario de la invención

La presente invención se dirige a un método para determinar si un sujeto padece o está en riesgo de padecer adenomas de alto riesgo o cáncer colorrectal (CRC) y utilizar un kit para realizar el método, tal como se define en las reivindicaciones. La presente invención proporciona un método para determinar si un sujeto padece o está en riesgo de padecer adenomas de alto riesgo o cáncer colorrectal (CRC), el método que comprende las etapas de:

- (a) proporcionar una muestra biológica obtenida de un sujeto previamente;
- (b) determinar los niveles de antígeno carcinoembrionario (CEA), del fragmento de citoqueratina 19 (CYFRA). proteína reactiva con C (CRP) y ferritina en la muestra biológica del sujeto;
- (c) comparar los niveles de CEA, CYFRA, CRP y ferritina en la muestra biológica en referencia a los niveles de CEA, CYFRA, CRP y ferritina;

- (i) proporcionar una puntuación de CEA para el sujeto en donde el sujeto obtiene una puntuación de 1 si el nivel de CEA en la muestra biológica es mayor que el nivel de referencia de CEA y una puntuación de 0 si el nivel de CEA en la muestra biológica es igual o inferior al nivel de referencia de CEA;

- (ii) proporcionar una puntuación CYFRA para el sujeto en donde el sujeto obtiene una puntuación de 1 si el nivel de CYFRA en la muestra biológica es mayor que el nivel de referencia de CYFRA y una puntuación de 0 si el nivel de CYFRA en la muestra biológica es igual o inferior al nivel de referencia de CYFRA;

- (iii) proporcionar una puntuación de CRP para el sujeto en donde el sujeto obtiene una puntuación de 1 si el nivel de CRP en la muestra biológica es mayor que el nivel de referencia de CRP y una puntuación de 0 si el nivel de CRP en la muestra biológica es igual o inferior al nivel de referencia de CRP; y

- (iv) proporcionar una puntuación de ferritina para el sujeto en donde el sujeto obtiene una puntuación de 1 si el nivel de ferritina en la muestra biológica es inferior al nivel de referencia de ferritina y una puntuación de 0 si el nivel de ferritina en la muestra biológica es igual o mayor que el nivel de referencia de ferritina;

- (d) sumar las puntuaciones de la etapa (c) para generar una puntuación total;

- (e) proporcionar un diagnóstico de un sujeto como que padece o está en riesgo de padecer adenomas de alto riesgo o CRC si la puntuación total es superior a una puntuación de referencia o un diagnóstico de que un sujeto no padece o no tiene riesgo de padecer adenomas de alto riesgo o CRC si la puntuación total es igual o inferior a la puntuación de referencia.

La presente invención también proporciona la utilización de un kit para realizar el método de la invención, el kit que comprende:

- (a) un reactivo capaz de unirse específicamente a CEA, un reactivo capaz de unirse específicamente a CYFRA, un reactivo capaz de unirse específicamente a CRP y un reactivo capaz de unirse específicamente a ferritina, para cuantificar los niveles de CEA, CYFRA, CRP y ferritina en la muestra biológica de un sujeto;

- (b) una referencia estándar indicando los niveles de referencia de CEA, CYFRA, CRP y ferritina; y opcionalmente
- (c) al menos un reactivo adicional capaz de unirse específicamente al menos a un biomarcador adicional seleccionado de Septina 9 metilada (mS9), Galectina-3 (Gal3), Hemoglobina glucosilada (HbA1c), componente 3 del complemento (C3a), Catepsina X (Cat X), receptor de uroquinasa soluble (suPAR (I)), inhibidor del activador de plasminógeno-1 (PAI-1), Enolasa 2 (ENO2) o combinaciones de los mismos y

- (d) una referencia estándar que indique un nivel de referencia del al menos un biomarcador adicional de Septina 9 metilada (mS9), Galectina-3 (Gal3), Hemoglobina glucosilada (HbA1c), componente 3 del complemento (C3a), Catepsina X (Cat X), receptor de uroquinasa soluble (suPAR (I)), inhibidor del activador de plasminógeno-1 (PAI-

1), Enolasa 2 (ENO2) o combinaciones de los mismos.

El método comprende adicionalmente: determinar la edad del sujeto en la etapa (b); comparar la edad del sujeto con una edad de referencia en la etapa (c); y (v) proporcionar una puntuación de edad para el sujeto en donde el sujeto obtiene una puntuación de 1 si la edad del sujeto es mayor o igual a la edad de referencia y una puntuación de 0 si la edad del sujeto es inferior a la edad de referencia; en donde el sujeto es masculino o femenino; en donde: (a) en un sujeto masculino de al menos 54 años de edad, el nivel de referencia de CEA es de al menos 6,5 ng/ml, el nivel de referencia de CYFRA es de al menos 1,98 ng/ml, el nivel de referencia de CRP es de al menos 1,8 mg/ml y el nivel de referencia de ferritina es menor de 109 ng/ml; y

(b) en un sujeto femenino de al menos 63 años de edad, el nivel de referencia de CEA es de al menos 4,8 ng, el nivel de referencia de CYFRA es de al menos 1,72 ng/ml, el nivel de referencia de CRP es de al menos 5,5 mg/ml y el nivel de referencia de ferritina es menor de 38 ng/ml. El método, en donde la edad de referencia para un sujeto masculino es 54 y la edad de referencia para un sujeto femenino es de 63. El método en donde la puntuación de referencia es 0, 1, 2, 3, 4 o 5. El método comprende adicionalmente determinar los niveles de CEA, CYFRA, CRP y ferritina, comprende un método inmunológico con al menos un anticuerpo capaz de unirse específicamente a CEA, CYFRA, CRP, ferritina o combinaciones de los mismos. El método, en donde el método inmunológico comprende: (a) medir los niveles de CEA mediante: (i) poner en contacto la muestra de prueba con al menos un anticuerpo de captura, en donde el anticuerpo de captura se une a un epítipo sobre CEA o un fragmento de CEA para formar un complejo de anticuerpo de captura-antígeno de CEA; (ii) poner en contacto el complejo de anticuerpo de captura-antígeno de CEA con al menos un anticuerpo de detección que comprende un marcador detectable, en donde el anticuerpo de detección se une a un epítipo sobre CEA al que no se une el anticuerpo de captura y forma un complejo de anticuerpo de captura-antígeno de CEA-anticuerpo de detección; y (iii) determinar los niveles de CEA en la muestra de prueba basándose en la señal generada por el marcador detectable en el complejo de anticuerpo de captura-antígeno de CEA-anticuerpo de detección formado en (a)(ii); (b) medir los niveles de CYFRA mediante: (i) poner en contacto la muestra de prueba con al menos un anticuerpo de captura, en donde el anticuerpo de captura se une a un epítipo sobre CYFRA o un fragmento de CYFRA para formar un complejo de anticuerpo de captura-antígeno de CYFRA; (ii) poner en contacto el complejo de anticuerpo de captura-antígeno de CYFRA con al menos un anticuerpo de detección que comprende un marcador detectable, en donde el anticuerpo de detección se une a un epítipo sobre CYFRA al que no se une el anticuerpo de captura y forma un complejo de anticuerpo de captura-antígeno de CYFRA-anticuerpo de detección; y (iii) determinar los niveles de CYFRA en la muestra de prueba basándose en la señal generada por el marcador detectable en el complejo de anticuerpo de captura-antígeno de CYFRA-anticuerpo de detección formado en (b)(ii); (c) medir los niveles de CRP mediante: (i) poner en contacto la muestra de prueba con al menos un anticuerpo de captura, en donde el anticuerpo de captura se une a un epítipo sobre CRP o un fragmento de CRP para formar un complejo de anticuerpo de captura-antígeno de CRP; (ii) poner en contacto el complejo de anticuerpo de captura-antígeno de CRP con al menos un anticuerpo de detección que comprende un marcador detectable, en donde el anticuerpo de detección se une a un epítipo sobre CRP al que no se une el anticuerpo de captura y forma un complejo de anticuerpo de captura-antígeno de CRP-anticuerpo de detección; y (iii) determinar los niveles de CRP en la muestra de prueba basándose en la señal generada por el marcador detectable en el complejo de anticuerpo de captura-antígeno de CRP-anticuerpo de detección formado en (c)(ii); y (a) medir los niveles de ferritina mediante: (i) poner en contacto la muestra de prueba con al menos un anticuerpo de captura, en donde el anticuerpo de captura se une a un epítipo sobre ferritina o un fragmento de ferritina para formar un complejo de anticuerpo de captura-antígeno de ferritina; (ii) poner en contacto el complejo de anticuerpo de captura-antígeno de ferritina con al menos un anticuerpo de detección que comprende un marcador detectable, en donde el anticuerpo de detección se une a un epítipo sobre ferritina al que no se une el anticuerpo de captura y forma un complejo de anticuerpo de captura-antígeno de ferritina-anticuerpo de detección; y (iii) determinar los niveles de ferritina en la muestra de prueba basándose en la señal generada por el marcador detectable en el complejo de anticuerpo de captura-antígeno de ferritina-anticuerpo de detección formado en (c)(ii). El método comprende adicionalmente determinar el nivel de al menos un biomarcador adicional de CRC en la muestra biológica seleccionada de: Septina 9 metilada (mS9), Galectina-3 (Gal3), Hemoglobina glucosilada (HbA1c), componente 3 del complemento (C3a), Cathepsina X (Cat X), receptor de uroquinasa soluble (suPAR (I)), inhibidor del activador de plasminógeno-1 (PA1-I), Enolasa 2 (LN02) o combinaciones de los mismos y comparar el nivel de al menos un biomarcador de CRC adicional a un nivel de referencia para al menos un biomarcador adicional de CRC. El método de una cualquiera de las reivindicaciones anteriores, en donde la muestra biológica es una muestra de tejido, sangre completa, plasma, suero, orina, fluido de lavado broncoalveolar o una suspensión de cultivo celular o una fracción de la misma. El método, en donde el anticuerpo se selecciona de un anticuerpo policlonal, un anticuerpo monoclonal, un anticuerpo humano, un FV ligado por disulfuro, un anticuerpo madurado por afinidad, un scFv, un anticuerpo quimérico, un anticuerpo de un solo dominio, un anticuerpo con CDR injertadas, anticuerpo, un anticuerpo humanizado, un anticuerpo multispecifico, una inmunoglobulina de dominio variable dual (DVD) de laboratorio, un Fab', un anticuerpo biespecifico, un F(ab*)₂ y un Fv.

En el presente documento se desvela también un método para determinar si un sujeto padece o está en riesgo de padecer cáncer colorrectal (CRC). El método comprende las etapas de: (a) obtener una muestra biológica obtenida de un sujeto; (b) determinar los niveles de antígeno carcinoembrionario (CEA), fragmento de citoqueratina 19 (CYFRA), proteína reactiva con C (CRP), antígeno carbohidrato 19-9 (CA19-9) y ferritina en la muestra biológica del sujeto; (c) comparar los niveles de CEA, CYFRA, CRP, CA19-9 y ferritina, en la muestra biológica en referencia a los niveles de CEA, CYFRA, CRP, CA19-9 y ferritina; y (d) proporcionar un diagnóstico de un sujeto que padece o está

en riesgo de padecer CRC si los niveles de CEA, CYFRA, CRP y CA19-9 en la muestra biológica en referencia son superiores que los niveles de referencia de CEA, CYFRA, CRP y CA19-9 y los niveles de ferritina en la muestra biológica son menores que el nivel de referencia de ferritina o un diagnóstico de un sujeto que no padece o no está en riesgo de padecerlo si los niveles de CEA, CRP y CA19-9 en la muestra biológica son iguales o menores que los niveles de referencia de CEA, CYFRA y CA19-9 y el nivel de ferritina en la muestra biológica es igual o mayor que el nivel de referencia de ferritina. Los niveles de referencia de CEA, CYFRA, CRP, CA19-9 y ferritina pueden ser los valores límite del CEA, CYFRA, CRP, CA19-9 y ferritina determinados por una metodología de modelo de índice adaptativo de muestras biológicas de un grupo de referencia. El grupo de referencia puede seleccionarse del grupo que consiste en un grupo de control y un grupo de cáncer. El sujeto puede ser del género masculino. El nivel de referencia de CEA, CYFRA, CRP, CA19-9 y ferritina puede ser superior o igual a 4,5 ng/ml, 4,6 ng/ml, 4,7 ng/ml, 4,8 ng/ml, 4,9 ng/ml, 5,0 ng/ml, 5,1 ng/ml, 5,2 ng/ml, 5,3 ng/ml, 5,4 ng/ml, 5,5 ng/ml, 5,6 ng/ml, 5,7 ng/ml, 5,8 ng/ml, 5,9 ng/ml, 6,0 ng/ml, 6,1 ng/ml, 6,2 ng/ml, 6,3 ng/ml, 6,4 ng/ml, 6,5 ng/ml, 6,6 ng/ml, 6,7 ng/ml, 6,8 ng/ml, 6,9 ng/ml, 7,0 ng/ml, 7,1 ng/ml, 7,2 ng/ml, 7,3 ng/ml, 7,4 ng/ml, 7,5 ng/ml, 7,6 ng/ml, 7,7 ng/ml, 7,8 ng/ml, 7,9 ng/ml u 8,0 ng/ml en suero para CEA junto con niveles superiores o iguales a 1,50 ng/ml, 1,60 ng/ml, 1,70 ng/ml, 1,80 ng/ml, 1,90 ng/ml, 2,00 ng/ml, 2,01 ng/ml, 2,02 ng/ml, 2,03 ng/ml, 2,04 ng/ml, 2,05 ng/ml, 2,06 ng/ml, 2,07 ng/ml, 2,08 ng/ml, 2,09 ng/ml, 2,10 ng/ml, 2,11 ng/ml, 2,12 ng/ml, 2,13 ng/ml, 2,14 ng/ml, 2,15 ng/ml, 2,16 ng/ml, 2,17 ng/ml, 2,18 ng/ml, 2,19 ng/ml, 2,20 ng/ml, 2,21 ng/ml, 2,22 ng/ml, 2,23 ng/ml, 2,24 ng/ml, 2,25 ng/ml, 2,50 ng/ml o 3,00 ng/ml en suero para CYFRA, niveles superiores o iguales a 17,0 mg/ml, 17,1 mg/ml, 17,2 mg/ml, 17,3 mg/ml, 17,4 mg/ml, 17,5 mg/ml, 17,6 mg/ml, 17,7 mg/ml, 17,8 mg/ml, 17,9 mg/ml, 18,0 mg/ml, 18,1 mg/ml, 18,2 mg/ml, 18,3 mg/ml, 18,4 mg/ml, 18,5 mg/ml, 18,6 mg/ml, 18,7 mg/ml, 18,8 mg/ml, 18,9 mg/ml, 19,0 mg/ml, 19,5 mg/ml o 20,0 mg/ml en suero para CRP, superiores o iguales a 23,0 U/ml, 23,1 U/ml, 23,2 U/ml, 23,3 U/ml, 23,4 U/ml, 23,5 U/ml, 23,6 U/ml, 23,7 U/ml, 23,8 U/ml, 23,9 U/ml, 24,0 U/ml, 24,1 U/ml, 24,2 U/ml, 24,3 U/ml, 24,4 U/ml, 24,5 U/ml, 24,6 U/ml, 24,7 U/ml, 24,8 U/ml, 24,9 U/ml, 25,0 U/ml, 25,1 U/ml, 25,2 U/ml, 25,3 U/ml, 25,4 U/ml, 25,5 U/ml, 25,6 U/ml, 25,7 U/ml, 25,8 U/ml, 25,9 U/ml, 26,0 U/ml, 26,1 U/ml, 26,2 U/ml, 26,3 U/ml, 26,4 U/ml, 26,5 U/ml, 26,6 U/ml, 26,7 U/ml, 26,8 U/ml, 26,9 U/ml, 27,0 U/ml, 27,1 U/ml, 27,2 U/ml, 27,3 U/ml, 27,4 U/ml, 27,5 U/ml, 27,6 U/ml, 27,7 U/ml, 27,8 U/ml, 27,9 U/ml, 28,0 U/ml, 28,5 U/ml o 29,0 U/ml en suero para CA19-9 e inferiores o iguales a 105,0 ng/ml, 104,0 ng/ml, 103,0 ng/ml, 102,0 ng/ml, 101,0 ng/ml, 100,0 ng/ml, 99,0 ng/ml, 98,0 ng/ml, 97,0 ng/ml, 96,0 ng/ml, 95,0 ng/ml, 94,0 ng/ml, 93,0 ng/ml, 92,0 ng/ml, 91,0 ng/ml, 90,0 ng/ml, 89,0 ng/ml, 88,0 ng/ml, 87,0 ng/ml, 86,0 ng/ml u 85,0 ng/ml suero para ferritina. El nivel de referencia de CEA puede ser de al menos aproximadamente 6,9 ng/ml, el nivel de referencia de CYFRA puede ser de al menos aproximadamente 2,17 ng/ml, el nivel de referencia de CRP puede ser de al menos aproximadamente 18,3 mg/ml, el nivel de referencia de CA19-9 puede ser de al menos aproximadamente 26,8 U/ml y el nivel de referencia de ferritina puede ser de al menos aproximadamente 97,0 ng/ml. El sujeto puede ser del género femenino. El nivel de referencia de CEA, CYFRA, CRP, CA19-9 y ferritina puede ser superior o igual a 4,5 ng/ml, 4,6 ng/ml, 4,7 ng/ml, 4,8 ng/ml, 4,9 ng/ml, 5,0 ng/ml, 5,1 ng/ml, 5,2 ng/ml, 5,3 ng/ml, 5,4 ng/ml, 5,5 ng/ml, 5,6 ng/ml, 5,7 ng/ml, 5,8 ng/ml, 5,9 ng/ml, 6,0 ng/ml, 6,1 ng/ml, 6,2 ng/ml, 6,3 ng/ml, 6,4 ng/ml, 6,5 ng/ml, 6,6 ng/ml, 6,7 ng/ml, 6,8 ng/ml, 6,9 ng/ml, 7,0 ng/ml, 7,1 ng/ml, 7,2 ng/ml, 7,3 ng/ml, 7,4 ng/ml, 7,5 ng/ml, 7,6 ng/ml, 7,7 ng/ml, 7,8 ng/ml, 7,9 ng/ml u 8,0 ng/ml en suero para CEA junto con niveles superiores o iguales a 1,50 ng/ml, 1,60 ng/ml, 1,70 ng/ml, 1,80 ng/ml, 1,90 ng/ml, 2,00 ng/ml, 2,01 ng/ml, 2,02 ng/ml, 2,03 ng/ml, 2,04 ng/ml, 2,05 ng/ml, 2,06 ng/ml, 2,07 ng/ml, 2,08 ng/ml, 2,09 ng/ml, 2,10 ng/ml, 2,11 ng/ml, 2,12 ng/ml, 2,13 ng/ml, 2,14 ng/ml, 2,15 ng/ml, 2,16 ng/ml, 2,17 ng/ml, 2,18 ng/ml, 2,19 ng/ml, 2,20 ng/ml, 2,21 ng/ml, 2,22 ng/ml, 2,23 ng/ml, 2,24 ng/ml, 2,25 ng/ml, 2,50 ng/ml o 3,00 ng/ml en suero para CYFRA, niveles superiores o iguales a 6,5 mg/ml, 6,6 mg/ml, 6,7 mg/ml, 6,8 mg/ml, 6,9 mg/ml, 7,0 mg/ml, 7,1 mg/ml, 7,2 mg/ml, 7,3 mg/ml, 7,4 mg/ml, 7,5 mg/ml, 7,6 mg/ml, 7,7 mg/ml, 7,8 mg/ml, 7,9 mg/ml, 8,0 mg/ml, 8,1 mg/ml, 8,2 mg/ml, 8,3 mg/ml, 8,4 mg/ml, 8,5 mg/ml, 8,6 mg/ml, 8,7 mg/ml, 8,8 mg/ml, 8,9 mg/ml, 9,0 mg/ml, 9,5 mg/ml o 10,0 mg/ml en suero para CRP, superiores o iguales a 23,0 U/ml, 23,1 U/ml, 23,2 U/ml, 23,3 U/ml, 23,4 U/ml, 23,5 U/ml, 23,6 U/ml, 23,7 U/ml, 23,8 U/ml, 23,9 U/ml, 24,0 U/ml, 24,1 U/ml, 24,2 U/ml, 24,3 U/ml, 24,4 U/ml, 24,5 U/ml, 24,6 U/ml, 24,7 U/ml, 24,8 U/ml, 24,9 U/ml, 25,0 U/ml, 25,1 U/ml, 25,2 U/ml, 25,3 U/ml, 25,4 U/ml, 25,5 U/ml, 25,6 U/ml, 25,7 U/ml, 25,8 U/ml, 25,9 U/ml, 26,0 U/ml, 26,1 U/ml, 26,2 U/ml, 26,3 U/ml, 26,4 U/ml, 26,5 U/ml, 26,6 U/ml, 26,7 U/ml, 26,8 U/ml, 26,9 U/ml, 27,0 U/ml, 27,1 U/ml, 27,2 U/ml, 27,3 U/ml, 27,4 U/ml, 27,5 U/ml, 27,6 U/ml, 27,7 U/ml, 27,8 U/ml, 27,9 U/ml, 28,0 U/ml, 28,5 U/ml o 29,0 U/ml en suero para CA19-9 e inferiores o iguales a 45 ng/ml, 44 ng/ml, 43 ng/ml, 42 ng/ml, 41 ng/ml, 40 ng/ml, 39 ng/ml, 38 ng/ml, 36 ng/ml, 35 ng/ml, 34 ng/ml, 33 ng/ml, 32 ng/ml, 31 ng/ml, 30 ng/ml u 25 ng/ml suero para ferritina. El nivel de referencia de CEA puede ser de al menos aproximadamente 5,9 ng/ml, el nivel de referencia de CYFRA puede ser de al menos aproximadamente 2,01 ng/ml, el nivel de referencia de CRP puede ser de al menos aproximadamente 7,8 mg/ml, el nivel de referencia de CA19-9 puede ser de al menos aproximadamente 24,0 U/ml y el nivel de referencia de ferritina puede ser de al menos aproximadamente 36 ng/ml. El método puede comprender adicionalmente administrar un régimen de detección estructural de CRC, un régimen de tratamiento del CRC o un régimen de vigilancia del CRC del sujeto diagnosticado como que padece o está en riesgo de riesgo de padecer CRC. El régimen de tratamiento del CRC puede comprender administrar al sujeto al menos uno de cirugía, terapia radioterapéutica, tratamientos radioterapéuticos, quimioterapia, terapia dirigida o combinaciones de los mismos, al sujeto. El régimen de detección estructural del CRC puede ser una colonoscopia o una sigmoidoscopia. La colonoscopia puede confirmar el diagnóstico de un sujeto. El régimen de vigilancia del CRC puede comprender determinar los niveles de CEA, CYFRA, CRP, CA19-9 y ferritina en intervalos periódicos. La determinación de los niveles de CEA, CYFRA, CRP, CA19-9 y ferritina puede comprender un método inmunológico con moléculas que se unen específicamente a CEA, CYFRA, CRP, CA19-9 y ferritina. Las moléculas que se unen específicamente a CEA, CYFRA, CRP, CA19-9 y ferritina pueden comprender al menos un anticuerpo capaz de unirse específicamente a CEA, CYFRA, CRP, CA19-9 y ferritina. La determinación del nivel de CEA, CYFRA, CRP, CA19-9 y ferritina puede

implicar la etapa de poner en contacto la muestra biológica con al menos un anticuerpo seleccionado del grupo que consiste en: un anticuerpo que se une específicamente a CEA, un anticuerpo que se une específicamente a CYFRA, un anticuerpo que se une específicamente a CRP, un anticuerpo que se une específicamente a CA19-9, un anticuerpo que se une específicamente a ferritina y combinaciones de los mismos. La determinación del nivel de CEA, CYFRA, CRP, CA19-9 y ferritina puede implicar la etapa de evaluación de la muestra biológica para CEA, CYFRA, CRP, CA19-9 y ferritina mediante un inmunoensayo que emplea al menos un anticuerpo de captura y al menos un anticuerpo marcado con un marcador detectable, que genera una señal y comprende comparar una señal generada por el marcador detectable como una indicación directa o indirecta de la cantidad de CEA, CYFRA, CRP, CA19-9 y ferritina en la muestra biológica, en donde el anticuerpo de captura y el anticuerpo marcado con un marcador detectable comprenden: (a) al menos un anticuerpo de captura que se une específicamente a CEA y al menos un anticuerpo marcado con un marcador detectable; (b) al menos un anticuerpo de captura que se une específicamente a CYFRA y al menos un anticuerpo marcado con un marcador detectable; (c) al menos un anticuerpo de captura que se une específicamente a CRP y al menos un anticuerpo marcado con un marcador detectable; (d) al menos un anticuerpo de captura que se une específicamente a CA19-9 y al menos un anticuerpo marcado con un marcador detectable; y (e) al menos un anticuerpo de captura que se une específicamente a ferritina y al menos un anticuerpo marcado con un marcador detectable. El método inmunológico puede comprender: (a) medir los niveles de CEA mediante: (i) poner en contacto la muestra de prueba con al menos un anticuerpo de captura, en donde el anticuerpo de captura se une a un epítipo sobre CEA o un fragmento de CEA para formar un complejo de anticuerpo de captura-antígeno de CEA; (ii) poner en contacto el complejo de anticuerpo de captura-antígeno de CEA con al menos un anticuerpo de detección que comprende un marcador detectable, en donde el anticuerpo de detección se une a un epítipo sobre CEA al que no se une el anticuerpo de captura y forma un complejo de anticuerpo de captura-antígeno de CEA-anticuerpo de detección; y (iii) determinar los niveles de CEA en la muestra de prueba basándose en la señal generada por el marcador detectable en el complejo de anticuerpo de captura-antígeno de CEA-anticuerpo de detección formado en (a)(ii); (b) medir los niveles de CYFRA mediante: (i) poner en contacto la muestra de prueba con al menos un anticuerpo de captura, en donde el anticuerpo de captura se une a un epítipo sobre CYFRA o un fragmento de CYFRA para formar un complejo de anticuerpo de captura-antígeno de CYFRA; (ii) poner en contacto el complejo de anticuerpo de captura-antígeno de CYFRA con al menos un anticuerpo de detección que comprende un marcador detectable, en donde el anticuerpo de detección se une a un epítipo sobre CYFRA al que no se une el anticuerpo de captura y forma un complejo de anticuerpo de captura-antígeno de CYFRA-anticuerpo de detección; y (iii) determinar los niveles de CYFRA en la muestra de prueba basándose en la señal generada por el marcador detectable en el complejo de anticuerpo de captura-antígeno de CYFRA-anticuerpo de detección formado en (b)(ii); (c) medir los niveles de CRP mediante: (i) poner en contacto la muestra de prueba con al menos un anticuerpo de captura, en donde el anticuerpo de captura se une a un epítipo sobre CRP o un fragmento de CRP para formar un complejo de anticuerpo de captura-antígeno de CRP; (ii) poner en contacto el complejo de anticuerpo de captura-antígeno de CRP con al menos un anticuerpo de detección que comprende un marcador detectable, en donde el anticuerpo de detección se une a un epítipo sobre CRP al que no se une el anticuerpo de captura y forma un complejo de anticuerpo de captura-antígeno de CRP-anticuerpo de detección; y (iii) determinar los niveles de CRP en la muestra de prueba basándose en la señal generada por el marcador detectable en el complejo de anticuerpo de captura-antígeno de CRP-anticuerpo de detección formado en (c)(ii); (d) medir los niveles de CA19-9 mediante: (i) poner en contacto la muestra de prueba con al menos un anticuerpo de captura, en donde el anticuerpo de captura se une a un epítipo sobre CA19-9 o un fragmento de CA19-9 para formar un complejo de anticuerpo de captura-antígeno de CA19-9; (ii) poner en contacto el complejo de anticuerpo de captura-antígeno de CA19-9 con al menos un anticuerpo de detección que comprende un marcador detectable, en donde el anticuerpo de detección se une a un epítipo sobre CA19-9 al que no se une el anticuerpo de captura y forma un complejo de anticuerpo de captura-antígeno de CA19-9-anticuerpo de detección; y (iii) determinar los niveles de CA19-9 en la muestra de prueba basándose en la señal generada por el marcador detectable en el complejo de anticuerpo de captura-antígeno de CA19-9-anticuerpo de detección formado en (d)(ii); y (e) medir los niveles de ferritina mediante: (i) poner en contacto la muestra de prueba con al menos un anticuerpo de captura, en donde el anticuerpo de captura se une a un epítipo sobre ferritina o un fragmento de ferritina para formar un complejo de anticuerpo de captura-antígeno de ferritina; (ii) poner en contacto el complejo de anticuerpo de captura-antígeno de ferritina con al menos un anticuerpo de detección que comprende un marcador detectable, en donde el anticuerpo de detección se une a un epítipo sobre ferritina al que no se une el anticuerpo de captura y forma un complejo de anticuerpo de captura-antígeno de ferritina-anticuerpo de detección; y (iii) determinar los niveles de ferritina en la muestra de prueba basándose en la señal generada por el marcador detectable en el complejo de anticuerpo de captura-antígeno de ferritina-anticuerpo de detección formado en (e)(ii). El anticuerpo puede seleccionarse del grupo que consiste en: un anticuerpo policlinal, un anticuerpo monoclonal, un anticuerpo humano, una molécula de inmunoglobulina, un Fv ligado por disulfuro, un anticuerpo monoclonal, un anticuerpo madurado por afinidad, un scFv, un anticuerpo quimérico, un anticuerpo de un solo dominio, un anticuerpo con CDR injertadas, un diacuerpo, un anticuerpo humanizado, un anticuerpo multiespecífico, un Fab, un anticuerpo dual específico, un DVD, un Fab', un anticuerpo biespecífico, un F(ab')₂ y un Fv. El método comprende adicionalmente determinar el nivel de al menos un biomarcador adicional de CRC en la muestra biológica seleccionada del grupo que consiste en: Septina 9 metilada (mS9), Galectina-3 (Gal3), Hemoglobina glucosilada (HbA1c), C3a, Cathepsina X (Cat X), receptor de uroquinasa soluble (suPAR (I)), inhibidor del activador de plasminógeno-1 (PAI-1), Enolasa 2 (ENO2) o combinaciones de los mismos y comparar el nivel de al menos un biomarcador de CRC adicional a un nivel de referencia para al menos un biomarcador adicional de cáncer CRC. El sujeto puede ser un ser humano. La muestra biológica de un sujeto se puede seleccionar de una muestra de tejido, fluido corporal, sangre completa, plasma,

suero, orina, fluido de lavado broncoalveolar y una suspensión de cultivo celular o una fracción de la misma. La muestra biológica de un sujeto es plasma sanguíneo o suero sanguíneo. En el presente documento se divulga también un kit para realizar dicho método. El kit que comprende: (a) un reactivo capaz de unirse específicamente a CEA, un reactivo capaz de unirse específicamente a CYFRA, un reactivo capaz de unirse específicamente a CRP, un reactivo capaz de unirse específicamente a CA19-9 y un reactivo capaz de unirse específicamente a ferritina para cuantificar los niveles de CEA, CYFRA, CRP, CA19-9 y ferritina en la muestra biológica de un sujeto; y (b) una referencia estándar indicando los niveles de referencia de CEA, CYFRA, CRP, CA19-9 y ferritina. El kit puede comprender adicionalmente al menos un reactivo adicional capaz de unirse específicamente a al menos un biomarcador adicional de Septina 9 metilada (mS9), Galectina-3 (Gal3), Hemoglobina glucosilada (HbA1c), C3a, Catepsina X (Cat X), receptor de uroquinasa soluble (suPAR (I)), inhibidor del activador de plasminógeno-1 (PAI-1), Enolasa 2 (ENO2) o combinaciones de los mismos, en la muestra biológica para cuantificar la concentración de al menos un biomarcador adicional en la muestra biológica y una referencia estándar indicando un nivel de referencia de al menos un marcador adicional de Septina 9 metilada (mS9), Galectina-3 (Gal3), Hemoglobina glucosilada (HbA1c), C3a, Catepsina X (Cat X), receptor de uroquinasa soluble (suPAR (I)), inhibidor del activador de plasminógeno-1 (PAI-1), Enolasa 2 (ENO2) o combinaciones de los mismos, en la muestra biológica.

En el presente documento se divulga también un método para determinar si un sujeto padece o está en riesgo de padecer un cáncer colorrectal (CRC). El método comprende las etapas de: (a) obtener una muestra biológica obtenida de un sujeto; (b) determinar los niveles de antígeno carcinoembrionario (CEA), fragmento de citoqueratina 19 (CYFRA), proteína reactiva con C (CRP), antígeno carbohidrato 19-9 (CA19-9) y ferritina en la muestra biológica del sujeto; (c) comparar los niveles de CEA, CYFRA, CRP, CA19-9 y ferritina en la muestra biológica en referencia a los niveles de CEA, CYFRA, CRP, CA19-9 y ferritina; d) proporcionar una puntuación de CEA para el sujeto en donde el sujeto obtiene una puntuación de 1 si el nivel de CEA en la muestra biológica es mayor que el nivel de referencia de CEA y una puntuación de 0 si el nivel de CEA en la muestra biológica es igual o inferior al nivel de referencia de CEA; (e) proporcionar una puntuación CYFRA para el sujeto en donde el sujeto obtiene una puntuación de 1 si el nivel de CYFRA en la muestra biológica es mayor que el nivel de referencia de CYFRA y una puntuación de 0 si el nivel de CYFRA en la muestra biológica es igual o inferior al nivel de referencia de CYFRA; (f) proporcionar una puntuación de CRP para el sujeto en donde el sujeto obtiene una puntuación de 1 si el nivel de CRP en la muestra biológica es mayor que el nivel de referencia de CRP y una puntuación de 0 si el nivel de CRP en la muestra biológica es igual o inferior al nivel de referencia de CRP; (g) proporcionar una puntuación de CA19-9 para el sujeto en donde el sujeto obtiene una puntuación de 1 si el nivel de CA19-9 en la muestra biológica es mayor que el nivel de referencia de CA19-9 y una puntuación de 0 si el nivel de CA19-9 en la muestra biológica es igual o inferior al nivel de referencia de CA19-9; (h) proporcionar una puntuación de ferritina para el sujeto en donde el sujeto obtiene una puntuación de 1 si el nivel de ferritina en la muestra biológica es inferior al nivel de referencia de ferritina y una puntuación de 0 si el nivel de ferritina en la muestra biológica es igual o mayor que el nivel de referencia de ferritina; (i) añadir la puntuación de CEA, la puntuación de CYFRA, la puntuación de CRP, la puntuación de CA19-9 y la puntuación de ferritina para generar una puntuación total; y (j) proporcionar un diagnóstico de un sujeto como que padece o está en riesgo de padecer CRC si la puntuación total es superior a una puntuación de referencia o un diagnóstico de que un sujeto no padece o no tiene riesgo de padecer adenomas de alto riesgo o CRC si la puntuación total es igual o inferior a la puntuación de referencia. Los niveles de referencia de CEA, CYFRA, CRP, CA19-9 y ferritina pueden ser los valores límite del CEA, CYFRA, CRP, CA19-9 y ferritina determinados por una metodología de selección de índice adaptativo de muestras biológicas de un grupo de referencia. El grupo de referencia puede seleccionarse del grupo que consiste en un grupo de control y un grupo de cáncer. El sujeto puede ser del género masculino. El nivel de referencia de CEA, CYFRA, CRP, CA19-9 y ferritina puede ser superior o igual a 4,5 ng/ml, 4,6 ng/ml, 4,7 ng/ml, 4,8 ng/ml, 4,9 ng/ml, 5,0 ng/ml, 5,1 ng/ml, 5,2 ng/ml, 5,3 ng/ml, 5,4 ng/ml, 5,5 ng/ml, 5,6 ng/ml, 5,7 ng/ml, 5,8 ng/ml, 5,9 ng/ml, 6,0 ng/ml, 6,1 ng/ml, 6,2 ng/ml, 6,3 ng/ml, 6,4 ng/ml, 6,5 ng/ml, 6,6 ng/ml, 6,7 ng/ml, 6,8 ng/ml, 6,9 ng/ml, 7,0 ng/ml, 7,1 ng/ml, 7,2 ng/ml, 7,3 ng/ml, 7,4 ng/ml, 7,5 ng/ml, 7,6 ng/ml, 7,7 ng/ml, 7,8 ng/ml, 7,9 ng/ml u 8,0 ng/ml en suero para CEA junto con niveles superiores o iguales a 1,50 ng/ml, 1,60 ng/ml, 1,70 ng/ml, 1,80 ng/ml, 1,90 ng/ml, 2,00 ng/ml, 2,01 ng/ml, 2,02 ng/ml, 2,03 ng/ml, 2,04 ng/ml, 2,05 ng/ml, 2,06 ng/ml, 2,07 ng/ml, 2,08 ng/ml, 2,09 ng/ml, 2,10 ng/ml, 2,11 ng/ml, 2,12 ng/ml, 2,13 ng/ml, 2,14 ng/ml, 2,15 ng/ml, 2,16 ng/ml, 2,17 ng/ml, 2,18 ng/ml, 2,19 ng/ml, 2,20 ng/ml, 2,21 ng/ml, 2,22 ng/ml, 2,23 ng/ml, 2,24 ng/ml, 2,25 ng/ml, 2,50 ng/ml o 3,00 ng/ml en suero para CYFRA, niveles superiores o iguales a 17,0 mg/ml, 17,1 mg/ml, 17,2 mg/ml, 17,3 mg/ml, 17,4 mg/ml, 17,5 mg/ml, 17,6 mg/ml, 17,7 mg/ml, 17,8 mg/ml, 17,9 mg/ml, 18,0 mg/ml, 18,1 mg/ml, 18,2 mg/ml, 18,3 mg/ml, 18,4 mg/ml, 18,5 mg/ml, 18,6 mg/ml, 18,7 mg/ml, 18,8 mg/ml, 18,9 mg/ml, 19,0 mg/ml, 19,5 mg/ml o 20,0 mg/ml en suero para CRP, superiores o iguales a 23,0 U/ml, 23,1 U/ml, 23,2 U/ml, 23,3 U/ml, 23,4 U/ml, 23,5 U/ml, 23,6 U/ml, 23,7 U/ml, 23,8 U/ml, 23,9 U/ml, 24,0 U/ml, 24,1 U/ml, 24,2 U/ml, 24,3 U/ml, 24,4 U/ml, 24,5 U/ml, 24,6 U/ml, 24,7 U/ml, 24,8 U/ml, 24,9 U/ml, 25,0 U/ml, 25,1 U/ml, 25,2 U/ml, 25,3 U/ml, 25,4 U/ml, 25,5 U/ml, 25,6 U/ml, 25,7 U/ml, 25,8 U/ml, 25,9 U/ml, 26,0 U/ml, 26,1 U/ml, 26,2 U/ml, 26,3 U/ml, 26,4 U/ml, 26,5 U/ml, 26,6 U/ml, 26,7 U/ml, 26,8 U/ml, 26,9 U/ml, 27,0 U/ml, 27,1 U/ml, 27,2 U/ml, 27,3 U/ml, 27,4 U/ml, 27,5 U/ml, 27,6 U/ml, 27,7 U/ml, 27,8 U/ml, 27,9 U/ml, 28,0 U/ml, 28,5 U/ml o 29,0 U/ml en suero para CA19-9 e inferiores o iguales a 105,0 ng/ml, 104,0 ng/ml, 103,0 ng/ml, 102,0 ng/ml, 101,0 ng/ml, 100,0 ng/ml, 99,0 ng/ml, 98,0 ng/ml, 97,0 ng/ml, 96,0 ng/ml, 95,0 ng/ml, 94,0 ng/ml, 93,0 ng/ml, 92,0 ng/ml, 91,0 ng/ml, 90,0 ng/ml, 89,0 ng/ml, 88,0 ng/ml, 87,0 ng/ml, 86,0 ng/ml u 85,0 ng/ml suero para ferritina. El nivel de referencia de CEA puede ser de al menos aproximadamente 6,9 ng/ml, el nivel de referencia de CYFRA puede ser de al menos aproximadamente 2,17 ng/ml, el nivel de referencia de CRP puede ser de al menos aproximadamente 18,3 mg/ml, el nivel de referencia de CA19-9 puede ser de al menos aproximadamente 26,8 U/ml y el nivel de referencia de ferritina puede ser de al

menos aproximadamente 97,0 ng/ml. El sujeto puede ser del género femenino. El nivel de referencia de CEA, CYFRA, CRP, CA19-9 y ferritina puede ser superior o igual a 4,5 ng/ml, 4,6 ng/ml, 4,7 ng/ml, 4,8 ng/ml, 4,9 ng/ml, 5,0 ng/ml, 5,1 ng/ml, 5,2 ng/ml, 5,3 ng/ml, 5,4 ng/ml, 5,5 ng/ml, 5,6 ng/ml, 5,7 ng/ml, 5,8 ng/ml, 5,9 ng/ml, 6,0 ng/ml, 6,1 ng/ml, 6,2 ng/ml, 6,3 ng/ml, 6,4 ng/ml, 6,5 ng/ml, 6,6 ng/ml, 6,7 ng/ml, 6,8 ng/ml, 6,9 ng/ml, 7,0 ng/ml, 7,1 ng/ml, 7,2 ng/ml, 7,3 ng/ml, 7,4 ng/ml, 7,5 ng/ml, 7,6 ng/ml, 7,7 ng/ml, 7,8 ng/ml, 7,9 ng/ml u 8,0 ng/ml en suero para CEA junto con niveles superiores o iguales a 1,50 ng/ml, 1,60 ng/ml, 1,70 ng/ml, 1,80 ng/ml, 1,90 ng/ml, 2,00 ng/ml, 2,01 ng/ml, 2,02 ng/ml, 2,03 ng/ml, 2,04 ng/ml, 2,05 ng/ml, 2,06 ng/ml, 2,07 ng/ml, 2,08 ng/ml, 2,09 ng/ml, 2,10 ng/ml, 2,11 ng/ml, 2,12 ng/ml, 2,13 ng/ml, 2,14 ng/ml, 2,15 ng/ml, 2,16 ng/ml, 2,17 ng/ml, 2,18 ng/ml, 2,19 ng/ml, 2,20 ng/ml, 2,21 ng/ml, 2,22 ng/ml, 2,23 ng/ml, 2,24 ng/ml, 2,25 ng/ml, 2,50 ng/ml o 3,00 ng/ml en suero para CYFRA, niveles superiores o iguales a 6,5 mg/ml, 6,6 mg/ml, 6,7 mg/ml, 6,8 mg/ml, 6,9 mg/ml, 7,0 mg/ml, 7,1 mg/ml, 7,2 mg/ml, 7,3 mg/ml, 7,4 mg/ml, 7,5 mg/ml, 7,6 mg/ml, 7,7 mg/ml, 7,8 mg/ml, 7,9 mg/ml, 8,0 mg/ml, 8,1 mg/ml, 8,2 mg/ml, 8,3 mg/ml, 8,4 mg/ml, 8,5 mg/ml, 8,6 mg/ml, 8,7 mg/ml, 8,8 mg/ml, 8,9 mg/ml, 9,0 mg/ml, 9,5 mg/ml o 10,0 mg/ml en suero para CRP, superiores o iguales a 23,0 U/ml, 23,1 U/ml, 23,2 U/ml, 23,3 U/ml, 23,4 U/ml, 23,5 U/ml, 23,6 U/ml, 23,7 U/ml, 23,8 U/ml, 23,9 U/ml, 24,0 U/ml, 24,1 U/ml, 24,2 U/ml, 24,3 U/ml, 24,4 U/ml, 24,5 U/ml, 24,6 U/ml, 24,7 U/ml, 24,8 U/ml, 24,9 U/ml, 25,0 U/ml, 25,1 U/ml, 25,2 U/ml, 25,3 U/ml, 25,4 U/ml, 25,5 U/ml, 25,6 U/ml, 25,7 U/ml, 25,8 U/ml, 25,9 U/ml, 26,0 U/ml, 26,1 U/ml, 26,2 U/ml, 26,3 U/ml, 26,4 U/ml, 26,5 U/ml, 26,6 U/ml, 26,7 U/ml, 26,8 U/ml, 26,9 U/ml, 27,0 U/ml, 27,1 U/ml, 27,2 U/ml, 27,3 U/ml, 27,4 U/ml, 27,5 U/ml, 27,6 U/ml, 27,7 U/ml, 27,8 U/ml, 27,9 U/ml, 28,0 U/ml, 28,5 U/ml o 29,0 U/ml en suero para CA19-9 e inferiores o iguales a 45 ng/ml, 44 ng/ml, 43 ng/ml, 42 ng/ml, 41 ng/ml, 40 ng/ml, 39 ng/ml, 38 ng/ml, 36 ng/ml, 35 ng/ml, 34 ng/ml, 33 ng/ml, 32 ng/ml, 31 ng/ml, 30 ng/ml u 25 ng/ml suero para ferritina. El nivel de referencia de CEA puede ser de al menos aproximadamente 5,9 ng/ml, el nivel de referencia de CYFRA puede ser de al menos aproximadamente 2,01 ng/ml, el nivel de referencia de CRP puede ser de al menos aproximadamente 7,8 mg/ml, el nivel de referencia de CA19-9 puede ser de al menos aproximadamente 24,0 U/ml y el nivel de referencia de ferritina puede ser de al menos aproximadamente 36 ng/ml. La puntuación de referencia puede ser 0, 1, 2, 3, 4 o 5. Si el sujeto es masculino, la puntuación de referencia puede ser 1. Si el sujeto es masculino y la puntuación total es superior a 1, se podría diagnosticar al sujeto como que padece o está en riesgo de padecer CRC. Si el sujeto es femenino, la puntuación de referencia puede ser 1 o 2. Si el sujeto es femenino y la puntuación total es superior a 1, se podría diagnosticar al sujeto como que padece o está en riesgo de padecer CRC. Si el sujeto es femenino y la puntuación total es superior a 2, se podría diagnosticar al sujeto como que padece o está en riesgo de padecer CRC. El método puede comprender adicionalmente administrar un régimen de detección estructural de CRC, un régimen de tratamiento del CRC o un régimen de vigilancia del CRC del sujeto diagnosticado como que padece o está en riesgo de padecer CRC. El régimen de tratamiento del CRC puede comprender administrar al sujeto al menos uno de cirugía, terapia radioterapéutica, tratamientos radioterapéuticos, quimioterapia, terapia dirigida o combinaciones de los mismos, al sujeto. El régimen de detección estructural del CRC puede ser una colonoscopia o una sigmoidoscopia. La colonoscopia puede confirmar el diagnóstico de un sujeto. El régimen de vigilancia del CRC puede comprender determinar los niveles de CEA, CYFRA, CRP, CA19-9 y ferritina en intervalos periódicos. La determinación de los niveles de CEA, CYFRA, CRP, CA19-9 y ferritina puede comprender un método inmunológico con moléculas que se unen específicamente a CEA, CYFRA, CRP, CA19-9 y ferritina. Las moléculas que se unen específicamente a CEA, CYFRA, CRP, CA19-9 y ferritina pueden comprender al menos un anticuerpo capaz de unirse específicamente a CEA, CYFRA, CRP, CA19-9 y ferritina. La determinación del nivel de CEA, CYFRA, CRP, CA19-9 y ferritina puede implicar la etapa de poner en contacto la muestra biológica con al menos un anticuerpo seleccionado del grupo que consiste en: un anticuerpo que se une específicamente a CEA, un anticuerpo que se une específicamente a CYFRA, un anticuerpo que se une específicamente a CRP, un anticuerpo que se une específicamente a CA19-9, un anticuerpo que se une específicamente a ferritina y combinaciones de los mismos. La determinación del nivel de CEA, CYFRA, CRP, CA19-9 y ferritina puede implicar la etapa de evaluación de la muestra biológica para CEA, CYFRA, CRP, CA19-9 y ferritina mediante un inmunoensayo que emplea al menos un anticuerpo de captura y al menos un anticuerpo marcado con un marcador detectable, que genera una señal y comprende comparar una señal generada por el marcador detectable como una indicación directa o indirecta de la cantidad de CEA, CYFRA, CRP, CA19-9 y ferritina en la muestra biológica, en donde el anticuerpo de captura y el anticuerpo marcado con un marcador detectable comprenden: (a) al menos un anticuerpo de captura que se une específicamente a CEA y al menos un anticuerpo marcado con un marcador detectable; (b) al menos un anticuerpo de captura que se une específicamente a CYFRA y al menos un anticuerpo marcado con un marcador detectable; (c) al menos un anticuerpo de captura que se une específicamente a CRP y al menos un anticuerpo marcado con un marcador detectable; (d) al menos un anticuerpo de captura que se une específicamente a CA19-9 y al menos un anticuerpo marcado con un marcador detectable; y (e) al menos un anticuerpo de captura que se une específicamente a ferritina y al menos un anticuerpo marcado con un marcador detectable. El método inmunológico puede comprender: (a) medir los niveles de CEA mediante: (i) poner en contacto la muestra de prueba con al menos un anticuerpo de captura, en donde el anticuerpo de captura se une a un epítipo sobre CEA o un fragmento de CEA para formar un complejo de anticuerpo de captura-antígeno de CEA; (ii) poner en contacto el complejo de anticuerpo de captura-antígeno de CEA con al menos un anticuerpo de detección que comprende un marcador detectable, en donde el anticuerpo de detección se une a un epítipo sobre CEA al que no se une el anticuerpo de captura y forma un complejo de anticuerpo de captura-antígeno de CEA-anticuerpo de detección; y (iii) determinar los niveles de CEA en la muestra de prueba basándose en la señal generada por el marcador detectable en el complejo de anticuerpo de captura-antígeno de CEA-anticuerpo de detección formado en (a)(ii); (b) medir los niveles de CYFRA mediante: (i) poner en contacto la muestra de prueba con al menos un anticuerpo de captura, en donde el anticuerpo de captura se une a un epítipo sobre CYFRA o un fragmento de CYFRA para formar un complejo de anticuerpo de captura-antígeno de CYFRA; (ii) poner en contacto

el complejo de anticuerpo de captura-antígeno de CYFRA con al menos un anticuerpo de detección que comprende un marcador detectable, en donde el anticuerpo de detección se une a un epítipo sobre CYFRA al que no se une el anticuerpo de captura y forma un complejo de anticuerpo de captura-antígeno de CYFRA-anticuerpo de detección; y (iii) determinar los niveles de CYFRA en la muestra de prueba basándose en la señal generada por el marcador detectable en el complejo de anticuerpo de captura-antígeno de CYFRA-anticuerpo de detección formado en (b)(ii); (c) medir los niveles de CRP mediante: (i) poner en contacto la muestra de prueba con al menos un anticuerpo de captura, en donde el anticuerpo de captura se une a un epítipo sobre CRP o un fragmento de CRP para formar un complejo de anticuerpo de captura-antígeno de CRP; (ii) poner en contacto el complejo de anticuerpo de captura-antígeno de CRP con al menos un anticuerpo de detección que comprende un marcador detectable, en donde el anticuerpo de detección se une a un epítipo sobre CRP al que no se une el anticuerpo de captura y forma un complejo de anticuerpo de captura-antígeno de CRP-anticuerpo de detección; y (iii) determinar los niveles de CRP en la muestra de prueba basándose en la señal generada por el marcador detectable en el complejo de anticuerpo de captura-antígeno de CRP-anticuerpo de detección formado en (c)(ii); (d) medir los niveles de CA19-9 mediante: (i) poner en contacto la muestra de prueba con al menos un anticuerpo de captura, en donde el anticuerpo de captura se une a un epítipo sobre CA19-9 o un fragmento de CA19-9 para formar un complejo de anticuerpo de captura-antígeno de CA19-9; (ii) poner en contacto el complejo de anticuerpo de captura-antígeno de CA19-9 con al menos un anticuerpo de detección que comprende un marcador detectable, en donde el anticuerpo de detección se une a un epítipo sobre CA19-9 al que no se une el anticuerpo de captura y forma un complejo de anticuerpo de captura-antígeno de CA19-9-anticuerpo de detección; y (iii) determinar los niveles de CA19-9 en la muestra de prueba basándose en la señal generada por el marcador detectable en el complejo de anticuerpo de captura-antígeno de CA19-9-anticuerpo de detección formado en (d)(ii); y (e) medir los niveles de ferritina mediante: (i) poner en contacto la muestra de prueba con al menos un anticuerpo de captura, en donde el anticuerpo de captura se une a un epítipo sobre ferritina o un fragmento de ferritina para formar un complejo de anticuerpo de captura-antígeno de ferritina; (ii) poner en contacto el complejo de anticuerpo de captura-antígeno de ferritina con al menos un anticuerpo de detección que comprende un marcador detectable, en donde el anticuerpo de detección se une a un epítipo sobre ferritina al que no se une el anticuerpo de captura y forma un complejo de anticuerpo de captura-antígeno de ferritina-anticuerpo de detección; y (iii) determinar los niveles de ferritina en la muestra de prueba basándose en la señal generada por el marcador detectable en el complejo de anticuerpo de captura-antígeno de ferritina-anticuerpo de detección formado en (e)(ii). El anticuerpo puede seleccionarse del grupo que consiste en: un anticuerpo policlonal, un anticuerpo monoclonal, un anticuerpo humano, una molécula de inmunoglobulina, un Fv ligado por disulfuro, un anticuerpo monoclonal, un anticuerpo madurado por afinidad, un scFv, un anticuerpo quimérico, un anticuerpo de un solo dominio, un anticuerpo con CDR injertadas, un diacuerpo, un anticuerpo humanizado, un anticuerpo multiespecífico, un Fab, un anticuerpo dual específico, un DVD, un Fab', un anticuerpo biespecífico, un F(ab')₂ y un Fv. El método comprende adicionalmente determinar el nivel de al menos un biomarcador adicional de CRC en la muestra biológica seleccionada del grupo que consiste en: Septina 9 metilada (mS9), Galectina-3 (Gal3), Hemoglobina glucosilada (HbA1c), C3a, Cathepsina X (Cat X), receptor de uroquinasa soluble (suPAR (I)), inhibidor del activador de plasminógeno-1 (PAI-1), Enolasa 2 (ENO2) o combinaciones de los mismos y comparar el nivel de al menos un biomarcador de CRC adicional a un nivel de referencia para al menos un biomarcador adicional de cáncer CRC. El sujeto puede ser un ser humano. La muestra biológica de un sujeto se puede seleccionar de una muestra de tejido, fluido corporal, sangre completa, plasma, suero, orina, fluido de lavado broncoalveolar y una suspensión de cultivo celular o una fracción de la misma. La muestra biológica de un sujeto es plasma sanguíneo o suero sanguíneo. En el presente documento se divulga también un kit para realizar dicho método. El kit que comprende: (a) un reactivo capaz de unirse específicamente a CEA, un reactivo capaz de unirse específicamente a CYFRA, un reactivo capaz de unirse específicamente a CRP, un reactivo capaz de unirse específicamente a CA19-9 y un reactivo capaz de unirse específicamente a ferritina para cuantificar los niveles de CEA, CYFRA, CRP, CA19-9 y ferritina en la muestra biológica de un sujeto; y (b) una referencia estándar indicando los niveles de referencia de CEA, CYFRA, CRP, CA19-9 y ferritina. El kit puede comprender adicionalmente al menos un reactivo adicional capaz de unirse específicamente a al menos un biomarcador adicional de Septina 9 metilada (mS9), Galectina-3 (Gal3), Hemoglobina glucosilada (HbA1c), C3a, Cathepsina X (Cat X), receptor de uroquinasa soluble (suPAR (I)), inhibidor del activador de plasminógeno-1 (PAI-1), Enolasa 2 (ENO2) o combinaciones de los mismos, en la muestra biológica para cuantificar la concentración de al menos un biomarcador adicional en la muestra biológica y una referencia estándar indicando un nivel de referencia de al menos un marcador adicional de Septina 9 metilada (mS9), Galectina-3 (Gal3), Hemoglobina glucosilada (HbA1c), C3a, Cathepsina X (Cat X), receptor de uroquinasa soluble (suPAR (I)), inhibidor del activador de plasminógeno-1 (PAI-1), Enolasa 2 (ENO2) o combinaciones de los mismos, en la muestra biológica.

En el presente documento se divulga también un método para determinar si un sujeto masculino padece o está en riesgo de padecer un cáncer distinto del cáncer colorrectal (CRC), en donde el sujeto masculino se confirmó que no tiene CRC mediante una colonoscopia, el método que comprende las etapas de: (a) obtener una muestra biológica obtenida del sujeto masculino; (b) determinar los niveles del fragmento de citoqueratina 19 (CYFRA), proteína reactiva con C (CRP), un tejido inhibidor de metaloproteína 1 (TIMP-1), antígeno carbohidrato 19-9 (CA19-9) y alfa-fetoproteína (AFP) en la muestra biológica del sujeto masculino; (c) comparar los niveles de CYFRA, CRP, TIMP-1, CA19-9 y AFP en la muestra biológica en referencia a los niveles de CYFRA, CRP, TIMP-1, CA19-9 y AFP; y (d) proporcionar un diagnóstico del sujeto masculino como que padece o está en riesgo de padecer un cáncer distinto de CRC si los niveles de CYFRA, CRP, TIMP-1, CA19-9 y AFP en la muestra biológica son superiores que los niveles de referencia de CYFRA, CRP, TTMP-1, CA19-9 y AFP. Los niveles de referencia de CYFRA, CRP,

TIMP-1, CA19-9 y AFP pueden ser los valores límite del CYFRA, CRP, TIMP-1, CA19-9 y AFP determinados por una metodología de modelo de índice adaptativo de muestras biológicas de un grupo de referencia. El grupo de referencia puede seleccionarse del grupo que consiste en un grupo de control y un grupo de cáncer. El nivel de referencia de CYFRA, CRP, TIMP-1, CA19-9 y AFP puede ser superior o igual a 1,0 ng/ml, 1,1 ng/ml, 1,2 ng/ml, 1,3 ng/ml, 1,4 ng/ml, 1,5 ng/ml, 1,6 ng/ml, 1,7 ng/ml, 1,8 ng/ml, 1,9 ng/ml, 2,0 ng/ml, 2,1 ng/ml, 2,2 ng/ml, 2,3 ng/ml, 2,4 ng/ml, 2,5 ng/ml, 3,0 ng/ml o 3,5 ng/ml en suero para CYFRA junto con niveles superiores o iguales a 14,0 ng/ml, 14,1 ng/ml, 14,2 ng/ml, 14,3 ng/ml, 14,4 ng/ml, 14,5 ng/ml, 14,6 ng/ml, 14,7 ng/ml, 14,8 ng/ml, 14,9 ng/ml, 15,0 ng/ml, 15,1 ng/ml, 15,2 ng/ml, 15,3 ng/ml, 15,4 ng/ml, 15,5 ng/ml, 15,6 ng/ml, 15,7 ng/ml, 15,8 ng/ml, 15,9 ng/ml, 16,0 ng/ml, 16,1 ng/ml, 16,2 ng/ml, 16,3 ng/ml, 16,4 ng/ml, 16,5 ng/ml, 17,0 ng/ml o 17,5 ng/ml en suero para CRP, los niveles superiores o iguales a 140 ng/ml, 141 ng/ml, 142 ng/ml, 143 ng/ml, 144 ng/ml, 145 ng/ml, 146 ng/ml, 147 ng/ml, 148 ng/ml, 149 ng/ml, 150 ng/ml, 151 ng/ml, 152 ng/ml, 153 ng/ml, 154 ng/ml, 155 ng/ml, 156 ng/ml, 157 ng/ml, 158 ng/ml, 159 ng/ml o 160 ng/ml en suero para TIMP-1, superiores o iguales a 24,0 U/ml, 24,1 U/ml, 24,2 U/ml, 24,3 U/ml, 24,4 U/ml, 24,5 U/ml, 24,6 U/ml, 24,7 U/ml, 24,8 U/ml, 24,9 U/ml, 25,0 U/ml, 25,1 U/ml, 25,2 U/ml, 25,3 U/ml, 25,4 U/ml, 25,5 U/ml, 25,6 U/ml, 25,7 U/ml, 25,8 U/ml, 25,9 U/ml, 26,0 U/ml o 26,5 U/ml en suero para CA19-9 y superiores o iguales a 5,0 ng/ml, 5,1 ng/ml, 5,2 ng/ml, 5,3 ng/ml, 5,4 ng/ml, 5,5 ng/ml, 5,6 ng/ml, 5,7 ng/ml, 5,8 ng/ml, 5,9 ng/ml, 6,0 ng/ml, 6,1 ng/ml, 6,2 ng/ml, 6,3 ng/ml, 6,4 ng/ml, 6,5 ng/ml, 6,6 ng/ml, 6,7 ng/ml, 6,8 ng/ml, 6,9 ng/ml, 7,0 ng/ml, 7,5 ng/ml u 8,0 ng/ml en suero para AFP. El nivel de referencia de CYFRA puede ser de al menos aproximadamente 2,13 ng/ml, el nivel de referencia de CRP puede ser de al menos aproximadamente 15,4 mg/ml, el nivel de referencia de TIMP-1 puede ser de al menos aproximadamente 148 ng/ml, el nivel de referencia de CA19-9 puede ser de al menos aproximadamente 25,0 U/ml y el nivel de referencia de AFP puede ser de al menos aproximadamente 6,7 ng/ml. El método puede comprender adicionalmente administrar un régimen de tratamiento del cáncer o un régimen de vigilancia del cáncer al sujeto diagnosticado como que padece o está en riesgo de padecer un cáncer distinto del CRC. El régimen de tratamiento del cáncer puede comprender administrar al sujeto al menos uno de cirugía, terapia radioterapéutica, tratamientos radioterapéuticos, quimioterapia, terapia dirigida o combinaciones de los mismos. El régimen de vigilancia del cáncer puede comprender determinar los niveles de CYFRA, CRP, TIMP-1, CA19-9 y AFP en intervalos periódicos. La determinación de los niveles de CYFRA, CRP, TIMP-1, CA19-9 y AFP puede comprender un método inmunológico con moléculas que se unen específicamente a CYFRA, CRP, TIMP-1, CA19-9 y AFP. Las moléculas que se unen específicamente a CYFRA, CRP, TIMP-1, CA19-9 y AFP pueden comprender al menos un anticuerpo capaz de unirse específicamente a CYFRA, CRP, TIMP-1, CA19-9 y AFP. La determinación del nivel de CYFRA, CRP, TIMP-1, CA19-9 y AFP puede implicar la etapa de poner en contacto la muestra biológica con al menos un anticuerpo seleccionado del grupo que consiste en: un anticuerpo que se une específicamente a CYFRA, un anticuerpo que se une específicamente a CRP, un anticuerpo que se une específicamente a TIMP-1, un anticuerpo que se une específicamente a CA19-9, un anticuerpo que se une específicamente a AFP y combinaciones de los mismos. La determinación del nivel de CYFRA, CRP, TIMP-1, CA19-9 y AFP puede implicar la etapa de evaluación de la muestra biológica para CYFRA, CRP, TIMP-1, CA19-9 y AFP mediante un inmunoensayo que emplea al menos un anticuerpo de captura y al menos un anticuerpo marcado con un marcador detectable, que genera una señal y comprende comparar una señal generada por el marcador detectable como una indicación directa o indirecta de la cantidad de CYFRA, CRP, TIMP-1, CA19-9 y AFP en la muestra biológica, en donde el anticuerpo de captura y el anticuerpo marcado con un marcador detectable comprenden: (a) al menos un anticuerpo de captura que se une específicamente a CYFRA y al menos un anticuerpo marcado con un marcador detectable; (b) al menos un anticuerpo de captura que se une específicamente a CRP y al menos un anticuerpo marcado con un marcador detectable; (c) al menos un anticuerpo de captura que se une específicamente a TIMP-1 y al menos un anticuerpo marcado con un marcador detectable; (d) al menos un anticuerpo de captura que se une específicamente a CA19-9 y al menos un anticuerpo marcado con un marcador detectable; y (e) al menos un anticuerpo de captura que se une específicamente a AFP y al menos un anticuerpo marcado con un marcador detectable. El método inmunológico puede comprender: (a) medir los niveles de CYFRA mediante: (i) poner en contacto la muestra de prueba con al menos un anticuerpo de captura, en donde el anticuerpo de captura se une a un epítipo sobre CYFRA o un fragmento de CYFRA para formar un complejo de anticuerpo de captura-antígeno de CYFRA; (ii) poner en contacto el complejo de anticuerpo de captura-antígeno de CYFRA con al menos un anticuerpo de detección que comprende un marcador detectable, en donde el anticuerpo de detección se une a un epítipo sobre CYFRA al que no se une el anticuerpo de captura y forma un complejo de anticuerpo de captura-antígeno de CYFRA-anticuerpo de detección; y (iii) determinar los niveles de CYFRA en la muestra de prueba basándose en la señal generada por el marcador detectable en el complejo de anticuerpo de captura-antígeno de CYFRA-anticuerpo de detección formado en (a)(ii); (b) medir los niveles de CRP mediante: (i) poner en contacto la muestra de prueba con al menos un anticuerpo de captura, en donde el anticuerpo de captura se une a un epítipo sobre CRP o un fragmento de CRP para formar un complejo de anticuerpo de captura-antígeno de CRP; (ii) poner en contacto el complejo de anticuerpo de captura-antígeno de CRP con al menos un anticuerpo de detección que comprende un marcador detectable, en donde el anticuerpo de detección se une a un epítipo sobre CRP al que no se une el anticuerpo de captura y forma un complejo de anticuerpo de captura-antígeno de CRP-anticuerpo de detección; y (iii) determinar los niveles de CRP en la muestra de prueba basándose en la señal generada por el marcador detectable en el complejo de anticuerpo de captura-antígeno de CRP-anticuerpo de detección formado en (b)(ii); (c) medir los niveles de TIMP-1 mediante: (i) poner en contacto la muestra de prueba con al menos un anticuerpo de captura, en donde el anticuerpo de captura se une a un epítipo sobre TIMP-1 o un fragmento de TIMP-1 para formar un complejo de anticuerpo de captura-antígeno de TIMP-1; (ii) poner en contacto el complejo de anticuerpo de captura-antígeno de TIMP-1 con al menos un anticuerpo de detección que comprende un marcador detectable, en donde el anticuerpo de detección se

une a un epítipo sobre TIMP-1 al que no se une el anticuerpo de captura y forma un complejo de anticuerpo de captura-antígeno de TIMP-1-anticuerpo de detección; y (iii) determinar los niveles de TIMP-1 en la muestra de prueba basándose en la señal generada por el marcador detectable en el complejo de anticuerpo de captura-antígeno de TIMP-1-anticuerpo de detección formado en (c)(ii); (d) medir los niveles de CA19-9 mediante: (i) poner en contacto la muestra de prueba con al menos un anticuerpo de captura, en donde el anticuerpo de captura se une a un epítipo sobre CA19-9 o un fragmento de CA19-9 para formar un complejo de anticuerpo de captura-antígeno de CA19-9; (ii) poner en contacto el complejo de anticuerpo de captura-antígeno de CA19-9 con al menos un anticuerpo de detección que comprende un marcador detectable, en donde el anticuerpo de detección se une a un epítipo sobre CA19-9 al que no se une el anticuerpo de captura y forma un complejo de anticuerpo de captura-antígeno de CA19-9-anticuerpo de detección; y (iii) determinar los niveles de CA19-9 en la muestra de prueba basándose en la señal generada por el marcador detectable en el complejo de anticuerpo de captura-antígeno de CA19-9-anticuerpo de detección formado en (d)(ii); y (e) medir los niveles de AFP mediante: (i) poner en contacto la muestra de prueba con al menos un anticuerpo de captura, en donde el anticuerpo de captura se une a un epítipo sobre AFP o un fragmento de AFP para formar un complejo de anticuerpo de captura-antígeno de AFP; (ii) poner en contacto el complejo de anticuerpo de captura-antígeno de AFP con al menos un anticuerpo de detección que comprende un marcador detectable, en donde el anticuerpo de detección se une a un epítipo sobre AFP al que no se une el anticuerpo de captura y forma un complejo de anticuerpo de captura-antígeno de AFP-anticuerpo de detección; y (iii) determinar los niveles de AFP en la muestra de prueba basándose en la señal generada por el marcador detectable en el complejo de anticuerpo de captura-antígeno de AFP-anticuerpo de detección formado en (e)(ii). El anticuerpo puede seleccionarse del grupo que consiste en: un anticuerpo policlonal, un anticuerpo monoclonal, un anticuerpo humano, una molécula de inmunoglobulina, un Fv ligado por disulfuro, un anticuerpo monoclonal, un anticuerpo madurado por afinidad, un scFv, un anticuerpo quimérico, un anticuerpo de un solo dominio, un anticuerpo con CDR injertadas, un diacuerpo, un anticuerpo humanizado, un anticuerpo multiespecífico, un Fab, un anticuerpo dual específico, un DVD, un Fab', un anticuerpo biespecífico, un F(ab')₂ y un Fv. El método comprende adicionalmente determinar el nivel de al menos un biomarcador adicional de un cáncer diferente al CRC en la muestra biológica seleccionada del grupo que consiste en: Septina 9 metilada (mS9), Galectina-3 (Gal3), Hemoglobina glucosilada (HbA1c), C3a, Catepsina X (Cat X), receptor de uroquinasa soluble (suPAR (I)), inhibidor del activador de plasminógeno-1 (PAI-1), Enolasa 2 (ENO2) o combinaciones de los mismos y comparar el nivel de al menos un biomarcador adicional de un cáncer distinto del CRC a un nivel de referencia para al menos un biomarcador adicional de un cáncer distinto al CRC. El cáncer puede ser de pulmón, ovario, mama, riñón, canal anal, primario desconocido, linfoma de linfocitos B, de útero, próstata, vesícula biliar, laringe, melanoma maligno, de páncreas, LLC, mieloma maligno, de testículos, intestino delgado, vejiga, estómago, mesotelioma, de glándula suprarrenal, neuroendocrino o de esófago. El sujeto puede ser un ser humano. La muestra biológica de un sujeto se puede seleccionar de una muestra de tejido, fluido corporal, sangre completa, plasma, suero, orina, fluido de lavado broncoalveolar y una suspensión de cultivo celular o una fracción de la misma. La muestra biológica de un sujeto es plasma sanguíneo o suero sanguíneo. En el presente documento se divulga también un kit para realizar dicho método. El kit que comprende: (a) un reactivo capaz de unirse específicamente a CYFRA, un reactivo capaz de unirse específicamente a CRP, un reactivo capaz de unirse específicamente a TIMP-1, un reactivo capaz de unirse específicamente a CA19-9 y un reactivo capaz de unirse específicamente a AFP para cuantificar los niveles de CYFRA, CRP, TIMP-1, CA19-9 y AFP en la muestra biológica de un sujeto; y (b) una referencia estándar indicando los niveles de referencia de CYFRA, CRP, TIMP-1, CA19-9 y AFP. El kit puede comprender adicionalmente al menos un reactivo adicional capaz de unirse específicamente a al menos un biomarcador adicional de Septina 9 metilada (mS9), Galectina-3 (Gal3), Hemoglobina glucosilada (HbA1c), C3a, Catepsina X (Cat X), receptor de uroquinasa soluble (suPAR (I)), inhibidor del activador de plasminógeno-1 (PAI-1), Enolasa 2 (ENO2) o combinaciones de los mismos, en la muestra biológica para cuantificar la concentración de al menos un biomarcador adicional en la muestra biológica y una referencia estándar indicando un nivel de referencia de al menos un marcador adicional de Septina 9 metilada (mS9), Galectina-3 (Gal3), Hemoglobina glucosilada (HbA1c), C3a, Catepsina X (Cat X), receptor de uroquinasa soluble (suPAR (I)), inhibidor del activador de plasminógeno-1 (PAI-1), Enolasa 2 (ENO2) o combinaciones de los mismos, en la muestra biológica.

En el presente documento se divulga también un método para determinar si un sujeto masculino padece o está en riesgo de padecer un cáncer distinto del cáncer colorrectal (CRC), en donde el sujeto masculino se confirmó que no tiene CRC mediante una colonoscopia. El método comprende las etapas de: (a) obtener una muestra biológica obtenida de un sujeto masculino; (b) determinar los niveles del fragmento de citoqueratina 19 (CYFRA), proteína reactiva con C (CRP), un tejido inhibidor de metaloproteínasa 1 (TIMP-1), antígeno carbohidrato 19-9 (CA19-9) y alfa-fetoproteína (AFP) en la muestra biológica del sujeto masculino; (c) comparar los niveles de CYFRA, CRP, TIMP-1, CA19-9 y AFP en la muestra biológica en referencia a los niveles de CYFRA, CRP, TIMP-1, CA19-9 y AFP; (d) proporcionar una puntuación CYFRA para el sujeto masculino en donde el sujeto masculino obtiene una puntuación de 1 si el nivel de CYFRA en la muestra biológica es mayor que el nivel de referencia de CYFRA y una puntuación de 0 si el nivel de CYFRA en la muestra biológica es igual o inferior al nivel de referencia de CYFRA; (e) proporcionar una puntuación de CRP para el sujeto masculino en donde el sujeto masculino obtiene una puntuación de 1 si el nivel de CRP en la muestra biológica es mayor que el nivel de referencia de CRP y una puntuación de 0 si el nivel de CRP en la muestra biológica es igual o inferior al nivel de referencia de CRP; (f) proporcionar una puntuación de TIMP-1 para el sujeto masculino en donde el sujeto masculino obtiene una puntuación de 1 si el nivel de TIMP-1 en la muestra biológica es mayor que el nivel de referencia de TIMP-1 y una puntuación de 0 si el nivel de TIMP-1 en la muestra biológica es igual o inferior al nivel de referencia de TIMP-1; (g) proporcionar una puntuación

de CA19-9 para el sujeto masculino en donde el sujeto masculino obtiene una puntuación de 1 si el nivel de CA19-9 en la muestra biológica es inferior al nivel de referencia de CA19-9 y una puntuación de 0 si el nivel de CA19-9 en la muestra biológica es igual o mayor que el nivel de referencia de CA19-9; (h) proporcionar una puntuación de AFP para el sujeto masculino en donde el sujeto masculino obtiene una puntuación de 1 si el nivel de AFP en la muestra biológica es inferior al nivel de referencia de AFP y una puntuación de 0 si el nivel de AFP en la muestra biológica es igual o mayor que el nivel de referencia de AFP; (i) añadir la puntuación de CYFRA, la puntuación de CRP, la puntuación de TIMP-1, la puntuación de CA19-9 y la puntuación de AFP para generar una puntuación total; y (d) proporcionar un diagnóstico del sujeto masculino que padece o está en riesgo de padecer un cáncer distinto de CRC si la puntuación total es superior a la puntuación de referencia. Los niveles de referencia de CYFRA, CRP, TIMP-1, CA19-9 y AFP pueden ser los valores límite del CYFRA, CRP, TIMP-1, CA19-9 y AFP determinados por una metodología de modelo de índice adaptativo de muestras biológicas de un grupo de referencia. El grupo de referencia puede seleccionarse del grupo que consiste en un grupo de control y un grupo de cáncer. El nivel de referencia de CYFRA, CRP, TIMP-1, CA19-9 y AFP puede ser superior o igual a 1,0 ng/ml, 1,1 ng/ml, 1,2 ng/ml, 1,3 ng/ml, 1,4 ng/ml, 1,5 ng/ml, 1,6 ng/ml, 1,7 ng/ml, 1,8 ng/ml, 1,9 ng/ml, 2,0 ng/ml, 2,1 ng/ml, 2,2 ng/ml, 2,3 ng/ml, 2,4 ng/ml, 2,5 ng/ml, 3,0 ng/ml o 3,5 ng/ml en suero para CYFRA junto con niveles superiores o iguales a 14,0 ng/ml, 14,1 mg/ml, 14,2 mg/ml, 14,3 mg/ml, 14,4 mg/ml, 14,5 mg/ml, 14,6 mg/ml, 14,7 mg/ml, 14,8 mg/ml, 14,9 mg/ml, 15,0 mg/ml, 15,1 mg/ml, 15,2 mg/ml, 15,3 mg/ml, 15,4 mg/ml, 15,5 mg/ml, 15,6 mg/ml, 15,7 mg/ml, 15,8 mg/ml, 15,9 mg/ml, 16,0 mg/ml, 16,1 mg/ml, 16,2 mg/ml, 16,3 mg/ml, 16,4 mg/ml, 16,5 mg/ml, 17,0 mg/ml o 17,5 mg/ml en suero para CRP, los niveles superiores o iguales a 140 ng/ml, 141 ng/ml, 142 ng/ml, 143 ng/ml, 144 ng/ml, 145 ng/ml, 146 ng/ml, 147 ng/ml, 148 ng/ml, 149 ng/ml, 150 ng/ml, 151 ng/ml, 152 ng/ml, 153 ng/ml, 154 ng/ml, 155 ng/ml, 156 ng/ml, 157 ng/ml, 158 ng/ml, 159 ng/ml o 160 ng/ml en suero para TIMP-1, superiores o iguales a 24,0 U/ml, 24,1 U/ml, 24,2 U/ml, 24,3 U/ml, 24,4 U/ml, 24,5 U/ml, 24,6 U/ml, 24,7 U/ml, 24,8 U/ml, 24,9 U/ml, 25,0 U/ml, 25,1 U/ml, 25,2 U/ml, 25,3 U/ml, 25,4 U/ml, 25,5 U/ml, 25,6 U/ml, 25,7 U/ml, 25,8 U/ml, 25,9 U/ml, 26,0 U/ml o 26,5 U/ml en suero para CA19-9 y superiores o iguales a 5,0 ng/ml, 5,1 ng/ml, 5,2 ng/ml, 5,3 ng/ml, 5,4 ng/ml, 5,5 ng/ml, 5,6 ng/ml, 5,7 ng/ml, 5,8 ng/ml, 5,9 ng/ml, 6,0 ng/ml, 6,1 ng/ml, 6,2 ng/ml, 6,3 ng/ml, 6,4 ng/ml, 6,5 ng/ml, 6,6 ng/ml, 6,7 ng/ml, 6,8 ng/ml, 6,9 ng/ml, 7,0 ng/ml, 7,5 ng/ml u 8,0 ng/ml en suero para AFP. El nivel de referencia de CYFRA puede ser de al menos aproximadamente 2,13 ng/ml, el nivel de referencia de CRP puede ser de al menos aproximadamente 15,4 mg/ml, el nivel de referencia de TIMP-1 puede ser de al menos aproximadamente 148 ng/ml, el nivel de referencia de CA19-9 puede ser de al menos aproximadamente 25,0 U/ml y el nivel de referencia de AFP puede ser de al menos aproximadamente 6,7 ng/ml. La puntuación de referencia puede ser 0, 1, 2, 3, 4 o 5. Si la puntuación total es superior a 1, al sujeto se le podría diagnosticar como que padece o está en riesgo de padecer un cáncer distinto del CRC. El método puede comprender adicionalmente administrar un régimen de tratamiento del cáncer o un régimen de vigilancia del cáncer al sujeto diagnosticado como que padece o está en riesgo de padecer un cáncer distinto del CRC. El régimen de tratamiento del CRC puede comprender administrar al menos uno de cirugía, terapia radioterapéutica, tratamientos radioterapéuticos, quimioterapia, terapia dirigida o combinaciones de los mismos, al sujeto. El régimen de vigilancia del cáncer puede comprender determinar los niveles de CYFRA, CRP, TIMP-1, CA19-9 y AFP en intervalos periódicos. La determinación de los niveles de CYFRA, CRP, TIMP-1, CA19-9 y AFP puede comprender un método inmunológico con moléculas que se unen específicamente a CYFRA, CRP, TIMP-1, CA19-9 y AFP. Las moléculas que se unen específicamente a CYFRA, CRP, TIMP-1, CA19-9 y AFP pueden comprender al menos un anticuerpo capaz de unirse específicamente a CYFRA, CRP, TIMP-1, CA19-9 y AFP. La determinación del nivel de CYFRA, CRP, TIMP-1, CA19-9 y AFP puede implicar la etapa de poner en contacto la muestra biológica con al menos un anticuerpo seleccionado del grupo que consiste en: un anticuerpo que se une específicamente a CYFRA, un anticuerpo que se une específicamente a CRP, un anticuerpo que se une específicamente a TIMP-1, un anticuerpo que se une específicamente a CA19-9, un anticuerpo que se une específicamente a AFP y combinaciones de los mismos. La determinación del nivel de CYFRA, CRP, TIMP-1, CA19-9 y AFP puede implicar la etapa de evaluación de la muestra biológica para CYFRA, CRP, TIMP-1, CA19-9 y AFP mediante un inmunoensayo que emplea al menos un anticuerpo de captura y al menos un anticuerpo marcado con un marcador detectable, que genera una señal y comprende comparar una señal generada por el marcador detectable como una indicación directa o indirecta de la cantidad de CYFRA, CRP, TIMP-1, CA19-9 y AFP en la muestra biológica, en donde el anticuerpo de captura y el anticuerpo marcado con un marcador detectable comprenden: (a) al menos un anticuerpo de captura que se une específicamente a CYFRA y al menos un anticuerpo marcado con un marcador detectable; (b) al menos un anticuerpo de captura que se une específicamente a CRP y al menos un anticuerpo marcado con un marcador detectable; (c) al menos un anticuerpo de captura que se une específicamente a TIMP-1 y al menos un anticuerpo marcado con un marcador detectable; (d) al menos un anticuerpo de captura que se une específicamente a CA19-9 y al menos un anticuerpo marcado con un marcador detectable; y (e) al menos un anticuerpo de captura que se une específicamente a AFP y al menos un anticuerpo marcado con un marcador detectable. El método inmunológico puede comprender: (a) medir los niveles de CYFRA mediante: (i) poner en contacto la muestra de prueba con al menos un anticuerpo de captura, en donde el anticuerpo de captura se une a un epítipo sobre CYFRA o un fragmento de CYFRA para formar un complejo de anticuerpo de captura-antígeno de CYFRA; (ii) poner en contacto el complejo de anticuerpo de captura-antígeno de CYFRA con al menos un anticuerpo de detección que comprende un marcador detectable, en donde el anticuerpo de detección se une a un epítipo sobre CYFRA al que no se une el anticuerpo de captura y forma un complejo de anticuerpo de captura-antígeno de CYFRA-anticuerpo de detección; y (iii) determinar los niveles de CYFRA en la muestra de prueba basándose en la señal generada por el marcador detectable en el complejo de anticuerpo de captura-antígeno de CYFRA-anticuerpo de detección formado en (a)(ii); (b) medir los niveles de CRP mediante: (i) poner en contacto la muestra de prueba con al menos un anticuerpo de captura, en donde el anticuerpo de captura se une a

un epítipo sobre CRP o un fragmento de CRP para formar un complejo de anticuerpo de captura-antígeno de CRP; (ii) poner en contacto el complejo de anticuerpo de captura-antígeno de CRP con al menos un anticuerpo de detección que comprende un marcador detectable, en donde el anticuerpo de detección se une a un epítipo sobre CRP al que no se une el anticuerpo de captura y forma un complejo de anticuerpo de captura-antígeno de CRP-anticuerpo de detección; y (iii) determinar los niveles de CRP en la muestra de prueba basándose en la señal generada por el marcador detectable en el complejo de anticuerpo de captura-antígeno de CRP-anticuerpo de detección formado en (b)(ii); (c) medir los niveles de TIMP-1 mediante: (i) poner en contacto la muestra de prueba con al menos un anticuerpo de captura, en donde el anticuerpo de captura se une a un epítipo sobre TIMP-1 o un fragmento de TIMP-1 para formar un complejo de anticuerpo de captura-antígeno de TIMP-1; (ii) poner en contacto el complejo de anticuerpo de captura-antígeno de TIMP-1 con al menos un anticuerpo de detección que comprende un marcador detectable, en donde el anticuerpo de detección se une a un epítipo sobre TIMP-1 al que no se une el anticuerpo de captura y forma un complejo de anticuerpo de captura-antígeno de TIMP-1-anticuerpo de detección; y (iii) determinar los niveles de TIMP-1 en la muestra de prueba basándose en la señal generada por el marcador detectable en el complejo de anticuerpo de captura-antígeno de TIMP-1-anticuerpo de detección formado en (c)(ii); (d) medir los niveles de CA19-9 mediante: (i) poner en contacto la muestra de prueba con al menos un anticuerpo de captura, en donde el anticuerpo de captura se une a un epítipo sobre CA19-9 o un fragmento de CA19-9 para formar un complejo de anticuerpo de captura-antígeno de CA19-9; (ii) poner en contacto el complejo de anticuerpo de captura-antígeno de CA19-9 con al menos un anticuerpo de detección que comprende un marcador detectable, en donde el anticuerpo de detección se une a un epítipo sobre CA19-9 al que no se une el anticuerpo de captura y forma un complejo de anticuerpo de captura-antígeno de CA19-9-anticuerpo de detección; y (iii) determinar los niveles de CA19-9 en la muestra de prueba basándose en la señal generada por el marcador detectable en el complejo de anticuerpo de captura-antígeno de CA19-9-anticuerpo de detección formado en (d)(ii); y (e) medir los niveles de AFP mediante: (i) poner en contacto la muestra de prueba con al menos un anticuerpo de captura, en donde el anticuerpo de captura se une a un epítipo sobre AFP o un fragmento de AFP para formar un complejo de anticuerpo de captura-antígeno de AFP; (ii) poner en contacto el complejo de anticuerpo de captura-antígeno de AFP con al menos un anticuerpo de detección que comprende un marcador detectable, en donde el anticuerpo de detección se une a un epítipo sobre AFP al que no se une el anticuerpo de captura y forma un complejo de anticuerpo de captura-antígeno de AFP-anticuerpo de detección; y (iii) determinar los niveles de AFP en la muestra de prueba basándose en la señal generada por el marcador detectable en el complejo de anticuerpo de captura-antígeno de AFP-anticuerpo de detección formado en (e)(ii). El anticuerpo puede seleccionarse del grupo que consiste en: un anticuerpo policlonal, un anticuerpo monoclonal, un anticuerpo humano, una molécula de inmunoglobulina, un Fv ligado por disulfuro, un anticuerpo monoclonal, un anticuerpo madurado por afinidad, un scFv, un anticuerpo quimérico, un anticuerpo de un solo dominio, un anticuerpo con CDR injertadas, un diacuerpo, un anticuerpo humanizado, un anticuerpo multispecífico, un Fab, un anticuerpo dual específico, un DVD, un Fab', un anticuerpo biespecífico, un F(ab')₂ y un Fv. El método comprende adicionalmente determinar el nivel de al menos un biomarcador adicional de un cáncer diferente al CRC en la muestra biológica seleccionada del grupo que consiste en: Septina 9 metilada (mS9), Galectina-3 (Gal3), Hemoglobina glucosilada (HbA1c), C3a, Cathepsina X (Cat X), receptor de uroquinasa soluble (suPAR (I)), inhibidor del activador de plasminógeno-1 (PAI-1), Enolasa 2 (ENO2) o combinaciones de los mismos y comparar el nivel de al menos un biomarcador adicional de un cáncer distinto del CRC a un nivel de referencia para al menos un biomarcador adicional de un cáncer distinto al CRC. El cáncer puede ser de pulmón, ovario, mama, riñón, canal anal, primario desconocido, linfoma de linfocitos B, de útero, próstata, vesícula biliar, laringe, melanoma maligno, de páncreas, LLC, mieloma maligno, de testículos, intestino delgado, vejiga, estómago, mesotelioma, de glándula suprarrenal, neuroendocrino o de esófago. El sujeto puede ser un ser humano. La muestra biológica de un sujeto se puede seleccionar de una muestra de tejido, fluido corporal, sangre completa, plasma, suero, orina, fluido de lavado broncoalveolar y una suspensión de cultivo celular o una fracción de la misma. La muestra biológica de un sujeto es plasma sanguíneo o suero sanguíneo. En el presente documento se divulga también un kit para realizar dicho método. El kit que comprende: (a) un reactivo capaz de unirse específicamente a CYFRA, un reactivo capaz de unirse específicamente a CRP, un reactivo capaz de unirse específicamente a TIMP-1, un reactivo capaz de unirse específicamente a CA19-9 y un reactivo capaz de unirse específicamente a AFP para cuantificar los niveles de CYFRA, CRP, TIMP-1, CA19-9 y AFP en la muestra biológica de un sujeto; y (b) una referencia estándar indicando los niveles de referencia de CYFRA, CRP, TIMP-1, CA19-9 y AFP. El kit puede comprender adicionalmente al menos un reactivo adicional capaz de unirse específicamente a al menos un biomarcador adicional de Septina 9 metilada (mS9), Galectina-3 (Gal3), Hemoglobina glucosilada (HbA1c), C3a, Cathepsina X (Cat X), receptor de uroquinasa soluble (suPAR (I)), inhibidor del activador de plasminógeno-1 (PAI-1), Enolasa 2 (ENO2) o combinaciones de los mismos, en la muestra biológica para cuantificar la concentración de al menos un biomarcador adicional en la muestra biológica y una referencia estándar indicando un nivel de referencia de al menos un marcador adicional de Septina 9 metilada (mS9), Galectina-3 (Gal3), Hemoglobina glucosilada (HbA1c), C3a, Cathepsina X (Cat X), receptor de uroquinasa soluble (suPAR (I)), inhibidor del activador de plasminógeno-1 (PAI-1), Enolasa 2 (ENO2) o combinaciones de los mismos, en la muestra biológica.

En el presente documento se divulga también un método para determinar si un sujeto femenino padece o está en riesgo de padecer un cáncer distinto del cáncer colorrectal (CRC), en donde el sujeto femenino se confirmó que no tiene CRC mediante una colonoscopia. El método comprende las etapas de: (a) obtener una muestra biológica obtenida del sujeto femenino; (b) determinar los niveles del fragmento de citoqueratina 19 (CYFRA), antígeno carcinoembrionario (CEA) y proteína reactiva con C (CRP), en la muestra biológica del sujeto femenino; (c) comparar

los niveles de CYFRA, CEA y CRP en la muestra biológica en referencia a los niveles de CYFRA, CEA y CRP; y (d) proporcionar un diagnóstico del sujeto femenino como que padece o está en riesgo de padecer un cáncer distinto de CRC si los niveles de CYFRA, CEA y CRP en la muestra biológica son superiores que los niveles de referencia de CYFRA, CEA y CRP. Los niveles de referencia de CYFRA, CEA y CRP pueden ser los valores límite del CYFRA, CEA y CRP determinados por una metodología de modelo de índice adaptativo de muestras biológicas de un grupo de referencia. El grupo de referencia puede seleccionarse del grupo que consiste en un grupo de control y un grupo de cáncer. El nivel de referencia de CYFRA, CEA y CRP puede ser superior o igual a 1,0 ng/ml, 1,1 ng/ml, 1,2 ng/ml, 1,3 ng/ml, 1,4 ng/ml, 1,5 ng/ml, 1,6 ng/ml, 1,7 ng/ml, 1,8 ng/ml, 1,9 ng/ml, 2,0 ng/ml, 2,1 ng/ml, 2,2 ng/ml, 2,3 ng/ml, 2,4 ng/ml, 2,5 ng/ml, 3,0 ng/ml o 3,5 ng/ml en suero para CYFRA junto con niveles superiores o iguales a 4,0 ng/ml, 4,1 ng/ml, 4,2 ng/ml, 4,3 ng/ml, 4,4 ng/ml, 4,5 ng/ml, 4,6 ng/ml, 4,7 ng/ml, 4,8 ng/ml, 4,9 ng/ml, 5,0 ng/ml, 5,1 ng/ml, 5,2 ng/ml, 5,3 ng/ml, 5,4 ng/ml, 5,5 ng/ml, 5,6 ng/ml, 5,7 ng/ml, 5,8 ng/ml, 5,9 ng/ml, 6,0 ng/ml, 6,1 ng/ml, 6,2 ng/ml, 6,3 ng/ml, 6,4 ng/ml, 6,5 ng/ml, 6,6 ng/ml, 6,7 ng/ml, 6,8 ng/ml, 6,9 ng/ml, 7,0 ng/ml o 7,5 ng/ml en suero para CEA y niveles superiores o iguales a 9,0 ng/ml, 9,1 mg/ml, 9,2 mg/ml, 9,3 mg/ml, 9,4 mg/ml, 9,5 mg/ml, 9,6 mg/ml, 9,7 mg/ml, 9,8 mg/ml, 9,9 mg/ml, 10,0 mg/ml, 10,1 mg/ml, 10,2 mg/ml, 10,3 mg/ml, 10,4 mg/ml, 10,5 mg/ml, 10,6 mg/ml, 10,7 mg/ml, 10,8 mg/ml, 10,9 mg/ml, 11,0 mg/ml, 11,5 mg/ml o 12,0 mg/ml en suero para CRP. El nivel de referencia de CYFRA puede ser de al menos aproximadamente 2,06 ng/ml, el nivel de referencia de CEA puede ser de al menos aproximadamente 5,7 ng/ml y el nivel de referencia de CRP puede ser de al menos aproximadamente 10,4 mg/ml. La puntuación de referencia puede ser 0, 1, 2 o 3. Si la puntuación total es superior a 1, se podría diagnosticar al sujeto como que padece o está en riesgo de padecer CRC. El método puede comprender adicionalmente administrar un régimen de tratamiento del cáncer o un régimen de vigilancia del cáncer al sujeto diagnosticado como que padece o está en riesgo de padecer un cáncer distinto del CRC. El régimen de tratamiento del CRC puede comprender administrar al menos uno de cirugía, terapia radioterapéutica, tratamientos radioterapéuticos, quimioterapia, terapia dirigida o combinaciones de los mismos, al sujeto. El régimen de vigilancia del cáncer puede comprender determinar los niveles de CYFRA, CEA y CRP en intervalos periódicos. La determinación de los niveles de CYFRA, CEA y CRP puede comprender un método inmunológico con moléculas que se unen específicamente a CYFRA, CEA y CRP. Las moléculas que se unen específicamente a CYFRA, CEA y CRP pueden comprender al menos un anticuerpo capaz de unirse específicamente a CYFRA, CEA y CRP. La determinación del nivel de CYFRA, CEA y CRP puede implicar la etapa de poner en contacto la muestra biológica con al menos un anticuerpo seleccionado del grupo que consiste en: un anticuerpo que se une específicamente a CYFRA, un anticuerpo que se une específicamente a CEA, un anticuerpo que se une específicamente a CRP y combinaciones de los mismos. La determinación del nivel de CYFRA, CEA y CRP puede implicar la etapa de evaluación de la muestra biológica para CYFRA, CEA y CRP mediante un inmunoensayo que emplea al menos un anticuerpo de captura y al menos un anticuerpo marcado con un marcador detectable, que genera una señal y comprende comparar una señal generada por el marcador detectable como una indicación directa o indirecta de la cantidad de CYFRA, CEA y CRP en la muestra biológica, en donde el anticuerpo de captura y el anticuerpo marcado con un marcador detectable comprenden: (a) al menos un anticuerpo de captura que se une específicamente a CYFRA y al menos un anticuerpo marcado con un marcador detectable; (b) al menos un anticuerpo de captura que se une específicamente a CEA y al menos un anticuerpo marcado con un marcador detectable; y (c) al menos un anticuerpo de captura que se une específicamente a CRP y al menos un anticuerpo marcado con un marcador detectable. El método inmunológico puede comprender: (a) medir los niveles de CYFRA mediante: (i) poner en contacto la muestra de prueba con al menos un anticuerpo de captura, en donde el anticuerpo de captura se une a un epítipo sobre CYFRA o un fragmento de CYFRA para formar un complejo de anticuerpo de captura-antígeno de CYFRA; (ii) poner en contacto el complejo de anticuerpo de captura-antígeno de CYFRA con al menos un anticuerpo de detección que comprende un marcador detectable, en donde el anticuerpo de detección se une a un epítipo sobre CYFRA al que no se une el anticuerpo de captura y forma un complejo de anticuerpo de captura-antígeno de CYFRA-anticuerpo de detección; y (iii) determinar los niveles de CYFRA en la muestra de prueba basándose en la señal generada por el marcador detectable en el complejo de anticuerpo de captura-antígeno de CYFRA-anticuerpo de detección formado en (a)(ii); (b) medir los niveles de CEA mediante: (i) poner en contacto la muestra de prueba con al menos un anticuerpo de captura, en donde el anticuerpo de captura se une a un epítipo sobre CEA o un fragmento de CEA para formar un complejo de anticuerpo de captura-antígeno de CEA; (ii) poner en contacto el complejo de anticuerpo de captura-antígeno de CEA con al menos un anticuerpo de detección que comprende un marcador detectable, en donde el anticuerpo de detección se une a un epítipo sobre CEA al que no se une el anticuerpo de captura y forma un complejo de anticuerpo de captura-antígeno de CEA-anticuerpo de detección; y (iii) determinar los niveles de CEA en la muestra de prueba basándose en la señal generada por el marcador detectable en el complejo de anticuerpo de captura-antígeno de CEA-anticuerpo de detección formado en (b)(ii); (c) medir los niveles de CRP mediante: (i) poner en contacto la muestra de prueba con al menos un anticuerpo de captura, en donde el anticuerpo de captura se une a un epítipo sobre CRP o un fragmento de CRP para formar un complejo de anticuerpo de captura-antígeno de CRP; (ii) poner en contacto el complejo de anticuerpo de captura-antígeno de CRP con al menos un anticuerpo de detección que comprende un marcador detectable, en donde el anticuerpo de detección se une a un epítipo sobre CRP al que no se une el anticuerpo de captura y forma un complejo de anticuerpo de captura-antígeno de CRP-anticuerpo de detección; y (iii) determinar los niveles de CRP en la muestra de prueba basándose en la señal generada por el marcador detectable en el complejo de anticuerpo de captura-antígeno de CRP-anticuerpo de detección formado en (c)(ii). El anticuerpo puede seleccionarse del grupo que consiste en: un anticuerpo policlonal, un anticuerpo monoclonal, un anticuerpo humano, una molécula de inmunoglobulina, un Fv ligado por disulfuro, un anticuerpo monoclonal, un anticuerpo madurado por afinidad, un scFv, un anticuerpo quimérico, un anticuerpo de un solo dominio, un anticuerpo con CDR injertadas, un diacuerpo,

un anticuerpo humanizado, un anticuerpo multiespecífico, un Fab, un anticuerpo dual específico, un DVD, un Fab', un anticuerpo biespecífico, un F(ab')₂ y un Fv. El método puede comprender adicionalmente determinar el nivel de al menos un biomarcador adicional de un cáncer diferente al CRC en la muestra biológica seleccionada del grupo que consiste Septina 9 metilada (mS9), Galectina-3 (Gal3), Hemoglobina glucosilada (HbA1c), C3a, Catepsina X (Cat X), receptor de uroquinasa soluble (suPAR (I)), inhibidor del activador de plasminógeno-1 (PAI-1), Enolasa 2 (ENO2) o combinaciones de los mismos y comparar el nivel de al menos un biomarcador adicional de un cáncer distinto del CRC a un nivel de referencia para al menos un biomarcador adicional de un cáncer distinto al CRC. El cáncer puede ser de pulmón, ovario, mama, riñón, canal anal, primario desconocido, linfoma de linfocitos B, de útero, próstata, vesícula biliar, laringe, melanoma maligno, de páncreas, LLC, mieloma maligno, de testículos, intestino delgado, vejiga, estómago, mesotelioma, de glándula suprarrenal, neuroendocrino o de esófago. El sujeto puede ser un ser humano. La muestra biológica de un sujeto se puede seleccionar de una muestra de tejido, fluido corporal, sangre completa, plasma, suero, orina, fluido de lavado broncoalveolar y una suspensión de cultivo celular o una fracción de la misma. La muestra biológica de un sujeto es plasma sanguíneo o suero sanguíneo. En el presente documento se divulga también un kit para realizar dicho método. El kit que comprende: (a) un reactivo capaz de unirse específicamente a CYFRA, un reactivo capaz de unirse específicamente a CEA y un reactivo capaz de unirse específicamente a CRP cuantificar los niveles de CYFRA, CEA y CRP en la muestra biológica de un sujeto; y (b) una referencia estándar indicando los niveles de referencia de CYFRA, CEA y CRP. El kit puede comprender adicionalmente al menos un reactivo adicional capaz de unirse específicamente a al menos un biomarcador adicional de Septina 9 metilada (mS9), Galectina-3 (Gal3), Hemoglobina glucosilada (HbA1c), C3a, Catepsina X (Cat X), receptor de uroquinasa soluble (suPAR (I)), inhibidor del activador de plasminógeno-1 (PAI-1), Enolasa 2 (ENO2) o combinaciones de los mismos, en la muestra biológica para cuantificar la concentración de al menos un biomarcador adicional en la muestra biológica y una referencia estándar indicando un nivel de referencia de al menos un marcador adicional de Septina 9 metilada (mS9), Galectina-3 (Gal3), Hemoglobina glucosilada (HbA1c), C3a, Catepsina X (Cat X), receptor de uroquinasa soluble (suPAR (I)), inhibidor del activador de plasminógeno-1 (PAI-1), Enolasa 2 (ENO2) o combinaciones de los mismos, en la muestra biológica.

En el presente documento se divulga también un método para determinar si un sujeto femenino padece o está en riesgo de padecer un cáncer distinto del cáncer colorrectal (CRC), en donde el sujeto femenino se confirmó que no tiene CRC mediante una colonoscopia. El método comprende las etapas de: (a) obtener una muestra biológica obtenida de un sujeto femenino; (b) determinar los niveles del fragmento de citoqueratina 19 (CYFRA), antígeno carcinoembrionario (CEA) y proteína reactiva con C (CRP) en la muestra biológica del sujeto femenino; (c) comparar los niveles de CYFRA, CEA y CRP en la muestra biológica en referencia a los niveles de CYFRA, CEA y CRP; (d) proporcionar una puntuación CYFRA para el sujeto femenino en donde el sujeto femenino obtiene una puntuación de 1 si el nivel de CYFRA en la muestra biológica es mayor que el nivel de referencia de CYFRA y una puntuación de 0 si el nivel de CYFRA en la muestra biológica es igual o inferior al nivel de referencia de CYFRA; (e) proporcionar una puntuación de CEA para el sujeto femenino en donde el sujeto femenino obtiene una puntuación de 1 si el nivel de CEA en la muestra biológica es mayor que el nivel de referencia de CEA y una puntuación de 0 si el nivel de CEA en la muestra biológica es igual o inferior al nivel de referencia de CEA; (f) proporcionar una puntuación de CRP para el sujeto femenino en donde el sujeto femenino obtiene una puntuación de 1 si el nivel de CRP en la muestra biológica es mayor que el nivel de referencia de CRP y una puntuación de 0 si el nivel de CRP en la muestra biológica es igual o inferior al nivel de referencia de CRP; (g) proporcionar la puntuación de CYFRA, la puntuación de CEA y la puntuación de CRP para generar una puntuación total; y (d) proporcionar un diagnóstico de un sujeto femenino que padece o está en riesgo de padecer un cáncer distinto de CRC si la puntuación total es superior a una puntuación de referencia. Los niveles de referencia de CYFRA, CEA y CRP pueden ser los valores límite del CYFRA, CEA y CRP determinados por una metodología de modelo de índice adaptativo de muestras biológicas de un grupo de referencia. El grupo de referencia puede seleccionarse del grupo que consiste en un grupo de control y un grupo de cáncer. El nivel de referencia de CYFRA, CEA y CRP puede ser superior o igual a 1,0 ng/ml, 1,1 ng/ml, 1,2 ng/ml, 1,3 ng/ml, 1,4 ng/ml, 1,5 ng/ml, 1,6 ng/ml, 1,7 ng/ml, 1,8 ng/ml, 1,9 ng/ml, 2,0 ng/ml, 2,1 ng/ml, 2,2 ng/ml, 2,3 ng/ml, 2,4 ng/ml, 2,5 ng/ml, 3,0 ng/ml o 3,5 ng/ml en suero para CYFRA junto con niveles superiores o iguales a 4,0 ng/ml, 4,1 ng/ml, 4,2 ng/ml, 4,3 ng/ml, 4,4 ng/ml, 4,5 ng/ml, 4,6 ng/ml, 4,7 ng/ml, 4,8 ng/ml, 4,9 ng/ml, 5,0 ng/ml, 5,1 ng/ml, 5,2 ng/ml, 5,3 ng/ml, 5,4 ng/ml, 5,5 ng/ml, 5,6 ng/ml, 5,7 ng/ml, 5,8 ng/ml, 5,9 ng/ml, 6,0 ng/ml, 6,1 ng/ml, 6,2 ng/ml, 6,3 ng/ml, 6,4 ng/ml, 6,5 ng/ml, 6,6 ng/ml, 6,7 ng/ml, 6,8 ng/ml, 6,9 ng/ml, 7,0 ng/ml o 7,5 ng/ml en suero para CEA y niveles superiores o iguales a 9,0 ng/ml, 9,1 mg/ml, 9,2 mg/ml, 9,3 mg/ml, 9,4 mg/ml, 9,5 mg/ml, 9,6 mg/ml, 9,7 mg/ml, 9,8 mg/ml, 9,9 mg/ml, 10,0 mg/ml, 10,1 mg/ml, 10,2 mg/ml, 10,3 mg/ml, 10,4 mg/ml, 10,5 mg/ml, 10,6 mg/ml, 10,7 mg/ml, 10,8 mg/ml, 10,9 mg/ml, 11,0 mg/ml, 11,5 mg/ml o 12,0 mg/ml en suero para CRP. El nivel de referencia de CYFRA puede ser de al menos aproximadamente 2,06 ng/ml, el nivel de referencia de CEA puede ser de al menos aproximadamente 5,7 ng/ml y el nivel de referencia de CRP puede ser de al menos aproximadamente 10,4 mg/ml. La puntuación de referencia puede ser 0, 1, 2 o 3. Si la puntuación total es superior a 1, se podría diagnosticar al sujeto como que padece o está en riesgo de padecer CRC. El método puede comprender adicionalmente administrar un régimen de tratamiento del cáncer o un régimen de vigilancia del cáncer al sujeto diagnosticado como que padece o está en riesgo de padecer un cáncer distinto del CRC. El régimen de tratamiento del CRC puede comprender administrar al menos uno de cirugía, terapia radioterapéutica, tratamientos radioterapéuticos, quimioterapia, terapia dirigida o combinaciones de los mismos, al sujeto. El régimen de vigilancia del cáncer puede comprender determinar los niveles de CYFRA, CEA y CRP en intervalos periódicos. La determinación de los niveles de CYFRA, CEA y CRP puede comprender un método inmunológico con moléculas que se unen específicamente a CYFRA, CEA y CRP. Las moléculas que se unen específicamente a CYFRA, CEA y CRP

pueden comprender al menos un anticuerpo capaz de unirse específicamente a CYFRA, CEA y CRP. La determinación del nivel de CYFRA, CEA y CRP puede implicar la etapa de poner en contacto la muestra biológica con al menos un anticuerpo seleccionado del grupo que consiste en: un anticuerpo que se une específicamente a CYFRA, un anticuerpo que se une específicamente a CEA, un anticuerpo que se une específicamente a CRP y combinaciones de los mismos. La determinación del nivel de CYFRA, CEA y CRP puede implicar la etapa de evaluación de la muestra biológica para CYFRA, CEA y CRP mediante un inmunoensayo que emplea al menos un anticuerpo de captura y al menos un anticuerpo marcado con un marcador detectable, que genera una señal y comprende comparar una señal generada por el marcador detectable como una indicación directa o indirecta de la cantidad de CYFRA, CEA y CRP en la muestra biológica, en donde el anticuerpo de captura y el anticuerpo marcado con un marcador detectable comprenden: (a) al menos un anticuerpo de captura que se une específicamente a CYFRA y al menos un anticuerpo marcado con un marcador detectable; (b) al menos un anticuerpo de captura que se une específicamente a CEA y al menos un anticuerpo marcado con un marcador detectable; y (c) al menos un anticuerpo de captura que se une específicamente a CRP y al menos un anticuerpo marcado con un marcador detectable. El método inmunológico puede comprender: (a) medir los niveles de CYFRA mediante: (i) poner en contacto la muestra de prueba con al menos un anticuerpo de captura, en donde el anticuerpo de captura se une a un epítipo sobre CYFRA o un fragmento de CYFRA para formar un complejo de anticuerpo de captura-antígeno de CYFRA; (ii) poner en contacto el complejo de anticuerpo de captura-antígeno de CYFRA con al menos un anticuerpo de detección que comprende un marcador detectable, en donde el anticuerpo de detección se une a un epítipo sobre CYFRA al que no se une el anticuerpo de captura y forma un complejo de anticuerpo de captura-antígeno de CYFRA-anticuerpo de detección; y (iii) determinar los niveles de CYFRA en la muestra de prueba basándose en la señal generada por el marcador detectable en el complejo de anticuerpo de captura-antígeno de CYFRA-anticuerpo de detección formado en (a)(ii); (b) medir los niveles de CEA mediante: (i) poner en contacto la muestra de prueba con al menos un anticuerpo de captura, en donde el anticuerpo de captura se une a un epítipo sobre CEA o un fragmento de CEA para formar un complejo de anticuerpo de captura-antígeno de CEA; (ii) poner en contacto el complejo de anticuerpo de captura-antígeno de CEA con al menos un anticuerpo de detección que comprende un marcador detectable, en donde el anticuerpo de detección se une a un epítipo sobre CEA al que no se une el anticuerpo de captura y forma un complejo de anticuerpo de captura-antígeno de CEA-anticuerpo de detección; y (iii) determinar los niveles de CEA en la muestra de prueba basándose en la señal generada por el marcador detectable en el complejo de anticuerpo de captura-antígeno de CEA-anticuerpo de detección formado en (b)(ii); (c) medir los niveles de CRP mediante: (i) poner en contacto la muestra de prueba con al menos un anticuerpo de captura, en donde el anticuerpo de captura se une a un epítipo sobre CRP o un fragmento de CRP para formar un complejo de anticuerpo de captura-antígeno de CRP; (ii) poner en contacto el complejo de anticuerpo de captura-antígeno de CRP con al menos un anticuerpo de detección que comprende un marcador detectable, en donde el anticuerpo de detección se une a un epítipo sobre CRP al que no se une el anticuerpo de captura y forma un complejo de anticuerpo de captura-antígeno de CRP-anticuerpo de detección; y (iii) determinar los niveles de CRP en la muestra de prueba basándose en la señal generada por el marcador detectable en el complejo de anticuerpo de captura-antígeno de CRP-anticuerpo de detección formado en (c)(ii). El anticuerpo puede seleccionarse del grupo que consiste en: un anticuerpo policlonal, un anticuerpo monoclonal, un anticuerpo humano, una molécula de inmunoglobulina, un Fv ligado por disulfuro, un anticuerpo monoclonal, un anticuerpo madurado por afinidad, un scFv, un anticuerpo quimérico, un anticuerpo de un solo dominio, un anticuerpo con CDR injertadas, un diacuerpo, un anticuerpo humanizado, un anticuerpo multispecífico, un Fab, un anticuerpo dual específico, un DVD, un Fab', un anticuerpo biespecífico, un F(ab')₂ y un Fv. El método puede comprender adicionalmente determinar el nivel de al menos un biomarcador adicional de un cáncer diferente al CRC en la muestra biológica seleccionada del grupo que consiste en Septina 9 metilada (mS9), Galectina-3 (Gal3), Hemoglobina glucosilada (HbA1c), C3a, Cathepsina X (Cat X), receptor de uroquinasa soluble (suPAR (I)), inhibidor del activador de plasminógeno-1 (PAI-1), Enolasa 2 (ENO2) o combinaciones de los mismos y comparar el nivel de al menos un biomarcador adicional de un cáncer distinto del CRC a un nivel de referencia para al menos un biomarcador adicional de un cáncer distinto al CRC. El cáncer puede ser de pulmón, ovario, mama, riñón, canal anal, primario desconocido, linfoma de linfocitos B, de útero, próstata, vesícula biliar, laringe, melanoma maligno, de páncreas, LLC, mieloma maligno, de testículos, intestino delgado, vejiga, estómago, mesotelioma, de glándula suprarrenal, neuroendocrino o de esófago. El sujeto puede ser un ser humano. La muestra biológica de un sujeto se puede seleccionar de una muestra de tejido, fluido corporal, sangre completa, plasma, suero, orina, fluido de lavado broncoalveolar y una suspensión de cultivo celular o una fracción de la misma. La muestra biológica de un sujeto es plasma sanguíneo o suero sanguíneo. En el presente documento se divulga también un kit para realizar dicho método. El kit que comprende: (a) un reactivo capaz de unirse específicamente a CYFRA, un reactivo capaz de unirse específicamente a CEA y un reactivo capaz de unirse específicamente a CRP cuantificar los niveles de CYFRA, CEA y CRP en la muestra biológica de un sujeto; y (b) una referencia estándar indicando los niveles de referencia de CYFRA, CEA y CRP. El kit puede comprender adicionalmente al menos un reactivo adicional capaz de unirse específicamente a al menos un biomarcador adicional de Septina 9 metilada (mS9), Galectina-3 (Gal3), Hemoglobina glucosilada (HbA1c), C3a, Cathepsina X (Cat X), receptor de uroquinasa soluble (suPAR (I)), inhibidor del activador de plasminógeno-1 (PAI-1), Enolasa 2 (ENO2) o combinaciones de los mismos, en la muestra biológica para cuantificar la concentración de al menos un biomarcador adicional en la muestra biológica y una referencia estándar indicando un nivel de referencia de al menos un marcador adicional de Septina 9 metilada (mS9), Galectina-3 (Gal3), Hemoglobina glucosilada (HbA1c), C3a, Cathepsina X (Cat X), receptor de uroquinasa soluble (suPAR (I)), inhibidor del activador de plasminógeno-1 (PAI-1), Enolasa 2 (ENO2) o combinaciones de los mismos, en la muestra biológica.

Breve descripción de los dibujos

La Figura 1 muestra la distribución y los sujetos masculinos de la prueba del resultado 1.
 La Figura 2 muestra la distribución y los sujetos masculinos de la prueba del resultado 5.
 La Figura 3 muestra la distribución y los sujetos masculinos de la prueba del resultado 12.
 La Figura 4 muestra la distribución y los sujetos femeninos de la prueba del resultado 1.
 La Figura 5 muestra la distribución y los sujetos femeninos de la prueba del resultado 5.
 La Figura 6 muestra la distribución y los sujetos femeninos de la prueba del resultado 12.

Descripción detallada

La presente invención se dirige a analizar los niveles de alfa-fetoproteína (AFP), antígeno carcinoembrionario (CEA), ferritina, CYFRA 21-1 (CYFRA), antígeno carbohidrato 19-9 (CA19-9), tejido inhibidor de metaloproteínasa 1 (TIMP-1), galectina-3 (Gal3) y proteína reactiva con C (CRP) para identificar, diagnosticar y tratar cáncer colorrectal en un sujeto que lo necesita. Los biomarcadores se pueden utilizar para identificar o diagnosticar, lo que incluye ayudar a identificar o diagnosticar, un paciente con cáncer colorrectal, para identificar o ayudar en la identificación de si un paciente sufre de cáncer colorrectal o de adenomas de alto riesgo, para identificar o ayudar a identificar un paciente como un candidato para un régimen de detección estructural o un régimen de tratamiento de CRC, para clasificar el riesgo de un paciente de desarrollar cáncer colorrectal, así como para determinar o ayudar a determinar un diagnóstico, pronóstico o régimen de tratamiento. Los métodos descritos en el presente documento se pueden utilizar conjuntamente con otros biomarcadores y otros factores, tales como edad y/o comorbilidades con otras enfermedades, para identificar y diagnosticar, lo que incluye ayudar a identificar o diagnosticar, pacientes que padecen de adenomas de alto riesgo y/o CRC. Los métodos descritos en el presente documento se pueden adaptar para utilizarse en un sistema automatizado o un sistema semiautomatizado. Los métodos de la presente invención difieren de otros métodos de diagnóstico de cáncer colorrectal previos por la utilización de una combinación única de biomarcadores de AFP, CEA, ferritina, CYFRA, CA19-9, TIMP-1, Gal3 y CRP para identificar y diagnosticar, lo que incluye ayudar a identificar o diagnosticar, pacientes que padecen cáncer colorrectal. Estos métodos pueden predecir con precisión y determinar el riesgo de cáncer colorrectal en un sujeto. Estos métodos se pueden utilizar para cribar pacientes de alto riesgo a los que debe remitirse a una colonoscopia para confirmar y también para cribar pacientes de bajo riesgo que no necesitan una colonoscopia. La restricción de colonoscopia para individuos en riesgo de tener CRC mejorará el coste-beneficio del procedimiento de cribado en general.

Los encabezados de sección como se usan en esta sección y la divulgación completa tienen un fin sencillamente organizativo y no pretenden ser limitantes.

1. Definiciones

A menos que se definan de otra manera, todos los términos técnicos y científicos usados en el presente documento tienen el mismo significado que el comúnmente entendido por un experto habitual en la materia. En caso de conflicto, el presente documento prevalecerá, incluyendo las definiciones. Los métodos y materiales preferidos se describen más adelante, aunque pueden usarse métodos y materiales similares o equivalentes a los descritos en el presente documento en la práctica o ensayo de la presente invención. Todas las publicaciones, solicitudes de patente, patentes y otras referencias mencionadas en el presente documento se incorporan por referencia en su totalidad. Los materiales, métodos y ejemplos divulgados en el presente documento son únicamente ilustrativos y no pretenden ser limitantes.

Como se utiliza en el presente documento, las formas en singular "un", "una" y "el" o "la" incluyen referentes plurales salvo que el contexto indique claramente lo contrario. Para la cita de intervalos numéricos en el presente documento, se contempla explícitamente cada número intermedio con el mismo grado de precisión. Por ejemplo, para el intervalo de 6-9, se contemplan los números 7 y 8 además de 6 y 9 y para el intervalo 6,0-7,0, se contemplan explícitamente los números 6,0, 6,1, 6,2, 6,3, 6,4, 6,5, 6,6, 6,7, 6,8, 6,9 y 7,0.

El uso de "o" significa "y/o" a no ser que se indique otra cosa. Asimismo, el uso de las expresiones "que incluye" y "que tiene", así como otras formas de estas expresiones, tales como "incluye", "incluido", "tiene", y "tiene" no son limitantes.

Como se utiliza en la memoria descriptiva y en las reivindicaciones, los siguientes términos tienen los siguientes significados:

El término "adenoma" se refiere a un crecimiento de células epiteliales de origen glandular que pueden ser benignas o malignas. También se denominan pólipos adenomatosos. Los adenomas pueden ser pedunculados (cabeza grande con un tallo estrecho) o sésiles (base ancha). Se pueden clasificar como adenomas tubulares, adenomas tubulovelloso, adenomas vellosos y adenomas planos. El adenoma puede ser un adenocarcinoma. El adenoma puede ser un adenoma de un paciente humano que puede ser un adenoma grande de más de 10 cm, un adenoma pequeño de menos de 5 cm o un adenoma de entre 0,5 cm y 15 cm de longitud. Los adenomas se originan en el epitelio glandular y tienen una morfología displásica. Algunos de estos adenomas maduran hacia pólipos grandes,

experimentan un crecimiento y desarrollo anormales y por último progresan hacia CRC.

Un "adenoma del colon", también llamado pólipos adenomatosos o adenomas tubulares, son bastante frecuentes y se encuentran comúnmente en la colonoscopia. Aproximadamente un 70% de los pólipos extraídos son de este tipo. Los adenomas conllevan un riesgo de cáncer que aumenta a medida que el pólipo se hace más grande. Los pólipos adenomatosos a menudo no provocan síntomas, pero, si se detectan temprano, se pueden extirpar durante una colonoscopia antes de que se formen células cancerosas. Estos pólipos crecen lentamente y pueden tardar años en convertirse en cáncer. Debido a su tendencia a volverse malignos y posiblemente conducir hacia un cáncer de colon, estos se eliminan.

Los adenomas vellosos y tubulovellosos representan aproximadamente un 15% de los pólipos que se extirpan. Estos son los tipos de pólipos más graves, con un riesgo muy alto de cáncer según crecen. Con frecuencia, son sésiles (sin tallo), lo que hace su extracción más difícil. Los más pequeños se pueden quitar por partes, a veces en varias colonoscopias. Los adenomas vellosos sésiles más grandes pueden requerir cirugía para su extirpación completa.

La "alfa-fetoproteína" o "AFP", como se utiliza indistintamente en el presente documento, se refiere a una proteína que está codificada por el gen *AFP* en seres humanos. La AFP a veces se conoce como α -fetoproteína, alfa-1-fetoproteína, alfa-fetoglobulina y alfa proteína fetal. El gen *AFP* se encuentra en el brazo q del cromosoma 4. La AFP es una proteína plasmática importante producida por el saco vitelino y el hígado durante el desarrollo fetal. Se piensa que es la forma fetal de albúmina sérica. La AFP se une al cobre, níquel, ácidos grasos y bilirrubina y se encuentra en formas monoméricas, diméricas y triméricas. La AFP es una glicoproteína de 591 aminoácidos y una fracción de carbohidrato. La AFP puede detectarse y cuantificarse utilizando ARCHITECT® AFP de Abbott.

El "área bajo la curva" o "ABC" (en inglés, AUC) se refiere al área bajo una curva ROC. La ABC bajo una curva ROC es una medida de la precisión. Un área de 1 representa un ensayo perfecto, mientras que un área de 0,5 representa un ensayo insignificante. Una ABC preferida puede ser de al menos aproximadamente 0,700, al menos aproximadamente 0,750, al menos aproximadamente 0,800, al menos aproximadamente 0,850, al menos aproximadamente 0,900, al menos aproximadamente 0,910, al menos aproximadamente 0,920, al menos aproximadamente 0,930, al menos aproximadamente 0,940, al menos aproximadamente 0,950, al menos aproximadamente 0,960, al menos aproximadamente 0,970, al menos aproximadamente 0,980, al menos aproximadamente 0,990 o al menos aproximadamente 0,995.

"C3a" como se utiliza en el presente documento se refiere a una de las proteínas formadas por la escisión del componente 3 del complemento; siendo el otro C3b. C3a estimula la desgranulación de los mastocitos, desencadenando por tanto una respuesta inmune. C3a juega un papel importante en la quimiotaxis. C3a es también una anafilatoxina y la precursora de la importante citocina (adipocina) ASP, a través de su interacción con la carboxipeptidasa B.

"Cáncer" como se utiliza en el presente documento, se refiere al crecimiento no controlado y no regulado de células anormales en el organismo. Las células cancerosas también se denominan células malignas. El cáncer puede invadir partes cercanas del organismo y también puede diseminarse a partes más distantes del cuerpo a través del sistema linfático o del torrente sanguíneo. Los cánceres incluyen carcinoma adrenocortical, cáncer de ano, cáncer de vejiga, tumor cerebral, cáncer de mama, tumor carcinóide, gastrointestinal, carcinoma de sitio primario desconocido, cáncer de cuello uterino, cáncer de colon, cáncer de endometrio, cáncer de esófago, cáncer del conducto biliar extrahepático, familia de tumores de Ewing (PNET), tumor de células germinales extracraneal, cáncer de ojo melanoma intraocular, cáncer de vesícula biliar, cáncer gástrico (estómago), tumor de células germinales extragonadales, tumor trofoblástico gestacional, cáncer de cabeza y cuello, cáncer hipofaríngeo, carcinoma de células de islote, cáncer renal (cáncer de células renales), cáncer de laringe, leucemia linfoblástica aguda, leucemia, mielóide aguda, leucemia linfocítica crónica, leucemia mielógena crónica, tricoleucemia, cáncer de labio y de la cavidad oral, cáncer de hígado, cáncer de pulmón no microcítico, cáncer de pulmón microcítico, linfoma relacionado con SIDA, linfoma (primario) del sistema nervioso central, linfoma cutáneo de linfocitos T, linfoma de Hodgkin, linfoma no Hodgkin, mesotelioma maligno, melanoma, carcinoma de células de Merkel, cáncer de cuello escamoso metastásico con tumor primario oculto, mieloma múltiple y otras neoplasias de células plasmáticas, micosis fungoide, síndrome mielodisplásico, trastornos mieloproliferativos, cáncer nasofaríngeo, neuroblastoma, cáncer oral, cáncer orofaríngeo, osteosarcoma, cáncer de ovarios epitelial, tumor de células germinales ováricas, cáncer de páncreas, exocrino, cáncer de páncreas, carcinoma de células de islote, cáncer de seno paranasal y de cavidad nasal, cáncer paratiroideo, cáncer de pene, cáncer de la hipófisis, neoplasia de células plasmáticas, cáncer de próstata, rabdomiosarcoma, cáncer de recto, cáncer de células renales (cáncer de riñón), de células transicionales de la pelvis renal y el uréter, cáncer de las glándulas salivales, síndrome de Sezary, cáncer de piel, cáncer del intestino delgado, sarcoma de tejidos blandos, cáncer de testículos, timoma maligno, cáncer de tiroides, cáncer de uretra, cáncer de útero, Cáncer inusual infantil, cáncer de vagina, cáncer de vulva y tumor de Wilms.

El término "sujeto con cáncer", como se utiliza en el presente documento, significa que un sujeto tiene signos o síntomas clínicos de CRC, adenomas de alto riesgo y/o cáncer distinto del CRC. El sujeto con cáncer se evalúa clínicamente para la presencia de signos o síntomas de CRC, adenomas de alto riesgo y/o cáncer distinto del CRC, cuya evaluación puede incluir un examen físico de rutina y/o pruebas de laboratorio. Un "grupo de cáncer", como se

utiliza en el presente documento, se refiere a un grupo de sujetos con cáncer o sujetos que tienen signos o síntomas clínicos de CRC, adenomas de alto riesgo y/o cáncer distinto del CRC.

El "antígeno carbohidrato 19-9", "CA 19-9" o "CA19-9", como se utilizan indistintamente en el presente documento, se refieren a una glicoproteína de mucina derivada de una estirpe celular de carcinoma colorrectal humano. Está relacionada con la proteína del grupo sanguíneo de Lewis y está presente en el tejido epitelial del estómago, la vesícula biliar, el páncreas y la próstata. CA19-9 ha sido aprobado por la FDA para su utilización como ayuda en el tratamiento del cáncer de páncreas y está previsto para utilizarse conjuntamente con otra información de diagnóstico, tal como los procedimientos de imágenes de TC y IRM. CA19-9 pertenece al antígeno del grupo sanguíneo de Lewis sialilado. Algunos individuos pueden ser indetectables para CA19-9 porque son negativos al antígeno de Lewis. El aumento de CA19-9 en suero puede estar elevado también en pacientes con afecciones no malignas tales como pancreatitis y otras afecciones gastrointestinales (ARCHITECT CA19-9 XR Package Prospect 015-550 11/05 de Abbott). Los niveles elevados de CA19-9 pueden ser informativos para algunos cánceres de CRC. El CA19-9 puede detectarse y cuantificarse utilizando ARCHITECT® CA19-9 de Abbott.

El "antígeno carcinoembrionario" o "CEA", como se utiliza indistintamente en el presente documento, se refiere a una glicoproteína anclada a la superficie celular de glicosil fosfatidil inositol (GPI) cuyas glicofomas sialofucosiladas especializadas sirven como ligandos funcionales de L-selectina y E-selectina de carcinoma de colon. El CEA está implicado en la adhesión a células. El CEA es un antígeno asociado a tumores que se caracteriza por una glicoproteína que tiene un tamaño de aproximadamente 200 kDa. El CEA está aprobado por la FDA y previsto para utilizarse como una ayuda en el pronóstico y la gestión de pacientes con cáncer en pacientes con concentraciones cambiantes de CEA. El CEA es un marcador relacionado con el CRC y ha sido aprobado clínicamente para vigilar los cánceres GI, incluyendo el CRC. Se ha caracterizado su rendimiento para detectar algunos CRC. Se ha demostrado la relevancia clínica en los cánceres colorrectal, gástrico, de pulmón, de próstata, de páncreas y de ovario (prospecto 34-4067/R4 de ARCHITECT CEA de Abbott). La CEA puede detectarse y cuantificarse utilizando ARCHITECT® CEA de Abbott.

La expresión "enfermedad cardiovascular", "trastorno cardiovascular", o "CVD" (del inglés, cardiovascular disease), como se utiliza en el indistintamente en el presente documento, se refiere a varias enfermedades que afectan al corazón y al sistema circulatorio. La enfermedad cardiovascular abarca enfermedades y afecciones que incluyen, pero no se limitan a, arteriosclerosis, aterosclerosis, infarto de miocardio, síndrome coronario agudo, angina, insuficiencia cardíaca congestiva, aneurisma de la aorta, disección de la aorta, aneurisma ilíaco o femoral, embolia pulmonar, hipertensión primaria, fibrilación auricular, ictus, ataque isquémico transitorio, disfunción sistólica, disfunción diastólica, miocarditis, taquicardia atrial, fibrilación ventricular, endocarditis, arteriopatía, vasculitis, placa aterosclerótica, placa vulnerable, síndrome coronario agudo, ataque isquémico agudo, muerte súbita cardíaca, enfermedad vascular periférica, enfermedad arterial coronaria (CAD; del inglés, coronary artery disease), enfermedad arterial periférica (PAD; del inglés, peripheral artery disease) y enfermedad cerebrovascular.

La "catepsina X" o "Cat X", como se utiliza en el presente documento indistintamente, se refiere a una cisteína proteasa lisosómica implicada en los mecanismos de progresión maligna y está asociada con trastornos del sistema inmunitario y enfermedades neurodegenerativas. La Cat X también se conoce como catepsina B2, carboxipeptidasa de tipo cisteína, catepsina IV, catepsina Z, ácido carboxipeptidasa y carboxipeptidasa B lisosómica. La Cat X se secreta desde células tumorales como una proenzima y puede servir para predecir el estado de la enfermedad y el riesgo de muerte en pacientes con cáncer, así como para predecir la sensibilidad a tratamientos particulares. Los niveles séricos más elevados de Cat X se correlacionan con una supervivencia global más corta de los pacientes colorrectales.

"Cáncer colorrectal" o "CRC", como se utiliza indistintamente en el presente documento, se refiere a un cáncer que se origina en el intestino grueso (colon) o el recto (extremo del colon). Casi todos los CRC comienzan como pólipos no cancerosos (benignos) que lentamente se convierten en cáncer. "Cáncer de colon", como se utiliza en el presente documento, se refiere a cáncer del intestino grueso (colon). "Cáncer de recto", como se utiliza en el presente documento, se refiere al cáncer de las últimas pulgadas del colon que se conectan al ano.

El término "sujeto de control", como utiliza en el presente documento, quiere decir un sujeto sano, es decir, un sujeto que no tiene signos o síntomas clínicos de CRC, adenomas de alto riesgo y/o de cáncer distinto del CRC. Un sujeto de control puede tener adenomas de bajo riesgo pero no tiene ningún cáncer, incluido el CRC o adenomas de alto riesgo. El sujeto de control se evalúa clínicamente para la presencia signos o síntomas de CRC de otra forma no detectados, adenomas de alto riesgo y/o de cáncer distinto del CRC, cuya evaluación puede incluir un examen físico de rutina y/o pruebas de laboratorio. Un "grupo de control" como se utiliza en el presente documento, se refiere a un grupo de sujetos de control o sujetos sanos, es decir, un grupo de sujetos que no tienen signos o síntomas clínicos de CRC, adenomas de alto riesgo y/o de cáncer distinto del CRC.

La "proteína reactiva con C" o "CRP" (del inglés, C-reactive protein), como se utiliza indistintamente en el presente documento, se refiere a una proteína pentamérica anular que se encuentra en el plasma sanguíneo. La CRP es una proteína de fase aguda cuyos niveles aumentan en respuesta a una inflamación. La CRP se une a la fosfolipina expresada sobre la superficie de las células muertas o moribundas (y de algunos tipos de bacterias) para activar el

sistema del complemento a través del complejo C1Q. La CRP es sintetizada por el hígado en respuesta a factores liberados por macrófagos y células grasas (adipocitos). La CRP tiene 224 aminoácidos, tiene una masa molecular de monómeros de 25106 Da y tiene una forma pentamérica anular discoide. Se puede utilizar una prueba de CRP de alta sensibilidad (hs-CRP) para medir niveles bajos de CRP mediante nefelometría láser. La prueba da resultados en 25 minutos con una sensibilidad de hasta 0,04 mg/l. La inflamación es un sello distintivo temprano en el desarrollo del cáncer y la medición de la CRP puede ser útil en la evaluación del riesgo de cáncer del paciente.

"CYFRA 21-1" o "CYFRA" como se utiliza indistintamente en el presente documento se refiere a un fragmento de citoqueratina 19 que es soluble en suero y que puede ser un marcador tumoral circulante útil. Las citoqueratinas son proteínas epiteliales cuya expresión no se pierde durante la transformación maligna. Aunque se expresa en todos los fluidos corporales, la principal presencia de CYFRA es en los pulmones. Los niveles aumentan considerablemente en pacientes con carcinomas asociados a células epiteliales. El CYFRA y otros fragmentos de citoqueratina pueden estar elevados en muchos pacientes con CRC. El CYFRA puede detectarse y cuantificarse utilizando ARCHITECT® CYFRA 21-1 de Abbott.

"Diabetes" o "condición diabética", como se utiliza indistintamente en el presente documento, se refiere a una enfermedad en la que el cuerpo no produce o utiliza insulina correctamente. Las afecciones diabéticas incluyen diversos tipos de diabetes mellitus, incluyendo la diabetes mellitus Tipo 1 autoinmune e idiopática y la diabetes mellitus Tipo 2. La Organización Mundial de la Salud define la diabetes mellitus como que se tiene una concentración de glucosa plasmática en ayunas mayor o igual a 7,0 mmol/l (126 mg/dl) o un nivel de glucosa a las 2 horas mayor que igual a 11,1 mmol/l (200 mg/dl). La diabetes Tipo 1 es una enfermedad autoinmunitaria en la que el cuerpo en realidad no produce insulina. La diabetes tipo 1 se caracteriza por la pérdida total de células beta, por lo que el paciente requiere insulina por inyección. La diabetes tipo 1 representa el 10-15% de todos los casos de diabetes. La diabetes tipo 1 está fuertemente asociada con los autoanticuerpos y esta asociación se ha convertido en parte de la definición/clasificación de la diabetes tipo 1. La diabetes tipo 2 es un trastorno metabólico que resulta de la incapacidad del cuerpo para producir suficiente insulina o utilizarla correctamente. Es la forma más común de la enfermedad y representa el 85-90% de la diabetes. Las afecciones diabéticas también pueden incluir prediabetes, que se refiere a un estado fisiológico en el que los niveles de glucosa del paciente están por encima de lo normal, pero aún no están en los niveles establecidos para la diabetes. Si bien hay algunas personas diagnosticadas como prediabéticas que finalmente desarrollarán diabetes tipo 2, muchas personas con afecciones prediabéticas no la desarrollarán.

La expresión "dosis eficaz" como se utiliza en el presente documento significa una dosis de un fármaco eficaz durante periodos de tiempo necesarios, para lograr el resultado terapéutico deseado. Se puede determinar la dosis eficaz por un experto en la materia y puede variar de acuerdo con factores, tales como el estado de la enfermedad, edad, sexo y peso del individuo y de la capacidad del fármaco de provocar una respuesta deseada en el individuo.

"Enolasa 2", "gamma-enolasa", o "ENO2", como se utiliza indistintamente en el presente documento, se refiere a una enzima proteína que está codificada por el gen *ENO2* en seres humanos. ENO2, también conocida como enolasa específica de neuronas, es una fosfopiruvato hidratasa que se encuentra en neuronas maduras y células de origen neuronal. Durante el desarrollo en ratas y primates, se produce un cambio de alfa enolasa a gamma enolasa en el tejido neuronal. La detección de ENO2 con anticuerpos se puede utilizar para identificar células neuronales y células con diferenciación neuroendocrina. La ENO2 se produce por carcinomas de células pequeñas que son de origen neuroendocrino. ENO2 es un marcador tumoral útil para pacientes con cáncer de pulmón.

"Ferritina", como se utiliza en el presente documento, se refiere a una proteína intracelular ubicua que almacena hierro y lo libera de manera controlada. La proteína se produce por casi todos los organismos vivos, incluyendo algas, bacterias, plantas superiores y animales. En seres humanos, la ferritina actúa como un tampón contra la deficiencia de hierro y la sobrecarga de hierro. La ferritina se encuentra en la mayoría de tejidos como una proteína citosólica, pero se secretan pequeñas cantidades en el suero, donde funciona como un vehículo del hierro. La ferritina plasmática también es un marcador indirecto de la cantidad total de hierro almacenado en el cuerpo, por lo tanto la ferritina sérica se utiliza como prueba de diagnóstico para la anemia por deficiencia de hierro. La ferritina es un complejo proteico globular que consta de 24 subunidades proteicas y es la principal proteína de almacenamiento de hierro intracelular tanto en procariotas como en eucariotas, manteniendo el hierro en una forma soluble y no tóxica. La ferritina que no se combina con hierro se llama apoferritina. La ferritina, como la CRP, se considera un reactante de fase aguda, con niveles que se incrementan en diversas afecciones clínicas, incluyendo infecciones y cánceres. Algunos complejos de ferritina en vertebrados son heterooligómeros de dos productos génicos altamente relacionados con propiedades fisiológicas ligeramente diferentes. La proporción de las dos proteínas homólogas en el complejo depende de los niveles de expresión relativa de los dos genes. La ferritina puede detectarse y cuantificarse utilizando ARCHITECT® ferritin de Abbott.

"Galectina-3" o "Gal3", como se utiliza indistintamente en el presente documento, se refiere a una proteína de unión a β -galactósido multifuncional implicada en la progresión y metástasis de un tumor. Gal3 se incrementa en los cánceres y su ligando galectina-3 compañero de unión se eleva en cánceres colorrectales. Gal3 es un miembro de la familia de proteínas, es decir, la familia de las galectinas, que se define por su especificidad de unión a los azúcares β -galactósidos, tales como la N-acetilactosamina (Gal β 1-3GlcNAc o Gal β 1-4GlcNAc), que se puede unir a proteínas

mediante glicosilación ligada a N o ligada a O. A diferencia de la mayoría de las lectinas, las galectinas no están unidas a la membrana, sino que son proteínas solubles con funciones tanto intra como extracelulares. Las galectinas tienen distribuciones distintas pero superpuestas, pero se encuentran principalmente en el citosol, núcleo, matriz extracelular o en circulación. Gal3 puede detectarse y cuantificarse utilizando ARCHITECT® Galectin-3 de Abbott.

"Hemoglobina glucosilada" o "HbA1c", como se utiliza indistintamente en el presente documento, se refiere a una forma de hemoglobina que se mide principalmente para identificar la concentración promedio de glucosa plasmática durante períodos de tiempo prolongados. La HbA1c se forma en una ruta de glucosilación no enzimática mediante exposición de la hemoglobina a la glucosa plasmática. Los niveles normales de glucosa producen una cantidad normal de hemoglobina glucosilada. Según aumenta la cantidad promedio de glucosa plasmática, la fracción de hemoglobina glucosilada aumenta de forma predecible. Esto sirve como un marcador de los niveles promedio de glucosa en sangre durante los meses previos a la medición.

"Adenoma de alto riesgo" como se utiliza en el presente documento, se refiere a pacientes con adenomas tubulares que son superiores a 1 cm, 3 o más adenomas, elementos vellosos o neoplasia de alto grado (por patología). Los adenomas de alto riesgo pueden considerarse lesiones precancerosas.

La expresión "control normal" o "control sano" como se utiliza en el presente documento significa una muestra o espécimen tomado de un sujeto o un sujeto real que no tiene CRC u otro cáncer o que no tiene riesgo de desarrollar cáncer.

"Adenomas de bajo riesgo", como se utiliza en el presente documento, se refiere a pacientes con 1-2 adenomas tubulares de menos de 1 cm de diámetro sin displasia de alto grado.

"Septina 9 metilada" o "mS9", como se utiliza indistintamente en el presente documento, se refiere a un marcador con indicaciones clínicas relacionadas con la ayuda en la detección temprana del CRC. La metilación de la región promotora de la Septina 9, también denominada modificación epigenética, se ha asociado con el cáncer colorrectal. La determinación de eventos epigenéticos es una herramienta útil para la detección temprana de enfermedades, dado que la regulación de la expresión génica mediante metilación aberrante del ADN es un evento bien caracterizado en biología tumoral y se ha descrito ampliamente para el CRC. Se ha informado de niveles aumentados de ADN metilado circulante libre de células en la sangre de pacientes con cáncer en comparación con controles sanos y se pueden utilizar como un objetivo para la detección de CRC. El ensayo de mS9 en tiempo real de cáncer colorrectal de Abbott (Abbott RealTime mS9 Colorrectal Cancer) es una prueba de reacción en cadena de la polimerasa (PCR) *in vitro* para la detección cualitativa de la presencia de Septina 9 metilada en plasma.

"Neoplasia", como se utiliza en el presente documento, se refiere a un crecimiento anormal de tejido. La neoplasia se conoce comúnmente como un tumor. El crecimiento anormal normalmente, pero no siempre, forma una masa. "Neoplasia colorrectal", como se utiliza en el presente documento, se refiere a un crecimiento anormal en el colon o recto.

"Neoplasias malignas no relacionadas con el CRC" o "cáncer no de tipo CRC", como se utiliza indistintamente en el presente documento, se refiere a un cáncer que no es el CRC.

"Inhibidor del activador de plasminógeno-1" o "PAI-1", como se utiliza indistintamente en el presente documento, se refiere a una proteína que está codificada por el gen *SERPINE1* en seres humanos. PAI-1 también se conoce como inhibidor del activador del plasminógeno endotelial o serpina E1. PAI-1 es un inhibidor de serina proteasa (serpina) que funciona como el principal inhibidor del activador del plasminógeno tisular (tPA) y uroquinasa (uPA), los activadores del plasminógeno y por lo tanto de la fibrinólisis (la descomposición fisiológica de los coágulos sanguíneos). PAI-1 es el principal inhibidor de los activadores del plasminógeno.

"Límite predeterminado", "límite", "nivel predeterminado", y "nivel de referencia", como se utiliza en el presente documento, se refieren a un valor límite de ensayo que se utiliza para evaluar resultados de eficacia diagnóstica, pronóstica o terapéutica, mediante la comparación de los resultados del ensayo con el límite/nivel predeterminado, donde el límite/nivel predeterminado ya se ha vinculado o asociado con diversos parámetros clínicos (por ejemplo, presencia de la enfermedad, estadio de la enfermedad, gravedad de la enfermedad, progresión, no progresión o mejora de la enfermedad, etc.). La divulgación proporciona niveles predeterminados y niveles de referencia ejemplares. Sin embargo, es de sobra conocido que los valores límite pueden variar dependiendo de la naturaleza del inmunoensayo (por ejemplo, anticuerpos empleados, condiciones de reacción, pureza de la muestra, etc.). Además, se encuentra dentro de las capacidades de la técnica la adaptación de la divulgación del presente documento para otros inmunoensayos a fin de obtener valores límite específicos de inmunoensayo para estos otros inmunoensayos basándose en la descripción proporcionada por la presente divulgación. Aunque el valor preciso del límite/nivel predeterminado puede variar entre ensayos, han de ser aplicables generalmente las correlaciones como se describen en el presente documento.

"Evaluación de riesgo", "clasificación de riesgo", "identificación de riesgo" o "estratificación de riesgo" de sujetos (por ejemplo, pacientes), como se utiliza en el presente documento, se refiere a la evaluación de factores que incluyen

biomarcadores, para predecir el riesgo de aparición de eventos futuros, incluyendo aparición de enfermedad o progresión de enfermedad, de tal forma que pueden efectuarse decisiones de tratamiento referentes al sujeto de una manera más informada.

- 5 "Muestra", "muestra biológica", "muestra de ensayo", "especimen", "muestra de un sujeto", y "muestra de paciente", como se utiliza en el presente documento, pueden utilizarse indistintamente y pueden ser una muestra de sangre, tejido, orina, suero, plasma, fluido amniótico, líquido cefalorraquídeo, células o tejido placentario, células endoteliales, leucocitos o monocitos. La muestra puede utilizarse directamente como se obtiene de un paciente o puede pretratarse, tal como mediante filtración, destilación, extracción, concentración, centrifugación, inactivación de
10 componentes interferentes, adición de reactivos y similares, para modificar de algún modo el carácter de la muestra como se analiza en el presente documento o de otro modo como se conoce en la técnica.

Cualquier tipo de célula, tejido o fluido corporal se puede utilizar para obtener una muestra. Dichos tipos celulares, tejidos y fluidos pueden incluir secciones de tejidos, tales como muestras de biopsia y autopsia, secciones congeladas tomadas con fines histológicos, sangre (tal como sangre completa), plasma, suero, esputo, heces, lágrimas, moco, saliva, líquido de lavado broncoalveolar (BAL; del inglés, bronchoalveolar lavage), cabello, piel, glóbulos rojos, plaquetas, líquido intersticial, fluido de la lente ocular, líquido cefalorraquídeo, sudor, líquido nasal, líquido sinovial, menstruación, fluido amniótico, semen, etc. Los tipos celulares y tejidos también pueden incluir fluido linfático, fluido ascítico, fluido ginecológico, orina, fluido peritoneal, líquido cefalorraquídeo, un fluido recogido
20 mediante aclarado vaginal o un fluido recogido mediante enjuague vaginal. Puede proporcionarse un tejido o tipo celular retirando una muestra de células de un animal, pero también puede lograrse utilizando células previamente aisladas (por ejemplo, aisladas por otra persona, en otro momento y/o con otro fin). Los tejidos de archivo, como los que tienen antecedentes de tratamiento o resultados, también pueden utilizarse. Pueden no ser necesarios el aislamiento y/o la purificación de proteínas o nucleótidos.

25 Los métodos conocidos en la técnica para recoger, manejar y procesar orina, sangre, suero y plasma y otros fluidos corporales, se utilizan en la práctica de la presente divulgación. La muestra de prueba puede comprender fracciones adicionales además del analito de interés, tales como anticuerpos, antígenos, haptenos, hormonas, fármacos, enzimas, receptores, proteínas, péptidos, polipéptidos, oligonucleótidos o polinucleótidos. Por ejemplo, la muestra puede ser una muestra de sangre completa obtenida de un sujeto. Puede ser necesario o deseado que una muestra de prueba, particularmente sangre entera, se trate antes del inmunoensayo como se describe en el presente documento, por ejemplo, con un reactivo de pretratamiento. Incluso en casos en que no es necesario el pretratamiento (por ejemplo, la mayoría de las muestras de orina, una muestra archivada preprocesada, etc.), el pretratamiento de la muestra es una opción que se puede hacer por mera conveniencia (por ejemplo, como parte de
30 un protocolo sobre una plataforma comercial). La muestra puede utilizarse directamente como se obtiene del sujeto o siguiendo un pretratamiento para modificar una característica de la muestra. El pretratamiento puede incluir extracción, concentración, inactivación de componentes que interfieren y/o la adición de reactivos.

40 El término "sensibilidad", como se utiliza en el presente documento, se refiere al número de positivos verdaderos dividido por el número de positivos verdaderos más el número de negativos falsos, donde la sensibilidad ("sens") puede estar dentro del intervalo de $0 < \text{sens} < 1$. Idealmente, las realizaciones del método del presente documento tienen un número de negativos falsos igual a cero o casi igual a cero, de manera que ningún sujeto se identifique erróneamente como sin adenoma cuando en realidad tiene adenoma. En cambio, a menudo se realiza una evaluación de la capacidad de un algoritmo de predicción para clasificar correctamente los negativos, una medida complementaria a la sensibilidad.

El término "especificidad", como se utiliza en el presente documento, se refiere al número de negativos verdaderos dividido por el número de positivos falsos, donde la especificidad ("spec") puede estar dentro del intervalo de $0 < \text{spec} < 1$. Idealmente, los métodos descritos en el presente documento tienen un número de positivos falsos igual a cero o casi igual a cero, de manera que ningún sujeto se identifique erróneamente como que tiene adenoma cuando en realidad no tiene adenoma. Por lo tanto, se prefiere un método que tenga tanto una sensibilidad como una especificidad iguales a uno o al 100%.

55 El término "sujeto", "paciente" o "sujeto en el método" como se utiliza indistintamente en el presente documento, significa cualquier vertebrado, incluyendo, aunque no de forma limitativa, un mamífero (por ejemplo, vaca, cerdo, camello, llama, caballo, cabra, conejo, oveja, hámsteres, cobaya, gato, perro, rata y ratón, un primate no humano (por ejemplo, un mono, tal como un mono cinomolgo o rhesus, chimpancé, etc.) y un ser humano. En algunas realizaciones, el sujeto puede ser un ser humano o un animal no humano. En algunas realizaciones, el sujeto puede ser un sujeto humano en riesgo o bajo sospecha de tener riesgo de desarrollar o de que ya tiene adenomas de alto riesgo, CRC y/o cáncer distinto del CRC. En algunas realizaciones, el sujeto puede ser un sujeto humano que puede tener una enfermedad cardiovascular y/o diabetes y puede tener riesgo de desarrollar o ya tener adenomas de alto riesgo, CRC y/o cáncer distinto del CRC.

65 "Receptor de uroquinasa soluble" o "suPAR (I)", como se utiliza indistintamente en el presente documento, se refiere a la forma soluble de uPAR, que es un receptor de uroquinasa (uPA) unido a la membrana. suPAR (I) también se conoce como suPAR y receptor activador de plasminógeno de tipo uroquinasa soluble. suPAR resulta de la escisión

y liberación de uPAR unido a la membrana. La concentración de suPAR se correlaciona positivamente con el nivel de activación del sistema inmunitario y está presente en plasma, orina, sangre, suero y líquido cefalorraquídeo. suPAR es un biomarcador para la activación de los sistemas inflamatorio e inmunitario. Los niveles de suPAR se correlacionan positivamente con biomarcadores proinflamatorios, tales como el factor de necrosis tumoral- α , recuentos de leucocitos y proteína reactiva con C. Los niveles elevados de suPAR se asocian con un riesgo aumentado del síndrome de respuesta inflamatoria (SRIS; del inglés, systemic inflammatory response syndrome), cáncer, glomeruloesclerosis focal y segmentaria, enfermedad cardiovascular, diabetes tipo 2, enfermedades infecciosas, VIH y mortalidad. suPARnostic es una prueba de pronóstico utilizada para detectar los niveles de suPAR en el plasma sanguíneo.

"Inhibidor tisular de metaloproteinasas-1" o "TIMP-1", como se utiliza indistintamente en el presente documento, se refiere a una glicoproteína que es un miembro de la familia TIMP y se expresa a partir de diversos tejidos de organismos. TIMP-1 es una molécula con funciones dentro de los procesos de crecimiento, invasión y diseminación. TIMP-1 es un inhibidor natural de la matriz de metaloproteinasas (MMP), un grupo de peptidasas implicadas en la degradación de la matriz extracelular. Además, la proteína codificada es capaz de promover la proliferación celular en una amplia gama de tipos de células y puede tener también una función antiapoptótica. Se encontró que TIMP-1 estaba elevado en más del 85% de los pacientes, que estaban programados para ser sometidos a cirugía para un CRC, en comparación con otras enfermedades malignas o inflamatorias y con individuos sin enfermedad. El TIMP-1 puede estar elevado en el plasma de muchos pacientes con CRC. El TIMP-1 puede detectarse y cuantificarse utilizando el ARCHITECT® Tissue Inhibitor of Metalloproteinases-1 (TIMP-1) de Abbott.

Las expresiones "tratar", "tratado", "que trata", como se utilizan en el presente documento, se refieren a un tratamiento en el que el objetivo es ralentizar (disminuir) una afección, trastorno o enfermedad u obtener resultados clínicos beneficiosos o deseados. Para los fines de esta invención, los resultados clínicos beneficiosos o deseados incluyen, pero sin limitación, alivio de síntomas; disminución del alcance de la afección, trastorno o enfermedad; estabilización (es decir, no empeoramiento) del estado de la afección, trastorno o enfermedad; retraso en la aparición o ralentización de la progresión de la afección, trastorno o enfermedad; mejora de la afección, trastorno o estado de la enfermedad; y remisión (ya sea parcial o total), ya sea detectable o indetectable, o mejora o mejoría de la afección, trastorno o enfermedad. El tratamiento también incluye prolongar la supervivencia en comparación con la supervivencia esperada si no se recibe tratamiento.

Salvo que se defina de otra forma en el presente documento, los términos científicos y técnicos utilizados en relación con la presente divulgación han de tener los significados que se entienden comúnmente por los expertos habituales en la materia. Por ejemplo, cualquier nomenclatura utilizada vinculada con, y las técnicas de, cultivo celular y cultivo de tejidos, biología molecular, inmunología, microbiología, genética y química e hibridación de proteínas y de ácidos nucleicos descritas en el presente documento son aquellas que son bien conocidas y comúnmente utilizadas en la técnica. El significado y alcance de los términos ha de ser claro; en el caso, sin embargo, de cualquier ambigüedad latente, las definiciones proporcionadas en el presente documento tienen precedencia sobre cualquier diccionario o definición extrínseca. De forma adicional, salvo que el contexto requiera otra cosa, los términos en singular incluirán las pluralidades y los términos en plural incluirán el singular.

2. Combinaciones de biomarcadores

La presente invención se dirige a métodos de utilización de una combinación de biomarcadores para la detección de neoplasias de colon y recto (por ejemplo, adenomas de alto grado) y cánceres colorrectales en etapa temprana (CRC). Estos biomarcadores, es decir, los biomarcadores AFP, CEA, ferritina, CYFRA, CA19-9, TIMP-1, Gal3 y CRP, pueden utilizarse combinados entre sí y/o junto con otros factores en los métodos de la presente invención para (1) identificar y determinar si un sujeto padece o está en riesgo de padecer adenomas de alto riesgo y/o CRC o no; (2) identificar y determinar si un sujeto masculino o femenino padece o está en riesgo de padecer un cáncer distinto del CRC; (3) proporcionar un diagnóstico o ayudar en el diagnóstico de adenomas de alto riesgo y/o CRC en un sujeto; (4) proporcionar o ayudar a proporcionar un diagnóstico, pronóstico y/o estratificación del riesgo de adenomas de alto riesgo y/o CRC en un sujeto que tiene o se sospecha que tiene adenomas de alto riesgo y/o CRC; (5) diferenciar entre sujetos con adenomas de alto riesgo y/o CRC y adenomas de bajo riesgo y/o sin cáncer; (6) diferenciar entre sujetos con CRC y sin cáncer; y (7) vigilar la progresión del CRC en un sujeto.

Por ejemplo, al menos dos biomarcadores, al menos tres biomarcadores, al menos cuatro biomarcadores, al menos cinco biomarcadores, al menos seis biomarcadores, al menos siete biomarcadores o al menos ocho biomarcadores seleccionados del grupo de los biomarcadores AFP, CEA, ferritina, CYFRA, CA19-9, TIMP-1, Gal3 y CRP, pueden utilizarse en los métodos que se describen más adelante. Por ejemplo, una combinación de biomarcadores puede incluir AFP y al menos uno, al menos dos, al menos tres, al menos cuatro, al menos cinco, al menos seis o al menos siete de CEA, ferritina, CYFRA, CA19-9, TIMP-1, Gal3 o CRP; CEA y al menos uno, al menos dos, al menos tres, al menos cuatro, al menos cinco, al menos seis o al menos siete de AFP, ferritina, CYFRA, CA19-9, TIMP-1, Gal3 o CRP; ferritina y al menos uno, al menos dos, al menos tres, al menos cuatro, al menos cinco, al menos seis o al menos siete de AFP, CEA, CYFRA, CA19-9, TIMP-1, Gal3 o CRP; CYFRA y al menos uno, al menos dos, al menos tres, al menos cuatro, al menos cinco, al menos seis o al menos siete de AFP, CEA, ferritina, CA19-9, TIMP-1, Gal3 o CRP; CA19-9 y al menos uno, al menos dos, al menos tres, al menos cuatro, al menos cinco, al menos seis o al

menos siete de AFP, CEA, ferritina, CYFRA, TIMP-1, Gal3 o CRP; TIMP-1 y al menos uno, al menos dos, al menos tres, al menos cuatro, al menos cinco, al menos seis o al menos siete de AFP, CEA, ferritina, CYFRA, CA19-9, Gal3 o CRP; Gal3 y al menos uno, al menos dos, al menos tres, al menos cuatro, al menos cinco, al menos seis o al menos siete de AFP, CEA, ferritina, CYFRA, CA19-9, TIMP-1 o CRP; o CRP y al menos uno, al menos dos, al menos tres, al menos cuatro, al menos cinco, al menos seis o al menos siete de AFP, CEA, ferritina, CYFRA, CA19-9, Gal3 o TIMP-1.

Los métodos incluyen obtener una muestra biológica de un sujeto, determinar los niveles de la combinación elegida de biomarcadores en la muestra biológica y comparar los niveles de los biomarcadores elegidos en la muestra biológica con los niveles de referencia de los biomarcadores elegidos. Las diferencias en los niveles entre los biomarcadores elegidos en la muestra biológica y los niveles de referencia pueden utilizarse para proporcionar un diagnóstico del sujeto.

Los métodos incluyen obtener una muestra biológica de un sujeto, determinar los niveles de la combinación elegida de biomarcadores en la muestra biológica y comparar los niveles de los biomarcadores elegidos en la muestra biológica con los niveles de referencia de los biomarcadores elegidos. La diferencia en los niveles entre los biomarcadores elegidos en la muestra biológica y los niveles de referencia pueden utilizarse para generar puntuaciones, que se utilizan para proporcionar un diagnóstico del sujeto. Para un biomarcador particular, se da una puntuación de 1 o 0 si el nivel del biomarcador en la muestra biológica es superior o inferior al nivel de referencia del biomarcador. Las puntuaciones generadas para cada uno de los biomarcadores se suman para generar una puntuación total. La puntuación total se compara con una puntuación de referencia y el diagnóstico del sujeto se basa en si la puntuación total es superior a la puntuación de referencia. La puntuación de referencia puede ser un número entre 0 y la puntuación total máxima posible para una combinación particular de biomarcadores. La puntuación total máxima para una combinación particular de biomarcadores es el número de biomarcadores utilizados en el método. Por ejemplo, la puntuación de referencia puede ser 0, 1 o 2 para una combinación de 2 biomarcadores, la puntuación de referencia puede ser 0, 1, 2 o 3 para una combinación de 3 biomarcadores, la puntuación de referencia puede ser 0, 1, 2, 3 o 4 para una combinación de 4 biomarcadores, la puntuación de referencia puede ser 0, 1, 2, 3, 4 o 5 para una combinación de 5 biomarcadores, la puntuación de referencia puede ser 0, 1, 2, 3, 4, 5 o 6 para una combinación de 6 biomarcadores, la puntuación de referencia puede ser 0, 1, 2, 3, 4, 5, 6 o 7 para una combinación de 7 biomarcadores, la puntuación de referencia puede ser 0, 1, 2, 3, 4, 5, 6, 7 u 8 para una combinación de 8 biomarcadores, la puntuación de referencia puede ser 0, 1, 2, 3, 4, 5, 6, 7, 8 o 9 para una combinación de 9 biomarcadores o la puntuación de referencia puede ser 0, 1, 2, 3, 4, 5, 6, 7, 8, 9 o 10 para una combinación de 10 biomarcadores. La combinación de biomarcadores se puede utilizar con otros biomarcadores y/o factores, cada uno de los cuales puede generar una puntuación que se incluye en la puntuación total.

El sexo del sujeto puede determinar la combinación de biomarcadores, niveles de referencia de los biomarcadores y/o puntuación de referencia utilizada para diagnosticar al sujeto. Puede utilizarse una combinación de biomarcadores con niveles de referencia para los biomarcadores para diagnosticar a un sujeto masculino. La misma combinación de biomarcadores y los mismos niveles de referencia para los biomarcadores puede utilizarse para diagnosticar a un sujeto femenino. La misma combinación de biomarcadores y diferentes niveles de referencia para los biomarcadores puede utilizarse para diagnosticar a un sujeto femenino. Puede utilizarse una combinación diferente de biomarcadores y niveles de referencia para diagnosticar a un sujeto femenino. Una puntuación de referencia utilizada para diagnosticar a un sujeto masculino puede ser la misma o diferente de la puntuación de referencia utilizada para diagnosticar a un sujeto femenino.

La combinación de biomarcadores se puede utilizar para diagnosticar todas las etapas del CRC. Se han ideado varios sistemas de clasificación para estadificar la extensión del CRC, incluido el sistema de Dukes y el sistema más detallado de estadificación TNM de la Unión Internacional contra el Cáncer- Comité Conjunto Estadounidense sobre el Cáncer (International Union against Cancer-American Joint Committee on Cancer). El sistema TNM, que se utiliza para la estadificación clínica o patológica, se divide en cuatro etapas, cada una de las cuales evalúa la extensión del crecimiento del cáncer con respecto al tumor primario (T), los ganglios linfáticos regionales (N) y la metástasis a distancia (M). El sistema se centra en la extensión de la invasión del tumor hacia la pared intestinal; invasión de estructuras adyacentes; la cantidad de ganglios linfáticos regionales que se han visto afectados; y si se ha producido metástasis a distancia.

El estadio 0 se caracteriza por un carcinoma *in situ* (Tis), en el que las células cancerosas se encuentran dentro de la membrana basal glandular (intraepitelial) o la lámina propia (intramucosa). En esta etapa, el cáncer no se ha diseminado a los ganglios linfáticos regionales (N0) y no hay metástasis a distancia (M0). En el estadio I, todavía no hay diseminación del cáncer a los ganglios linfáticos regionales ni metástasis a distancia, pero el tumor ha invadido la submucosa (T1) o ha progresado adicionalmente para invadir la muscularis propia (T2). El estadio II también implica que no hay diseminación del cáncer a los ganglios linfáticos regionales ni metástasis a distancia, pero el tumor ha invadido la subserosa o los tejidos pericólicos o perirrectales no peritonealizados (T3) o ha progresado para invadir otros órganos o estructuras y/o ha perforado el peritoneo visceral (T4). El estadio III se caracteriza por cualquiera de los subestadios T, sin metástasis a distancia y se disemina hacia 1 a 3 ganglios linfáticos regionales (N1) o se disemina a cuatro o más ganglios linfáticos regionales (N2). Finalmente, el estadio IV implica cualquiera de los subestadios T o N, así como metástasis a distancia (M1a o M1b). Los médicos asignarán también un grado, es

decir, caracterizarán el CRC basándose en la apariencia de las células que van desde G1 (bien diferenciadas, casi normales) a G4. (indiferenciadas, muy anormales) donde un grado elevado es una indicación de mal pronóstico.

3. Factores adicionales

Los métodos como se describen en el presente documento pueden comprender adicionalmente cuantificar o determinar factores adicionales para utilizar junto con las combinaciones de biomarcadores específicos analizadas anteriormente (es decir, combinaciones de AFP, CEA, ferritina, CYFRA, CA19-9, TIMP-1, Gal3 y/o CRP). Estos factores adicionales pueden incluir biomarcadores adicionales de CRC, analitos, edad, comorbilidad de la enfermedad y/u otros métodos de cribado de CRC. Estos factores adicionales pueden utilizarse en los métodos divulgados en el presente documento para (1) identificar y determinar si un sujeto padece o está en riesgo de padecer adenomas y/o CRC; (2) identificar y determinar si un sujeto masculino o femenino padece o está en riesgo de padecer un cáncer distinto del CRC; (3) proporcionar un diagnóstico o ayudar en el diagnóstico de adenomas de alto riesgo y/o CRC en un sujeto; (4) proporcionar o ayudar a proporcionar un diagnóstico, pronóstico y/o estratificación del riesgo de adenomas de alto riesgo y/o CRC en un sujeto que tiene o se sospecha que tiene adenomas de alto riesgo y/o CRC; (5) diferenciar entre sujetos con adenomas de alto riesgo y/o CRC y adenomas de bajo riesgo y/o sin cáncer; (6) diferenciar entre sujetos con CRC y sin cáncer; y (7) vigilar la progresión del CRC en un sujeto. Estos factores adicionales pueden utilizarse para determinar la puntuación total.

a. Biomarcadores adicionales de CRC

Los métodos como se describen en el presente documento pueden comprender adicionalmente cuantificar o determinar un biomarcador adicional de CRC para utilizar junto con las combinaciones de biomarcadores específicos analizadas anteriormente (es decir, combinaciones de AFP, CEA, ferritina, CYFRA, CA19-9, TIMP-1, Gal3 y/o CRP). En algunas realizaciones, el método puede comprender adicionalmente cuantificar o determinar el nivel de al menos un biomarcador de CRC en la muestra biológica y comparar el nivel de al menos un biomarcador adicional de CRC con un valor de referencia para el al menos un biomarcador de CRC en la muestra biológica. Los marcadores adicionales de CRC pueden ser mS9, HbA1c, C3a, Cat X, suPAR(I), PAI-1, ENO2 o cualquier combinación de los mismos. En los métodos de la presente invención pueden utilizarse niveles superiores o iguales al nivel de referencia de al menos uno de mS9, HbA1c, C3a, Cat X, suPAR (I), PAI-1, ENO2 y combinaciones de los mismos. El biomarcador o analito adicional de los niveles de CRC puede utilizarse para determinar la puntuación total.

b. Edad

Los métodos descritos en el presente documento pueden comprender además la determinación de la edad del sujeto. Las personas mayores pueden tener un riesgo superior de tener adenomas de alto riesgo y/o CRC. La edad del sujeto puede utilizarse para determinar la puntuación total. Si el sujeto es masculino, la edad de referencia puede ser 50, 51, 52, 53, 54, 55, 56, 57, 58, 59, 60, 61, 62, 63, 64, 65, 66, 67, 68, 69 o 70. Por ejemplo, si el sujeto es masculino, la edad de referencia puede ser 54. Si el sujeto es femenino, la edad de referencia puede ser 50, 51, 52, 53, 54, 55, 56, 57, 58, 59, 60, 61, 62, 63, 64, 65, 66, 67, 68, 69 o 70. Por ejemplo, si el sujeto es femenino, la edad de referencia puede ser 63.

c. Comorbilidad

Los métodos como se describen en el presente documento pueden comprender adicionalmente la determinación la comorbilidad de la enfermedad en el sujeto. La comorbilidad de la enfermedad con los biomarcadores se puede utilizar para determinar la puntuación total. Los individuos con enfermedad cardíaca, es decir, enfermedad cardiovascular (ECV; en inglés, CVD) pueden tener una probabilidad superior de tener cáncer colorrectal. La comorbilidad de la enfermedad cardiovascular (ECV) se puede utilizar para determinar la puntuación total. La diabetes tipo 2 se ha ligado con el cáncer de colon. Los pacientes con diabetes (I o II) pueden tener un riesgo superior de neoplasias de colon. La comorbilidad de la diabetes se puede utilizar para determinar la puntuación total. El recuento de comorbilidad como una variable categórica (0, 1 o 2+) se puede utilizar para determinar la puntuación total. Por ejemplo, la comorbilidad con diabetes I, diabetes II, isquemia cardíaca, embolia pulmonar, hemorragia subaracnoide, hemorragia cerebral, infarto cerebral, apoplejía, trombosis en las arterias precerebrales y/o aneurismas cerebrales sin ruptura pueden utilizarse para determinar la puntuación total.

d. Otros analitos

Los métodos descritos en el presente documento pueden comprender adicionalmente la cuantificación o la determinación de las células tumorales circulantes, ADN libre circulante, miARN plasmático, SNP plasmáticos, nucleosomas, metil vimentina y otros productos génicos metilados. Los ensayos para medir los analitos incluyen la detección de muerte celular Cell Death Detection^{plus}-ELISA (de Roche Diagnostics) y la prueba de cribado de CRC basada en ADN de CologuardTM (de Exact Sciences Corporation).

e. Métodos de cribado

Los métodos como se describen en el presente documento pueden comprender adicionalmente realizar métodos o regímenes de cribado de CRC en el sujeto. El sujeto puede someterse a exploración mediante pruebas fecales y/o regímenes de cribado estructural de CRC, es decir, pruebas de examen estructural. Entre los ejemplos de pruebas fecales están (i) la prueba de sangre oculta en heces ("SOH"); (ii) la prueba inmunoquímica fecal ("FIT"; del inglés, fecal immunochemical test); y (iii) la prueba de ADN en heces ("ADNh"; en inglés, sDNA). Las pruebas de examen estructural son (i) colonoscopia; (ii) sigmoidoscopia flexible; (iii) enema de bario de doble contraste ("EBDC"; en inglés, DCBE); (iv) colonografía por TC (colonoscopia virtual); y (v) cápsula endoscópica. Las pruebas fecales actuales adolecen de problemas de exactitud, precisión, variabilidad inter e intraindividual y cumplimiento debido a la incomodidad que siente el paciente con la recogida de muestras. Si una prueba fecal es positiva, normalmente se deriva al paciente para una colonoscopia para un examen e intervención completos (extracción de adenomas) si es necesario. Las pruebas de examen estructural requieren tanto la purga de los intestinos de un paciente como el bombeo de aire al colon para ayudar a la visualización. Los resultados de los métodos de cribado del CRC pueden utilizarse para determinar la puntuación total.

(1) Pruebas de sangre fecal

Tanto la SOH como la FIT exploran el CRC mediante la detección de la cantidad de sangre en las heces. Las pruebas se basan en la premisa de que el tejido neoplásico, en particular el tejido canceroso, sangra más que la mucosa típica, con la cantidad de sangrado incrementando con el tamaño del pólipo y el estadio del cáncer. Se recomiendan múltiples pruebas debido al sangrado intermitente. Si bien las pruebas de sangre fecal pueden detectar algunos tumores en estadios tempranos en el colon inferior, son incapaces de detectar (i) el CRC en el colon superior, porque toda sangre se metabolizará y/o (ii) los pólipos adenomatosos más pequeños, por tanto creando negativos falsos. Cualquier sangrado gastrointestinal debido a hemorroides, fisuras, trastornos inflamatorios (colitis ulcerosa, enfermedad de Crohn), enfermedades infecciosas, incluso carreras de larga distancia, creará positivos falsos.

(2) Prueba de sangre oculta fecal ("SOH")

Las SOH están basadas en guayaco y miden la actividad peroxidasa del hemo o la hemoglobina. No son caros y son relativamente fáciles de administrar. Los productos disponibles en el mercado son HemeOccult® II y HemeOccult® Sensa® (Beckman-Coulter Inc., Los Ángeles, California). Además de los positivos falsos y los negativos falsos mencionados anteriormente, ciertos alimentos con actividad peroxidasa (frutas y verduras crudas, carnes rojas) también generan positivos falsos.

(3) Prueba inmunoquímica fecal ("FIT")

La FIT habitualmente es más precisa que la SOH. Más que la reacción química de SOH para detectar hemo de la sangre, la FIT utiliza anticuerpos para detectar proteínas relacionadas con la sangre como la hemoglobina. Los productos disponibles en el mercado son InSure® (Enterix Inc., una compañía de Quest Diagnostics, Lyndhurst, Nueva Jersey); Hemoccult®-ICT (Beckman Coulter, Inc.); MonoHaem (Chemicon International, Inc., Temecula, California); OC Auto Micro 80 (Polymedco, Cortland Manor, Nueva York; y Magstream 1000/Hem SP (Fujirebio Inc. Tokyo, Japón). Además de los problemas de positivos falsos o negativos falsos asociados con la sangre en heces y/o el metabolismo, cualquier desnaturalización metabólica o digestión de proteínas de globina o manipulación de muestras después de la recogida que desnaturalice los epítomos de globina creará negativos falsos para la FIT.

(4) Prueba de ADN en heces ("ADNh")

La prueba de ADNh mide diversos marcadores de ADN medidos en un laboratorio a partir de una muestra de heces recogida por el paciente. Una prueba de ADNh, comercializada por Exact Sciences Corp. (Madison, Wis.), mide mutaciones en los genes K-ras, APC, P53; BAT-26 (un marcador MSI); un marcador de la integridad del ADN; y metilación del gen de la vimentina. Si bien algunas directrices recomiendan la prueba de ADNh, otras directrices son más conservadoras y no recomiendan la prueba de ADNh. Una versión de la prueba de ADNh puede ser superior a la SOH, pero todavía detecta solo un 15% de los adenomas avanzados.

(5) Colonoscopia y sigmoidoscopia

La colonoscopia permite la visualización directa del intestino y permite detectar, hacer biopsias y extirpar pólipos adenomatosos. La colonoscopia es el diagnóstico "estándar de oro" para el cáncer de colon. A pesar de estas ventajas, existen desventajas. Además de la incomodidad del paciente analizada anteriormente, la colonoscopia es un procedimiento relativamente costoso y existen riesgos de posible perforación intestinal y hemorragia. Por otra parte, la habilidad y la experiencia de los médicos varían y algunos estudios han informado de que pasan por alto entre un 6-12% de los adenomas grandes (= 10 mm) y que no detectan cáncer en un 5% de los casos.

La sigmoidoscopia flexible, por definición, se limita al colon sigmoide. Un sigmoidoscopio mide unos 60 cm de largo (~ 2 pies). Por tanto, un médico solo puede examinar el recto y la mitad inferior del colon. La sigmoidoscopia requiere la misma preparación e invasividad que la colonoscopia, con aquellos inconvenientes. Para las porciones

examinadas, tiene las ventajas de la colonoscopia. Sin embargo, la sigmoidoscopia flexible sirve solo para la mitad del trabajo.

(6) Enema de bario de doble contraste y colonografía por TC

El enema de bario de doble contraste ("EBDC") también se conoce como enema de contraste de aire. Requiere la misma preparación que una colonoscopia para purgar el colon del paciente y se obtienen imágenes del colon del paciente utilizando rayos X con un agente de contraste de bario. Si bien lo recomiendan la mayoría de directrices, El EBDC adolece de molestias para el paciente durante la preparación y el examen y no proporciona la oportunidad de una biopsia o polipectomía si se observa algo sospechoso. Por tanto, si existe un resultado de la prueba positivo, el paciente necesitará una colonoscopia de seguimiento. La colonografía por TC, también conocida como una colonoscopia virtual, utiliza una exploración por tomografía computerizada (TC o TAC) para tomar imágenes del recto y el colon. Aunque requiere una preparación del colon, es mínimamente invasiva y está ganando aceptación. Desafortunadamente, al igual que el EBDC, una prueba positiva requerirá una colonoscopia para investigar e intervenir si es necesario.

(7) Cápsula endoscópica

La cápsula endoscópica implica la ingestión de una pequeña cápsula con cámaras de vídeo en cada extremo. A medida que pasa por el colon, las imágenes se transmiten y se graban. Algunos estudios han informado de la detección de un 73% de los adenomas avanzados y de un 74% de los casos de CRC. Las deficiencias son similares a las de la EBDC o la colonografía por TC, ya que requiere una preparación similar del paciente y los resultados positivos requieren una colonoscopia posterior. Además, la duración insuficiente de la batería y la obtención de imágenes inadecuadas en períodos de motilidad rápida son desventajas para la generación actual de los productos de cápsula endoscópica.

4. Métodos para la identificación y determinación de sujetos que padecen o están en riesgo de padecer adenomas de alto riesgo y/o cáncer colorrectal

En un aspecto, la presente invención se dirige a identificar a un sujeto que padece o está en riesgo de padecer adenomas de alto riesgo y/o CRC mediante la cuantificación o determinación de los niveles de la siguiente combinación de marcadores: CEA, CYFRA, CRP y ferritina. Un sujeto puede ser un individuo de alto riesgo si el sujeto muestra concentraciones o cantidades desfavorables de CEA, CYFRA, CRP y ferritina, como se describe en el presente documento. El método puede comprender las etapas de: (1) obtener una muestra biológica de un sujeto; (2) determinar de los niveles de CEA, CYFRA, CRP y ferritina en la muestra biológica del sujeto; (3) comparar los niveles de CEA, CYFRA, CRP y ferritina en la muestra biológica en referencia a los niveles de CEA, CYFRA, CRP y ferritina; y (4) determinar o identificar al sujeto que padece o está en riesgo de padecer adenomas de alto riesgo y/o CRC si los niveles de CEA, CYFRA y CRP en la muestra biológica son mayores o desfavorables con respecto a los niveles de referencia de CEA, CYFRA y CRP y si los niveles de ferritina en la muestra biológica son inferiores o desfavorables respecto al nivel de referencia de ferritina. Se determina o identifica que el sujeto no padece o no está en riesgo de padecer CRC si los niveles de CEA, CYFRA y CRP en la muestra biológica son menores o favorables con respecto a los niveles de referencia de CEA, CYFRA y CRP y si el nivel de ferritina en la muestra biológica es mayor o favorable con respecto al nivel de referencia de ferritina.

Un sujeto puede ser un individuo de alto riesgo si el sujeto muestra una puntuación desfavorable, determinada por concentraciones o cantidades desfavorables de CEA, CYFRA, CRP y ferritina, como se describe en el presente documento, con otros biomarcadores y/o factores. El método puede comprender las etapas de: (1) obtener una muestra biológica de un sujeto; (2) determinar de los niveles de CEA, CYFRA, CRP y ferritina en la muestra biológica del sujeto; (3) comparar los niveles de CEA, CYFRA, CRP y ferritina en la muestra biológica en referencia a los niveles de CEA, CYFRA, CRP y ferritina; (i) proporcionar una puntuación de CEA para el sujeto en donde el sujeto obtiene una puntuación de 1 si el nivel de CEA en la muestra biológica es mayor que el nivel de referencia de CEA y una puntuación de 0 si el nivel de CEA en la muestra biológica es igual o inferior al nivel de referencia de CEA; (ii) proporcionar una puntuación CYFRA para el sujeto en donde el sujeto obtiene una puntuación de 1 si el nivel de CYFRA en la muestra biológica es mayor que el nivel de referencia de CYFRA y una puntuación de 0 si el nivel de CYFRA en la muestra biológica es igual o inferior al nivel de referencia de CYFRA; (iii) proporcionar una puntuación de CRP para el sujeto en donde el sujeto obtiene una puntuación de 1 si el nivel de CRP en la muestra biológica es mayor que el nivel de referencia de CRP y una puntuación de 0 si el nivel de CRP en la muestra biológica es igual o inferior al nivel de referencia de CRP; y (iv) proporcionar una puntuación de ferritina para el sujeto en donde el sujeto obtiene una puntuación de 1 si el nivel de ferritina en la muestra biológica es inferior al nivel de referencia de ferritina y una puntuación de 0 si el nivel de ferritina en la muestra biológica es igual o mayor que el nivel de referencia de ferritina; (4) sumar las puntuaciones de la etapa (3) para generar una puntuación total; y (5) proporcionar un diagnóstico de un sujeto como que padece o está en riesgo de padecer adenomas de alto riesgo y/o CRC si la puntuación total es superior a una puntuación de referencia o un diagnóstico de que un sujeto no padece o no tiene riesgo de padecer adenomas de alto riesgo y/o CRC si la puntuación total es igual o inferior a la puntuación de referencia. Los niveles de referencia para los biomarcadores pueden ser iguales o diferentes para los sujetos masculinos y femeninos. La puntuación de referencia puede ser 0, 1, 2, 3 o 4. La puntuación de referencia

puede ser igual o diferente para los sujetos masculinos y femeninos. El método puede incluir adicionalmente determinar la edad del sujeto, comparando la edad del sujeto con una edad de referencia y proporcionando una puntuación de edad para el sujeto en donde el sujeto obtiene una puntuación de 1 si la edad del sujeto es mayor o igual a la edad de referencia y una puntuación de 0 si la edad del sujeto es inferior a la edad de referencia. La edad de referencia puede ser la misma o diferente para los sujetos masculinos y femeninos. La puntuación de referencia puede ser 0, 1, 2, 3, 4 o 5. La puntuación de referencia puede ser igual o diferente para los sujetos masculinos y femeninos.

El método puede comprender adicionalmente la confirmación de un diagnóstico o riesgo de adenomas de alto riesgo y/o CRC mediante un régimen de detección estructural de CRC. El método puede comprender todavía adicionalmente la etapa de un tratamiento de CRC y/o un régimen de vigilancia de CRC.

5. Métodos para la identificación y determinación de sujetos que padecen o están en riesgo de padecer CRC

En un aspecto, la presente invención se dirige también a identificar a un sujeto que padece o que está en riesgo de padecer CRC mediante la cuantificación o determinación de los niveles de la siguiente combinación de marcadores: CEA, CYFRA, CRP, CA19-9 y ferritina. Un sujeto puede ser un individuo de alto riesgo si el sujeto muestra concentraciones o cantidades desfavorables de CEA, CYFRA, CRP, CA19-9 y ferritina, como se describe en el presente documento. El método puede incluir las etapas de: (1) obtener una muestra biológica de un sujeto; (2) determinar de los niveles de CEA, CYFRA, CRP, CA19-9 y ferritina en la muestra biológica del sujeto; (3) comparar los niveles de CEA, CYFRA, CRP, CA19-9 y ferritina en la muestra biológica en referencia a los niveles de CEA, CYFRA, CRP, CA19-9 y ferritina; y (4) proporcionar un diagnóstico a un sujeto como que padece o está en riesgo de padecer CRC si los niveles de CEA, CYFRA, CYFRA y CA19-9 en la muestra biológica son mayores o desfavorables con respecto a los niveles de referencia de CEA, CYFRA, CYFRA y CA19-9 y si los niveles de ferritina en la muestra biológica son inferiores o desfavorables respecto al nivel de referencia de ferritina. Se determina que un sujeto no padece o no está en riesgo de padecer CRC si los niveles de CEA, CYFRA, CRP y CA19-9 en la muestra biológica son inferiores o favorables con respecto a los niveles de referencia de CEA, CYFRA, CRP y CA19-9 y si el nivel de ferritina en la muestra biológica es superior o favorables respecto al nivel de referencia de ferritina.

Un sujeto puede ser un individuo de alto riesgo si el sujeto muestra una puntuación desfavorable, determinada por concentraciones o cantidades desfavorables de CEA, CYFRA, CRP, CA19-9 y ferritina, como se describe en el presente documento, con otros biomarcadores y/o factores. El método puede incluir las etapas de: (1) obtener una muestra biológica de un sujeto; (2) determinar de los niveles de CEA, CYFRA, CRP, CA19-9 y ferritina en la muestra biológica del sujeto; (3) comparar los niveles de CEA, CYFRA, CRP, CA19-9 y ferritina en la muestra biológica en referencia a los niveles de CEA, CYFRA, CRP, CA19-9 y ferritina; (4) proporcionar una puntuación de CEA para el sujeto en donde el sujeto obtiene una puntuación de 1 si el nivel de CEA en la muestra biológica es mayor que el nivel de referencia de CEA y una puntuación de 0 si el nivel de CEA en la muestra biológica es igual o inferior que el nivel de referencia de CEA; (5) proporcionar una puntuación de CYFRA para el sujeto en donde el sujeto obtiene una puntuación de 1 si el nivel de CYFRA en la muestra biológica es mayor que el nivel de referencia de CYFRA y una puntuación de 0 si el nivel de CYFRA en la muestra biológica es igual o inferior que el nivel de referencia de CYFRA; (6) proporcionar una puntuación de CRP para el sujeto en donde el sujeto obtiene una puntuación de 1 si el nivel de CRP en la muestra biológica es mayor que el nivel de referencia de CRP y una puntuación de 0 si el nivel de CRP en la muestra biológica es igual o inferior que el nivel de referencia de CRP; (7) proporcionar una puntuación de CA19-9 para el sujeto en donde el sujeto obtiene una puntuación de 1 si el nivel de CA19-9 en la muestra biológica es mayor que el nivel de referencia de CA19-9 y una puntuación de 0 si el nivel de CA19-9 en la muestra biológica es igual o inferior al nivel de referencia de CA19-9; (8) proporcionar una puntuación de ferritina para el sujeto en donde el sujeto obtiene una puntuación de 1 si el nivel de ferritina en la muestra biológica es inferior al nivel de referencia de ferritina y una puntuación de 0 si el nivel de ferritina en la muestra biológica es igual o mayor que el nivel de referencia de ferritina; (9) sumar las puntuaciones de las etapas (4)-(8) para generar una puntuación total; y (10) proporcionar un diagnóstico de un sujeto como que padece o está en riesgo de padecer CRC si la puntuación total es superior a una puntuación de referencia o un diagnóstico de que un sujeto no padece o no tiene riesgo de padecer CRC si la puntuación total es igual o inferior a la puntuación de referencia. Los niveles de referencia para los biomarcadores pueden ser iguales o diferentes para los sujetos masculinos y femeninos. La puntuación de referencia puede ser 0, 1, 2, 3, 4 o 5. La puntuación de referencia puede ser igual o diferente para los sujetos masculinos y femeninos.

El método puede comprender adicionalmente un diagnóstico o riesgo de CRC mediante un régimen de detección estructural de CRC. El método puede comprender todavía adicionalmente la etapa de un tratamiento de CRC y/o un régimen de vigilancia de CRC.

6. Métodos para la identificación y determinación de sujetos masculinos que padecen o están en riesgo de padecer cáncer distinto del CRC

En un aspecto, la presente divulgación se dirige también a determinar si un sujeto masculino padece o está en riesgo de padecer un cáncer distinto del cáncer colorrectal (CRC), en donde el sujeto masculino se confirmó que no tiene CRC mediante una colonoscopia. El método incluye cuantificar o determinar los niveles de la siguiente

combinación de marcadores: CYFRA, CRP, TIMP-1, CA19-9 y AFP. Un sujeto puede ser un individuo de alto riesgo si el sujeto muestra concentraciones o cantidades desfavorables de CYFRA, CRP, TIMP-1, CA19-9 y AFP, como se describe en el presente documento. El método puede incluir (1) obtener una muestra biológica del sujeto masculino; (2) determinar los niveles del fragmento de citoqueratina 19 (CYFRA), proteína reactiva con C (CRP), un tejido inhibidor de metaloproteinasa 1 (TIMP-1), antígeno carbohidrato 19-9 (CA19-9) y alfa-fetoproteína (AFP) en la muestra biológica del sujeto masculino; (3) comparar los niveles de CYFRA, CRP, TIMP-1, CA19-9 y AFP en la muestra biológica en referencia a los niveles de CYFRA, CRP, TIMP-1, CA19-9 y AFP; y (4) proporcionar un diagnóstico del sujeto masculino como que padece o está en riesgo de padecer un cáncer distinto de CRC si los niveles de CYFRA, CRP, TIMP-1, CA19-9 y AFP en la muestra biológica son superiores que los niveles de referencia de CYFRA, CRP, TIMP-1, CA19-9 y AFP.

Un sujeto puede ser un individuo de alto riesgo si el sujeto muestra una puntuación desfavorable, determinada por concentraciones o cantidades desfavorables de CYFRA, CRP, TIMP-1, CA19-9 y AFP, como se describe en el presente documento. El método puede incluir obtener una muestra biológica de un sujeto masculino; (1) determinar los niveles del fragmento de citoqueratina 19 (CYFRA), proteína reactiva con C (CRP), un tejido inhibidor de metaloproteinasa 1 (TIMP-1), antígeno carbohidrato 19-9 (CA19-9) y alfa-fetoproteína (AFP) en la muestra biológica del sujeto masculino; (2) comparar los niveles de CYFRA, CRP, TIMP-1, CA19-9 y AFP en la muestra biológica en referencia a los niveles de CYFRA, CRP, TIMP-1, CA19-9 y AFP; (3) proporcionar una puntuación CYFRA para el sujeto masculino en donde el sujeto masculino obtiene una puntuación de 1 si el nivel de CYFRA en la muestra biológica es mayor que el nivel de referencia de CYFRA y una puntuación de 0 si el nivel de CYFRA en la muestra biológica es igual o inferior al nivel de referencia de CYFRA; (4) proporcionar una puntuación CRP para el sujeto masculino en donde el sujeto masculino obtiene una puntuación de 1 si el nivel de CRP en la muestra biológica es mayor que el nivel de referencia de CRP y una puntuación de 0 si el nivel de CRP en la muestra biológica es igual o inferior al nivel de referencia de CRP; (5) proporcionar una puntuación de TIMP-1 para el sujeto masculino en donde el sujeto masculino obtiene una puntuación de 1 si el nivel de TIMP-1 en la muestra biológica es mayor que el nivel de referencia de TIMP-1 y una puntuación de 0 si el nivel de TIMP-1 en la muestra biológica es igual o inferior al nivel de referencia de TIMP-1; (6) proporcionar una puntuación de CA19-9 para el sujeto en donde el sujeto obtiene una puntuación de 1 si el nivel de CA19-9 en la muestra biológica es inferior al nivel de referencia de CA19-9 y una puntuación de 0 si el nivel de CA19-9 en la muestra biológica es igual o mayor que el nivel de referencia de CA19-9; (7) proporcionar una puntuación de AFP para el sujeto masculino en donde el sujeto masculino obtiene una puntuación de 1 si el nivel de AFP en la muestra biológica es inferior al nivel de referencia de AFP y una puntuación de 0 si el nivel de AFP en la muestra biológica es igual o mayor que el nivel de referencia de AFP; (8) añadir la puntuación de CYFRA, la puntuación de CRP, la puntuación de TIMP-1, la puntuación de CA19-9 y la puntuación de AFP para generar una puntuación total; y (9) proporcionar un diagnóstico de un sujeto masculino que padece o está en riesgo de padecer un cáncer distinto de CRC si la puntuación total es superior a la puntuación de referencia. La puntuación de referencia puede ser 0, 1, 2, 3, 4 o 5.

El método puede comprender todavía adicionalmente la etapa de un tratamiento del cáncer y/o un régimen de vigilancia del cáncer.

7. Métodos para la identificación y determinación de sujetos femeninos que padecen o están en riesgo de padecer cáncer distinto del CRC

En un aspecto, la presente divulgación se dirige también a determinar si un sujeto femenino padece o está en riesgo de padecer un cáncer distinto del cáncer colorrectal (CRC), en donde el sujeto femenino se confirmó que no tiene CRC mediante una colonoscopia. El método incluye cuantificar o determinar los niveles de la siguiente combinación de marcadores: CYFRA, CEA y CRP. Un sujeto puede ser un individuo de alto riesgo si el sujeto muestra concentraciones o cantidades desfavorables de CYFRA, CEA y CRP, como se describe en el presente documento. El método puede incluir (1) obtener una muestra biológica del sujeto femenino; (2) determinar los niveles del fragmento de citoqueratina 19 (CYFRA), antígeno carcinoembrionario (CEA) y proteína reactiva con C (CRP) en la muestra biológica del sujeto femenino; (3) comparar los niveles de CYFRA, CEA y CRP en la muestra biológica en referencia a los niveles de CYFRA, CEA y CRP; y (4) proporcionar un diagnóstico del sujeto femenino como que padece o está en riesgo de padecer un cáncer distinto de CRC si los niveles de CYFRA, CEA y CRP en la muestra biológica son superiores que los niveles de referencia de CYFRA, CEA y CRP.

Un sujeto puede ser un individuo de alto riesgo si el sujeto muestra una puntuación desfavorable, determinada por concentraciones o cantidades desfavorables de CYFRA, CEA y CRP, como se describe en el presente documento, con otros biomarcadores y/o factores. El método puede incluir obtener una muestra biológica de un sujeto femenino; (1) determinar los niveles del fragmento de citoqueratina 19 (CYFRA), antígeno carcinoembrionario (CEA) y proteína reactiva con C (CRP) en la muestra biológica del sujeto femenino; (2) comparar los niveles de CYFRA, CEA y CRP en la muestra biológica en referencia a los niveles de CYFRA, CEA y CRP; (3) proporcionar una puntuación CYFRA para el sujeto femenino en donde el sujeto femenino obtiene una puntuación de 1 si el nivel de CYFRA en la muestra biológica es mayor que el nivel de referencia de CYFRA y una puntuación de 0 si el nivel de CYFRA en la muestra biológica es igual o inferior al nivel de referencia de CYFRA; (4) proporcionar una puntuación de CEA para el sujeto femenino en donde el sujeto femenino obtiene una puntuación de 1 si el nivel de CEA en la muestra biológica es mayor que el nivel de referencia de CEA y una puntuación de 0 si el nivel de CEA en la muestra biológica muestra es

igual o inferior al nivel de referencia de CRP (5) proporcionar una puntuación de CRP para el sujeto femenino en donde el sujeto femenino obtiene una puntuación de 1 si el nivel de CRP en la muestra biológica es mayor que el nivel de referencia de CRP y una puntuación de 0 si el nivel de PCR en la muestra biológica es igual o inferior al nivel de referencia de PCR; (6) añadir la puntuación de CYFRA, la puntuación de CEA y la puntuación de CRP para generar una puntuación total; y (7) proporcionar un diagnóstico de un sujeto femenino que padece o está en riesgo de padecer un cáncer distinto de CRC si la puntuación total es superior a una puntuación de referencia. La puntuación de referencia puede ser 0, 1, 2 o 3.

El método puede comprender todavía adicionalmente la etapa de un tratamiento del cáncer y/o un régimen de vigilancia del cáncer.

8. Método para el diagnóstico, pronóstico y/o riesgo de estratificación del CRC

En un aspecto, la presente divulgación se dirige también a proporcionar un diagnóstico, pronóstico y/o riesgo de estratificación de adenomas de alto riesgo y/o CRC, particularmente del CRC, en un sujeto que tiene o se sospecha que tiene CRC mediante (1) la cuantificación o determinación de los niveles de al menos dos de AFP, CEA, ferritina, CYFRA, CA19-9, TIMP-1, Gal3 y/o CRP en una muestra biológica del sujeto. Midiendo los niveles de al menos dos de AFP, CEA, ferritina, CYFRA, CA19-9, TIMP-1, Gal3 y/o CRP, el método permite que la detección temprana de CRC se diagnostique con mayor precisión y posteriormente se traten con mayor éxito, en comparación con otros ensayos disponibles en el mercado.

El método incluye las etapas de obtención de una muestra biológica de un sujeto, la determinación del nivel de al menos dos de AFP, CEA, ferritina, CYFRA, CA19-9, TIMP-1, Gal3 y/o CRP en la muestra biológica, en comparación con los niveles de al menos dos de AFP, CEA, ferritina, CYFRA, CA19-9, TIMP-1, Gal3 y/o CRP en la muestra biológica a niveles de la combinación de marcadores respectiva (es decir, al menos dos de AFP, CEA, ferritina, CYFRA, CA19-9, TIMP-1, Gal3 y/o CRP en la muestra biológica se compara con un nivel de referencia de al menos dos de AFP, CEA, ferritina, CYFRA, CA19-9, TIMP-1, Gal3 y/o CRP) en un sujeto que tiene adenomas de bajo riesgo o que no tiene cáncer o alternatively, un sujeto que tiene adenomas de alto riesgo y/o CRC y proporcionar un diagnóstico, pronóstico y/o riesgo de estratificación del CRC en el sujeto si los niveles de al menos dos de AFP, CEA, ferritina, CYFRA, CA19-9, TIMP-1, Gal3 y/o CRP en la muestra biológica son mayores o desfavorables con respecto a los niveles de referencia de al menos dos de AFP, CEA, ferritina, CYFRA, CA19-9, TIMP-1, Gal3 y/o CRP. El método puede comprender adicionalmente confirmar un diagnóstico o riesgo de CRC (particularmente un CRC temprano). El método puede comprender todavía adicionalmente la etapa de un tratamiento de CRC y/o un régimen de vigilancia de CRC.

9. Métodos para diferenciar entre sujetos con adenomas de alto riesgo y/o CRC y con adenomas de bajo riesgo y/o sin cáncer

En un aspecto, la presente divulgación se dirige a diferenciar entre sujetos que tienen o están en riesgo de padecer adenomas de alto riesgo y/o CRC y sujetos que tienen adenomas de bajo riesgo y/o sin cáncer mediante la cuantificación o determinación de los niveles de la siguiente combinación de marcadores: CEA, CYFRA, CRP y ferritina. Un sujeto puede tener adenomas de alto riesgo y/o CRC si el sujeto muestra concentraciones o cantidades desfavorables de CEA, CYFRA, CRP y ferritina, como se describe en el presente documento. El método puede comprender las etapas de: (1) obtener una muestra biológica de un sujeto; (2) determinar de los niveles de CEA, CYFRA, CRP y ferritina en la muestra biológica del sujeto; (3) comparar los niveles de CEA, CYFRA, CRP y ferritina en la muestra biológica en referencia a los niveles de CEA, CYFRA, CRP y ferritina; y (4) determinar o identificar al sujeto que tiene o está en riesgo de padecer adenomas de alto riesgo y/o CRC si los niveles de CEA, CYFRA y CRP en la muestra biológica son mayores o desfavorables con respecto a los niveles de referencia de CEA, CYFRA y CRP y si los niveles de ferritina en la muestra biológica son inferiores o desfavorables respecto al nivel de referencia de ferritina. Se determina o identifica que el sujeto tiene adenomas de bajo riesgo y/o no tiene cáncer si los niveles de CEA, CYFRA y CRP en la muestra biológica son menores o favorables con respecto a los niveles de referencia de CEA, CYFRA y CRP y si el nivel de ferritina en la muestra biológica es mayor o favorable con respecto al nivel de referencia de ferritina.

Un sujeto puede tener adenomas de alto riesgo y/o CRC si el sujeto muestra una puntuación desfavorable, determinada por concentraciones o cantidades desfavorables de CEA, CYFRA, CRP y ferritina, como se describe en el presente documento, con otros biomarcadores y/o factores. El método puede comprender las etapas de: (1) obtener una muestra biológica de un sujeto; (2) determinar de los niveles de CEA, CYFRA, CRP y ferritina en la muestra biológica del sujeto; (3) comparar los niveles de CEA, CYFRA, CRP y ferritina en la muestra biológica en referencia a los niveles de CEA, CYFRA, CRP y ferritina; (i) proporcionar una puntuación de CEA para el sujeto en donde el sujeto obtiene una puntuación de 1 si el nivel de CEA en la muestra biológica es mayor que el nivel de referencia de CEA y una puntuación de 0 si el nivel de CEA en la muestra biológica es igual o inferior al nivel de referencia de CEA; (ii) proporcionar una puntuación CYFRA para el sujeto en donde el sujeto obtiene una puntuación de 1 si el nivel de CYFRA en la muestra biológica es mayor que el nivel de referencia de CYFRA y una puntuación de 0 si el nivel de CYFRA en la muestra biológica es igual o inferior al nivel de referencia de CYFRA; (iii)

proporcionar una puntuación de CRP para el sujeto en donde el sujeto obtiene una puntuación de 1 si el nivel de CRP en la muestra biológica es mayor que el nivel de referencia de CRP y una puntuación de 0 si el nivel de CRP en la muestra biológica es igual o inferior al nivel de referencia de CRP; y (iv) proporcionar una puntuación de ferritina para el sujeto en donde el sujeto obtiene una puntuación de 1 si el nivel de ferritina en la muestra biológica es inferior al nivel de referencia de ferritina y una puntuación de 0 si el nivel de ferritina en la muestra biológica es igual o mayor que el nivel de referencia de ferritina; (4) sumar las puntuaciones de la etapa (3) para generar una puntuación total; y (5) proporcionar un diagnóstico de un sujeto que padece o está en riesgo de padecer adenomas de alto riesgo y/o CRC si la puntuación total es superior a una puntuación de referencia o un diagnóstico de un sujeto que tiene adenomas de bajo riesgo y/o sin cáncer si la puntuación total es igual o inferior a la puntuación de referencia. Los niveles de referencia para los biomarcadores pueden ser iguales o diferentes para los sujetos masculinos y femeninos. La puntuación de referencia puede ser 0, 1, 2, 3 o 4. La puntuación de referencia puede ser igual o diferente para los sujetos masculinos y femeninos. El método puede incluir adicionalmente determinar la edad del sujeto y comparar la edad del sujeto con una edad de referencia y proporcionar una puntuación de edad para el sujeto en donde el sujeto obtiene una puntuación de 1 si la edad del sujeto es mayor o igual a la edad de referencia y una puntuación de 0 si la edad del sujeto es inferior a la edad de referencia. La edad de referencia puede ser la misma o diferente para los sujetos masculinos y femeninos. La puntuación de referencia puede ser 0, 1, 2, 3, 4 o 5. La puntuación de referencia puede ser igual o diferente para los sujetos masculinos y femeninos.

El método puede comprender adicionalmente la confirmación de un diagnóstico o riesgo de adenomas de alto riesgo y/o CRC mediante un régimen de detección estructural de CRC. El método puede comprender todavía adicionalmente la etapa de un tratamiento de CRC y/o un régimen de vigilancia de CRC.

10. Métodos para diferenciar entre sujetos con CRC y sin cáncer

En un aspecto, la presente invención se dirige también a diferenciar si un sujeto tiene o padece CRC o no tiene cáncer mediante la cuantificación o determinación de los niveles de la siguiente combinación de marcadores: CEA, CYFRA, CRP, CA19-9 y ferritina.

El método puede incluir las etapas de: (1) obtener una muestra biológica de un sujeto; (2) determinar de los niveles de CEA, CYFRA, CRP, CA19-9 y ferritina en la muestra biológica del sujeto; (3) comparar los niveles de CEA, CYFRA, CRP, CA19-9 y ferritina en la muestra biológica en referencia a los niveles de CEA, CYFRA, CRP, CA19-9 y ferritina; y (4) proporcionar un diagnóstico a un sujeto de que padece CRC si los niveles de CEA, CYFRA, CYFRA y CA19-9 en la muestra biológica son mayores o desfavorables con respecto a los niveles de referencia de CEA, CYFRA, CYFRA y CA19-9 y si los niveles de ferritina en la muestra biológica son inferiores o desfavorables respecto al nivel de referencia de ferritina. Se determina que un sujeto no tiene cáncer si los niveles de CEA, CYFRA, CRP y CA19-9 en la muestra biológica son inferiores o favorables con respecto a los niveles de referencia de CEA, CYFRA, CRP y CA19-9 y si el nivel de ferritina en la muestra biológica es superior o favorables respecto al nivel de referencia de ferritina.

El método puede incluir las etapas de: (1) obtener una muestra biológica de un sujeto; (2) determinar de los niveles de CEA, CYFRA, CRP, CA19-9 y ferritina en la muestra biológica del sujeto; (3) comparar los niveles de CEA, CYFRA, CRP, CA19-9 y ferritina en la muestra biológica en referencia a los niveles de CEA, CYFRA, CRP, CA19-9 y ferritina; (4) proporcionar una puntuación de CEA para el sujeto en donde el sujeto obtiene una puntuación de 1 si el nivel de CEA en la muestra biológica es mayor que el nivel de referencia de CEA y una puntuación de 0 si el nivel de CEA en la muestra biológica es igual o inferior que el nivel de referencia de CEA; (5) proporcionar una puntuación de CYFRA para el sujeto en donde el sujeto obtiene una puntuación de 1 si el nivel de CYFRA en la muestra biológica es mayor que el nivel de referencia de CYFRA y una puntuación de 0 si el nivel de CYFRA en la muestra biológica es igual o inferior que el nivel de referencia de CYFRA; (6) proporcionar una puntuación de CRP para el sujeto en donde el sujeto obtiene una puntuación de 1 si el nivel de CRP en la muestra biológica es mayor que el nivel de referencia de CRP y una puntuación de 0 si el nivel de CRP en la muestra biológica es igual o inferior que el nivel de referencia de CRP; (7) proporcionar una puntuación de CA19-9 para el sujeto en donde el sujeto obtiene una puntuación de 1 si el nivel de CA19-9 en la muestra biológica es mayor que el nivel de referencia de CA19-9 y una puntuación de 0 si el nivel de CA19-9 en la muestra biológica es igual o inferior al nivel de referencia de CA19-9; (8) proporcionar una puntuación de ferritina para el sujeto en donde el sujeto obtiene una puntuación de 1 si el nivel de ferritina en la muestra biológica es inferior al nivel de referencia de ferritina y una puntuación de 0 si el nivel de ferritina en la muestra biológica es igual o mayor que el nivel de referencia de ferritina; (9) sumar las puntuaciones de las etapas (4)-(8) para generar una puntuación total; y (10) proporcionar un diagnóstico de que un sujeto tiene CRC si la puntuación total es mayor que una puntuación de referencia o un diagnóstico de que un sujeto no tiene cáncer si la puntuación total es igual o inferior a la puntuación de referencia. Los niveles de referencia para los biomarcadores pueden ser iguales o diferentes para los sujetos masculinos y femeninos. La puntuación de referencia puede ser 0, 1, 2, 3, 4 o 5. La puntuación de referencia puede ser igual o diferente para los sujetos masculinos y femeninos.

El método puede comprender adicionalmente un diagnóstico o riesgo de CRC mediante un régimen de detección estructural de CRC. El método puede comprender todavía adicionalmente la etapa de un tratamiento de CRC y/o un régimen de vigilancia de CRC.

11. Métodos para diferenciar entre sujetos con CRC en estadio I o II y sin cáncer

En un aspecto, la presente divulgación se dirige a diferenciar entre sujetos que tienen o están en riesgo de tener CRC en estadio I o II y sujetos que tienen adenomas de bajo riesgo y/o sin cáncer mediante la cuantificación o determinación de los niveles de la siguiente combinación de marcadores: CEA, CYFRA, CRP y ferritina. Un sujeto puede tener CRC en estadio I o II si el sujeto muestra concentraciones o cantidades desfavorables de CEA, CYFRA, CRP y ferritina, como se describe en el presente documento. El método puede comprender las etapas de: (1) obtener una muestra biológica de un sujeto; (2) determinar de los niveles de CEA, CYFRA, CRP y ferritina en la muestra biológica del sujeto; (3) comparar los niveles de CEA, CYFRA, CRP y ferritina en la muestra biológica en referencia a los niveles de CEA, CYFRA, CRP y ferritina; y (4) determinar o identificar al sujeto que tiene o está en riesgo de tener CRC en estadio I o II si los niveles de CEA, CYFRA y CRP en la muestra biológica son mayores o desfavorables con respecto a los niveles de referencia de CEA, CYFRA y CRP y si los niveles de ferritina en la muestra biológica son inferiores o desfavorables respecto al nivel de referencia de ferritina. Se determina o identifica que el sujeto tiene adenomas de bajo riesgo y/o no tiene cáncer si los niveles de CEA, CYFRA y CRP en la muestra biológica son menores o favorables con respecto a los niveles de referencia de CEA, CYFRA y CRP y si el nivel de ferritina en la muestra biológica es mayor o favorable con respecto al nivel de referencia de ferritina.

Un sujeto puede tener CRC en estadio I o II si el sujeto muestra una puntuación desfavorable, determinada por concentraciones o cantidades desfavorables de CEA, CYFRA, CRP y ferritina, como se describe en el presente documento, con otros biomarcadores y/o factores. El método puede comprender las etapas de: (1) obtener una muestra biológica de un sujeto; (2) determinar de los niveles de CEA, CYFRA, CRP y ferritina en la muestra biológica del sujeto; (3) comparar los niveles de CEA, CYFRA, CRP y ferritina en la muestra biológica en referencia a los niveles de CEA, CYFRA, CRP y ferritina; (i) proporcionar una puntuación de CEA para el sujeto en donde el sujeto obtiene una puntuación de 1 si el nivel de CEA en la muestra biológica es mayor que el nivel de referencia de CEA y una puntuación de 0 si el nivel de CEA en la muestra biológica es igual o inferior al nivel de referencia de CEA; (ii) proporcionar una puntuación CYFRA para el sujeto en donde el sujeto obtiene una puntuación de 1 si el nivel de CYFRA en la muestra biológica es mayor que el nivel de referencia de CYFRA y una puntuación de 0 si el nivel de CYFRA en la muestra biológica es igual o inferior al nivel de referencia de CYFRA; (iii) proporcionar una puntuación de CRP para el sujeto en donde el sujeto obtiene una puntuación de 1 si el nivel de CRP en la muestra biológica es mayor que el nivel de referencia de CRP y una puntuación de 0 si el nivel de CRP en la muestra biológica es igual o inferior al nivel de referencia de CRP; y (iv) proporcionar una puntuación de ferritina para el sujeto en donde el sujeto obtiene una puntuación de 1 si el nivel de ferritina en la muestra biológica es inferior al nivel de referencia de ferritina y una puntuación de 0 si el nivel de ferritina en la muestra biológica es igual o mayor que el nivel de referencia de ferritina; (4) sumar las puntuaciones de la etapa (3) para generar una puntuación total; y (5) proporcionar un diagnóstico de un sujeto que padece o está en riesgo de padecer CRC en estadio I o II si la puntuación total es superior a una puntuación de referencia o un diagnóstico de un sujeto que tiene adenomas de bajo riesgo y/o sin cáncer si la puntuación total es igual o inferior a la puntuación de referencia. Los niveles de referencia para los biomarcadores pueden ser iguales o diferentes para los sujetos masculinos y femeninos. La puntuación de referencia puede ser 0, 1, 2, 3 o 4. La puntuación de referencia puede ser igual o diferente para los sujetos masculinos y femeninos. El método puede incluir adicionalmente determinar la edad del sujeto y comparar la edad del sujeto con una edad de referencia y proporcionar una puntuación de edad para el sujeto en donde el sujeto obtiene una puntuación de 1 si la edad del sujeto es mayor o igual a la edad de referencia y una puntuación de 0 si la edad del sujeto es inferior a la edad de referencia. La edad de referencia puede ser la misma o diferente para los sujetos masculinos y femeninos. La puntuación de referencia puede ser 0, 1, 2, 3, 4 o 5. La puntuación de referencia puede ser igual o diferente para los sujetos masculinos y femeninos.

El método puede comprender adicionalmente la confirmación de un diagnóstico o riesgo de CRC en estadio I o II mediante un régimen de detección estructural de CRC. El método puede comprender todavía adicionalmente la etapa de un tratamiento de CRC y/o un régimen de vigilancia de CRC.

12. Métodos para diferenciar entre sujetos con CRC en estadio III o IV y sin cáncer

En un aspecto, la presente divulgación se dirige a diferenciar entre sujetos que tienen o están en riesgo de tener CRC en estadio III o IV y sujetos que tienen adenomas de bajo riesgo y/o sin cáncer mediante la cuantificación o determinación de los niveles de la siguiente combinación de marcadores: CEA, CYFRA, CRP y ferritina. Un sujeto puede tener CRC en estadio III o IV si el sujeto muestra concentraciones o cantidades desfavorables de CEA, CYFRA, CRP y ferritina, como se describe en el presente documento. El método puede comprender las etapas de: (1) obtener una muestra biológica de un sujeto; (2) determinar de los niveles de CEA, CYFRA, CRP y ferritina en la muestra biológica del sujeto; (3) comparar los niveles de CEA, CYFRA, CRP y ferritina en la muestra biológica en referencia a los niveles de CEA, CYFRA, CRP y ferritina; y (4) determinar o identificar al sujeto que tiene o está en riesgo de tener CRC en estadio III o IV si los niveles de CEA, CYFRA y CRP en la muestra biológica son mayores o desfavorables con respecto a los niveles de referencia de CEA, CYFRA y CRP y si los niveles de ferritina en la muestra biológica son inferiores o desfavorables respecto al nivel de referencia de ferritina. Se determina o identifica que el sujeto tiene adenomas de bajo riesgo y/o no tiene cáncer si los niveles de CEA, CYFRA y CRP en la muestra biológica son menores o favorables con respecto a los niveles de referencia de CEA, CYFRA y CRP y si el nivel de

ferritina en la muestra biológica es mayor o favorable con respecto al nivel de referencia de ferritina.

Un sujeto puede tener CRC en estadio III o IV si el sujeto muestra una puntuación desfavorable, determinada por concentraciones o cantidades desfavorables de CEA, CYFRA, CRP y ferritina, como se describe en el presente documento, con otros biomarcadores y/o factores. El método puede comprender las etapas de: (1) obtener una muestra biológica de un sujeto; (2) determinar de los niveles de CEA, CYFRA, CRP y ferritina en la muestra biológica del sujeto; (3) comparar los niveles de CEA, CYFRA, CRP y ferritina en la muestra biológica en referencia a los niveles de CEA, CYFRA, CRP y ferritina; (i) proporcionar una puntuación de CEA para el sujeto en donde el sujeto obtiene una puntuación de 1 si el nivel de CEA en la muestra biológica es mayor que el nivel de referencia de CEA y una puntuación de 0 si el nivel de CEA en la muestra biológica es igual o inferior al nivel de referencia de CEA; (ii) proporcionar una puntuación CYFRA para el sujeto en donde el sujeto obtiene una puntuación de 1 si el nivel de CYFRA en la muestra biológica es mayor que el nivel de referencia de CYFRA y una puntuación de 0 si el nivel de CYFRA en la muestra biológica es igual o inferior al nivel de referencia de CYFRA; (iii) proporcionar una puntuación de CRP para el sujeto en donde el sujeto obtiene una puntuación de 1 si el nivel de CRP en la muestra biológica es mayor que el nivel de referencia de CRP y una puntuación de 0 si el nivel de CRP en la muestra biológica es igual o inferior al nivel de referencia de CRP; y (iv) proporcionar una puntuación de ferritina para el sujeto en donde el sujeto obtiene una puntuación de 1 si el nivel de ferritina en la muestra biológica es inferior al nivel de referencia de ferritina y una puntuación de 0 si el nivel de ferritina en la muestra biológica es igual o mayor que el nivel de referencia de ferritina; (4) sumar las puntuaciones de la etapa (3) para generar una puntuación total; y (5) proporcionar un diagnóstico de un sujeto que padece o está en riesgo de padecer CRC en estadio III o IV si la puntuación total es mayor que una puntuación de referencia o un diagnóstico de un sujeto que tiene adenomas de bajo riesgo y/o sin cáncer si la puntuación total es igual o inferior a la puntuación de referencia. Los niveles de referencia para los biomarcadores pueden ser iguales o diferentes para los sujetos masculinos y femeninos. La puntuación de referencia puede ser 0, 1, 2, 3 o 4. La puntuación de referencia puede ser igual o diferente para los sujetos masculinos y femeninos. El método puede incluir adicionalmente determinar la edad del sujeto y comparar la edad del sujeto con una edad de referencia y proporcionar una puntuación de edad para el sujeto en donde el sujeto obtiene una puntuación de 1 si la edad del sujeto es mayor o igual a la edad de referencia y una puntuación de 0 si la edad del sujeto es inferior a la edad de referencia. La edad de referencia puede ser la misma o diferente para los sujetos masculinos y femeninos. La puntuación de referencia puede ser 0, 1, 2, 3, 4 o 5. La puntuación de referencia puede ser igual o diferente para los sujetos masculinos y femeninos.

El método puede comprender adicionalmente la confirmación de un diagnóstico o riesgo de CRC en estadio III o IV mediante un régimen de detección estructural de CRC. El método puede comprender todavía adicionalmente la etapa de un tratamiento de CRC y/o un régimen de vigilancia de CRC.

13. Métodos para diferenciar entre sujetos con cáncer no de tipo CRC y sin cáncer

En un aspecto, la presente divulgación se dirige a diferenciar entre sujetos que tienen o están en riesgo de tener cáncer no de tipo CRC y sujetos que tienen adenomas de bajo riesgo y/o sin cáncer mediante la cuantificación o determinación de los niveles de la siguiente combinación de marcadores: CEA, CYFRA, CRP y ferritina. Un sujeto puede tener cáncer no de tipo CRC si el sujeto muestra concentraciones o cantidades desfavorables de CEA, CYFRA, CRP y ferritina, como se describe en el presente documento. El método puede comprender las etapas de: (1) obtener una muestra biológica de un sujeto; (2) determinar de los niveles de CEA, CYFRA, CRP y ferritina en la muestra biológica del sujeto; (3) comparar los niveles de CEA, CYFRA, CRP y ferritina en la muestra biológica en referencia a los niveles de CEA, CYFRA, CRP y ferritina; y (4) determinar o identificar al sujeto que tiene o está en riesgo de tener cáncer no de tipo CRC si los niveles de CEA, CYFRA y CRP en la muestra biológica son mayores o desfavorables con respecto a los niveles de referencia de CEA, CYFRA y CRP y si los niveles de ferritina en la muestra biológica son inferiores o desfavorables respecto al nivel de referencia de ferritina.

Se determina o identifica que el sujeto tiene adenomas de bajo riesgo y/o no tiene cáncer si los niveles de CEA, CYFRA y CRP en la muestra biológica son menores o favorables con respecto a los niveles de referencia de CEA, CYFRA y CRP y si el nivel de ferritina en la muestra biológica es mayor o favorable con respecto al nivel de referencia de ferritina.

Un sujeto puede tener cáncer no de tipo CRC si el sujeto muestra una puntuación desfavorable, determinada por concentraciones o cantidades desfavorables de CEA, CYFRA, CRP y ferritina, como se describe en el presente documento, con otros biomarcadores y/o factores. El método puede comprender las etapas de: (1) obtener una muestra biológica de un sujeto; (2) determinar de los niveles de CEA, CYFRA, CRP y ferritina en la muestra biológica del sujeto; (3) comparar los niveles de CEA, CYFRA, CRP y ferritina en la muestra biológica en referencia a los niveles de CEA, CYFRA, CRP y ferritina; (i) proporcionar una puntuación de CEA para el sujeto en donde el sujeto obtiene una puntuación de 1 si el nivel de CEA en la muestra biológica es mayor que el nivel de referencia de CEA y una puntuación de 0 si el nivel de CEA en la muestra biológica es igual o inferior al nivel de referencia de CEA; (ii) proporcionar una puntuación CYFRA para el sujeto en donde el sujeto obtiene una puntuación de 1 si el nivel de CYFRA en la muestra biológica es mayor que el nivel de referencia de CYFRA y una puntuación de 0 si el nivel de CYFRA en la muestra biológica es igual o inferior al nivel de referencia de CYFRA; (iii) proporcionar una puntuación de CRP para el sujeto en donde el sujeto obtiene una puntuación de 1 si el nivel de CRP en la muestra biológica es mayor que el nivel de referencia de CRP y una puntuación de 0 si el nivel de CRP en la muestra

biológica es igual o inferior al nivel de referencia de CRP; y (iv) proporcionar una puntuación de ferritina para el sujeto en donde el sujeto obtiene una puntuación de 1 si el nivel de ferritina en la muestra biológica es inferior al nivel de referencia de ferritina y una puntuación de 0 si el nivel de ferritina en la muestra biológica es igual o mayor que el nivel de referencia de ferritina; (4) sumar las puntuaciones de la etapa (3) para generar una puntuación total; y (5) proporcionar un diagnóstico de un sujeto que padece o está en riesgo de padecer cáncer no de tipo CRC si la puntuación total es mayor que una puntuación de referencia o un diagnóstico de un sujeto que tiene adenomas de bajo riesgo y/o sin cáncer si la puntuación total es igual o inferior a la puntuación de referencia. Los niveles de referencia para los biomarcadores pueden ser iguales o diferentes para los sujetos masculinos y femeninos. La puntuación de referencia puede ser 0, 1, 2, 3 o 4. La puntuación de referencia puede ser igual o diferente para los sujetos masculinos y femeninos. El método puede incluir adicionalmente determinar la edad del sujeto y comparar la edad del sujeto con una edad de referencia y proporcionar una puntuación de edad para el sujeto en donde el sujeto obtiene una puntuación de 1 si la edad del sujeto es mayor o igual a la edad de referencia y una puntuación de 0 si la edad del sujeto es inferior a la edad de referencia. La edad de referencia puede ser la misma o diferente para los sujetos masculinos y femeninos. La puntuación de referencia puede ser 0, 1, 2, 3, 4 o 5. La puntuación de referencia puede ser igual o diferente para los sujetos masculinos y femeninos.

El método puede comprender adicionalmente la confirmación de un diagnóstico o riesgo de cáncer no de tipo CRC mediante un régimen de detección estructural de CRC. El método puede comprender todavía adicionalmente la etapa de un tratamiento de CRC y/o un régimen de vigilancia de CRC.

14. Métodos para vigilar el progreso del CRC en un sujeto

Los métodos descritos en el presente documento pueden utilizarse también para vigilar la progresión del CRC, particularmente del CRC temprano, en un sujeto mediante la determinación de los niveles de AFP, CEA, ferritina, CYFRA, CA19-9, TIMP-1, Gal3 y/o CRP en un sujeto. El método puede incluir las etapas de (a) determinar las concentraciones o cantidades de AFP, CEA, ferritina, CYFRA, CA19-9, TIMP-1, Gal3 y/o CRP en una muestra de prueba de un sujeto, (b) determinar las concentraciones o cantidades de AFP, CEA, ferritina, CYFRA, CA19-9, TIMP-1, Gal3 y/o CRP en una muestra de prueba posterior de un sujeto y (c) comparar las concentraciones o cantidades de AFP, CEA, ferritina, CYFRA, CA19-9, TIMP-1, Gal3 y/o CRP como se determinó en la etapa (b) con las concentraciones o cantidades de AFP, CEA, ferritina, CYFRA, CA19-9, TIMP-1, Gal3 y/o CRP determinadas en la etapa (a), en donde si las concentraciones o cantidades determinadas en la etapa (b) son mayores, inalteradas o desfavorables cuando se compara con las concentraciones o cantidades de AFP, CEA, ferritina, CYFRA, CA19-9, TIMP-1, Gal3 y/o CRP determinadas en la etapa (a), a continuación, se determina que la enfermedad en el sujeto ha continuado, progresado o empeorado. Por comparación, si las concentraciones o cantidades de AFP, CEA, ferritina, CYFRA, CA19-9, TIMP-1, Gal3 y/o CRP como se determinó en la etapa (b) son inferiores o favorables cuando se comparan con las concentraciones o cantidades de AFP, CEA, ferritina, CYFRA, CA19-9, TIMP-1, Gal3 y/o CRP como se determinó en la etapa (a), a continuación, determina que el CRC en el sujeto se ha interrumpido, remitido o mejorado. En algunas realizaciones, se genera una puntuación de biomarcadores para cada biomarcador basándose en la diferencia entre el nivel del biomarcador en la muestra en comparación con un nivel de referencia del biomarcador y se genera una puntuación total a partir de estas puntuaciones de biomarcadores. La puntuación total se compara con una puntuación de referencia y el diagnóstico se basa en esta comparación.

Opcionalmente, el método comprende adicionalmente comparar las concentraciones o cantidades de AFP, CEA, ferritina, CYFRA, CA19-9, TIMP-1, Gal3 y/o CRP como se determinó en la etapa (b), por ejemplo, con niveles predeterminados. De forma adicional, opcionalmente el método comprende tratar al sujeto con uno o más regímenes de tratamiento (en concreto, cirugía, quimioterapia, terapia radioterapéutica, tratamientos radioterapéuticos, terapia dirigida o cualquier combinación de los mismos) durante un periodo de tiempo si la comparación muestra que las concentraciones o cantidades de AFP, CEA, ferritina, CYFRA, CA19-9, TIMP-1, Gal3 y/o CRP como se determinó en la etapa (b), por ejemplo, son mayores o están alteradas desfavorablemente respecto a los niveles predeterminados.

Todavía adicionalmente, los métodos pueden utilizarse para vigilar a un sujeto que recibe tratamiento con uno o más de cirugía, quimioterapia, terapia radioterapéutica, tratamientos radioterapéuticos, terapia dirigida o cualquier combinación de los mismos (colectivamente "regímenes de tratamiento"). Específicamente, tales métodos implican proporcionar una primera muestra de prueba de un sujeto antes de que se le haya administrado al sujeto uno o más regímenes de tratamiento. A continuación, las concentraciones o cantidades en una primera muestra de prueba de un sujeto de AFP, CEA, ferritina, CYFRA, CA19-9, TIMP-1, Gal3 y/o CRP se determinan (por ejemplo, utilizando métodos conocidos en la técnica). Después de que las concentraciones o cantidades de AFP, CEA, ferritina, CYFRA, CA19-9, TIMP-1, Gal3 y/o CRP se determinen, opcionalmente las concentraciones o cantidades de AFP, CEA, ferritina, CYFRA, CA19-9, TIMP-1, Gal3 y/o CRP a continuación se comparan con valores predeterminados. Si las concentraciones o cantidades de AFP, CEA, ferritina, CYFRA, CA19-9, TIMP-1, Gal3 y/o CRP como se determinaron en la primera muestra de prueba son inferiores o favorables respecto a los niveles predeterminados, a continuación el sujeto no se trata con uno o más regímenes de tratamiento o, como alternativa, el sujeto puede tratarse al sujeto con uno o más regímenes de tratamiento. Si las concentraciones o cantidades de AFP, CEA, ferritina, CYFRA, CA19-9, TIMP-1, Gal3 y/o CRP como se determinaron en la primera muestra de prueba son superiores o desfavorables respecto a los niveles predeterminados, a continuación se trata al sujeto con uno o más regímenes de tratamiento durante un periodo de tiempo o como alternativa, el sujeto no se trata con uno o más

regímenes de tratamiento. El periodo de tiempo durante el que se trata al sujeto con dichos uno o más regímenes de tratamiento se puede determinar por un experto en la materia (por ejemplo, el periodo de tiempo puede ser de aproximadamente siete (7) días a aproximadamente dos años, preferentemente de aproximadamente catorce (14) días a aproximadamente un (1) año).

Durante el transcurso del tratamiento con dichos uno o más regímenes de tratamiento, a continuación se obtienen las muestras de prueba segunda y posteriores del sujeto. El número de muestras de prueba y el tiempo en que se obtienen dichas muestras de prueba del sujeto no son críticos. Por ejemplo, se puede obtener una segunda muestra de prueba siete (7) días después de que se administre al sujeto por primera vez dichos uno o más regímenes de tratamiento, una tercera muestra de prueba puede obtenerse dos (2) semanas después de que se administre al sujeto por primera vez dichos uno o más regímenes de tratamiento, una cuarta muestra de prueba se puede obtener tres (3) semanas después de que se administre al sujeto por primera vez dichos uno o más regímenes de tratamiento, una quinta muestra de prueba se puede obtener cuatro (4) semanas después de que se administre al sujeto por primera vez dichos uno o más regímenes de tratamiento, etc.

Después de obtener cada segunda o posterior muestra de prueba del sujeto, las concentraciones o cantidades de AFP, CEA, ferritina, CYFRA, CA19-9, TIMP-1, Gal3 y/o CRP se determinan en la segunda prueba o posteriores (por ejemplo, utilizando métodos conocidos en la técnica). Las concentraciones o cantidades de AFP, CEA, ferritina, CYFRA, CA19-9, TIMP-1, Gal3 y/o CRP como se determinaron en cada una de las muestras de prueba segunda y posteriores, a continuación se comparan con las concentraciones o cantidades de AFP, CEA, ferritina, CYFRA, CA19-9, TIMP-1, Gal3 y/o CRP como se determinaron en la primera muestra de prueba (por ejemplo, la muestra de prueba que fue originariamente comparada opcionalmente con el nivel predeterminado). Si las concentraciones o cantidades de AFP, CEA, ferritina, CYFRA, CA19-9, TIMP-1, Gal3 y/o CRP como se determinaron en la etapa (c) son inferiores o favorables cuando se comparan con las concentraciones o cantidades de AFP, CEA, ferritina, CYFRA, CA19-9, TIMP-1, Gal3 y/o CRP como se determinó en la etapa (a), a continuación, se determina que la enfermedad en el sujeto se ha interrumpido, remitido o mejorado y el sujeto debe continuar con la administración de dichos uno o los regímenes de tratamiento de la etapa (b). Sin embargo, si las concentraciones o cantidades determinadas en la etapa (c) son mayores, inalteradas o desfavorables cuando se compara con las concentraciones o cantidades de AFP, CEA, ferritina, CYFRA, CA19-9, TIMP-1, Gal3 y/o CRP como se determinó en la etapa (a), a continuación, se determina que la enfermedad en el sujeto ha continuado, progresado o empeorado y el sujeto debe tratarse con una mayor concentración de dichos uno o más regímenes de tratamiento administradas al sujeto en la etapa (b) o se debe tratar al sujeto con uno o más regímenes de tratamiento que son diferentes de dichos uno o más regímenes de tratamiento administrado al sujeto en la etapa (b). Específicamente, puede tratarse al sujeto con uno o más regímenes de tratamiento que son diferentes de dichos uno o más regímenes de tratamiento que ha recibido el sujeto anteriormente para reducir o bajar los niveles del sujeto de AFP, CEA, ferritina, CYFRA, CA19-9, TIMP-1, Gal3 y/o CRP.

Asimismo, los ensayos anteriores pueden efectuarse utilizando una primera muestra de ensayo obtenida de un sujeto, donde la primera muestra de ensayo se obtiene de una fuente, tal como orina, suero o plasma. Opcionalmente, los ensayos anteriores pueden repetirse utilizando una segunda muestra de ensayo obtenida del sujeto, donde la segunda muestra de ensayo se obtiene de otra fuente. Por ejemplo, en caso de que la primera muestra de ensayo se obtuviese de orina, la segunda muestra de ensayo puede obtenerse de suero o plasma. Los resultados obtenidos de los ensayos utilizando la primera muestra de ensayo y la segunda muestra de ensayo pueden compararse. La comparación puede utilizarse para evaluar el estatus de una enfermedad o afección en el sujeto.

15. Niveles de referencia

Los métodos descritos en el presente documento utilizan niveles de referencia de AFP, CEA, ferritina, CYFRA, CA19-9, TIMP-1, Gal3 y/o CRP de un sujeto para (1) identificar y determinar si un sujeto padece o está en riesgo de padecer adenomas de alto riesgo y/o CRC o no; (2) identificar y determinar si un sujeto masculino o femenino padece o está en riesgo de padecer un cáncer distinto del CRC; (3) proporcionar un diagnóstico de adenomas de alto riesgo y/o CRC en un sujeto; (4) proporcionar o ayudar a proporcionar un diagnóstico, pronóstico y/o estratificación del riesgo de adenomas de alto riesgo y/o CRC en un sujeto que tiene o se sospecha que tiene adenomas de alto riesgo y/o CRC; (5) diferenciar entre sujetos con adenomas de alto riesgo y/o CRC y adenomas de bajo riesgo y/o sin cáncer; (6) diferenciar entre sujetos con CRC y sin cáncer; y (7) vigilar la progresión del CRC en un sujeto. Los niveles superiores o iguales a los niveles de referencia de AFP, CEA, CYFRA, CA19-9, TIMP-1, Gal3 y/o CRP y/o niveles inferiores o iguales a los niveles de referencia de ferritina, identifican al paciente que tiene adenomas de alto riesgo y/o CRC o está en riesgo de tener o desarrollar adenomas de alto riesgo y/o CRC. Los niveles inferiores al nivel de referencia de AFP, CEA, CYFRA, CA19-9, TIMP-1, Gal3 y/o CRP y/o niveles superiores al nivel de referencia de ferritina identifican al paciente que tiene adenomas de bajo riesgo y/o sin cáncer. Los niveles superiores o iguales a los niveles de referencia de AFP, CEA, CYFRA, CA19-9, TIMP-1, Gal3 y/o CRP y/o niveles inferiores o iguales a los niveles de referencia de ferritina pueden identificar también al paciente que tiene un cáncer distinto del CRP o que está en riesgo de tener o de desarrollar un cáncer distinto del CRP. Los niveles inferiores al nivel de referencia de AFP, CEA, CYFRA, CA19-9, TIMP-1, Gal3 y/o CRP y/o niveles superiores al nivel de referencia de ferritina pueden identificar también al paciente que no tiene cáncer.

a. Niveles de referencia para los marcadores AFP, CEA, ferritina, CYFRA, CA19-9, TIMP-1, Gal3 y/o CRP

Habitualmente, pueden emplearse niveles predeterminados como un punto de referencia que permita evaluar los resultados obtenidos tras ensayar una muestra de prueba para AFP, CEA, ferritina, CYFRA, CA19-9, TIMP-1, Gal3 y/o CRP. Habitualmente, al hacer dicha comparación, los niveles predeterminados se obtienen ejecutando un ensayo particular un número suficiente de veces y en condiciones adecuadas, de manera que se puede hacer un enlace o asociación del analito presente, cantidad o concentración con una etapa particular o criterio de valoración del CRC con indicios en particular. Típicamente, los niveles predeterminados se obtienen con ensayos de sujetos de referencia (o poblaciones de sujetos). El sujeto de referencia puede ser un sujeto de control o un sujeto con cáncer. La población de referencia o el grupo de referencia puede ser un grupo de control o un grupo de cáncer. El AFP, CEA, ferritina, CYFRA, CA19-9, TIMP-1, Gal3 y/o CRP medidos pueden incluir fragmentos de AFP, CEA, ferritina, CYFRA, CA19-9, TIMP-1, Gal3 y/o CRP de los mismos, productos de degradación de los mismos y/o productos de escisión enzimática de los mismos.

En particular, con respecto a los niveles predeterminados como se emplea para vigilar la progresión y/o tratamiento de la enfermedad, la cantidad o concentración de AFP, CEA, ferritina, CYFRA, CA19-9, TIMP-1, Gal3 y/o CRP o los fragmentos de AFP, CEA, ferritina, CYFRA, CA19-9, TIMP-1, Gal3 y/o CRP pueden estar "inalterados", "favorables" (o "alterados favorablemente") o "desfavorables" (o "alterados desfavorablemente"). "Elevada" o "aumentada" se refiere a una cantidad o una concentración en una muestra de prueba que es superior o mayor que un nivel o intervalo típico o normal (por ejemplo, nivel predeterminado), tal como un nivel típico o normal encontrado en un grupo de control o grupo de cáncer o es superior o mayor que otro nivel o intervalo de referencia (por ejemplo, muestra inicial o basal). El término "disminuido" o "reducido" se refiere a una cantidad o concentración en una muestra de prueba que es inferior o menor que un nivel o intervalo típico o normal (por ejemplo, nivel predeterminado), tal como un nivel típico o normal encontrado en un grupo de control o grupo de cáncer o es inferior o menor que otro nivel o intervalo de referencia (por ejemplo, muestra inicial o inicial). El término "alterado" se refiere a una cantidad o concentración en una muestra que está alterada (aumentada o disminuida) sobre un nivel o intervalo típico o normal (por ejemplo, nivel predeterminado), tal como un nivel típico o normal encontrado en un grupo de control o de cáncer o sobre otro nivel o intervalo de referencia (por ejemplo, muestra inicial o basal).

Los niveles típicos o normales o los intervalos para AFP, CEA, ferritina, CYFRA, CA19-9, TIMP-1, Gal3 y/o CRP se definen de acuerdo con la práctica estándar. Puede considerarse que un nivel denominado alterado o una alteración se ha producido cuando hay un cambio neto en comparación con el nivel o intervalo típico o normal o un nivel o intervalo de referencia que no puede explicarse por el error experimental o la variación de la muestra. En algunas realizaciones, se comparará el nivel medido en una muestra particular con el nivel o intervalo de niveles determinados en muestras similares en un sujeto denominado sujeto normal, es decir, sujeto de control. En este contexto, un sujeto "normal" (a veces denominado "control" o "sano") es un individuo sin cáncer detectable y un paciente o población "normal" es/son uno(s) que exhibe(n) cáncer no detectable, por ejemplo. Un "sujeto aparentemente normal" es uno en el que no se ha evaluado o se está evaluando AFP, CEA, ferritina, CYFRA, CA19-9, TIMP-1, Gal3 y/o CRP. Se dice que el nivel de un analito es "elevado" cuando el analito es normalmente indetectable (por ejemplo, el nivel normal es cero o dentro de un intervalo de aproximadamente el percentil 25 a aproximadamente al percentil 75 de poblaciones normales), pero se detecta en una muestra de prueba, así como cuando el analito está presente en la muestra de prueba a un nivel superior que el nivel normal. En algunas realizaciones, el nivel medido en una muestra particular se comparará con el nivel o intervalo de niveles determinados en muestras similares de un sujeto con cáncer.

Por ejemplo, en un aspecto, los niveles de referencia superiores (o mayores) o iguales a 3,5 ng/ml, 4,0 ng/ml, 4,3 ng/ml, 4,4 ng/ml, 4,5 ng/ml, 4,6 ng/ml, 4,7 ng/ml, 4,8 ng/ml, 4,9 ng/ml, 5,0 ng/ml, 5,1 ng/ml, 5,2 ng/ml, 5,3 ng/ml, 5,0 ng/ml, 5,5 ng/ml, 5,6 ng/ml, 5,7 ng/ml, 5,8 ng/ml, 5,9 ng/ml, 6,0 ng/ml, 6,1 ng/ml, 6,2 ng/ml, 6,3 ng/ml, 6,4 ng/ml, 6,5 ng/ml, 6,6 ng/ml, 6,7 ng/ml, 6,8 ng/ml, 6,9 ng/ml, 7,0 ng/ml, 7,1 ng/ml, 7,2 ng/ml, 7,3 ng/ml, 7,4 ng/ml, 7,5 ng/ml, 7,6 ng/ml, 7,7 ng/ml, 7,8 ng/ml, 7,9 ng/ml u 8,0 ng/ml en suero para CEA, niveles de referencia superiores o iguales a 1,50 ng/ml, 1,55 ng/ml, 1,60 ng/ml, 1,65 ng/ml, 1,67 ng/ml, 1,68 ng/ml, 1,69 ng/ml, 1,70 ng/ml, 1,71 ng/ml, 1,72 ng/ml, 1,73 ng/ml, 1,74 ng/ml, 1,75 ng/ml, 1,76 ng/ml, 1,77 ng/ml, 1,80 ng/ml, 1,85 ng/ml, 1,90 ng/ml, 1,95 ng/ml, 1,96 ng/ml, 1,97 ng/ml, 1,98 ng/ml, 1,99 ng/ml, 2,00 ng/ml, 2,01 ng/ml, 2,02 ng/ml, 2,03 ng/ml, 2,04 ng/ml, 2,05 ng/ml, 2,06 ng/ml, 2,07 ng/ml, 2,08 ng/ml, 2,09 ng/ml, 2,10 ng/ml, 2,11 ng/ml, 2,12 ng/ml, 2,13 ng/ml, 2,14 ng/ml, 2,15 ng/ml, 2,16 ng/ml, 2,17 ng/ml, 2,18 ng/ml, 2,19 ng/ml, 2,20 ng/ml, 2,21 ng/ml, 2,22 ng/ml, 2,23 ng/ml, 2,24 ng/ml, 2,25 ng/ml, 2,50 ng/ml o 3,00 ng/ml en suero para CYFRA, niveles de referencia superiores o iguales a 1,0 mg/ml, 1,5 mg/ml, 1,6 mg/ml, 1,7 mg/ml, 1,8 mg/ml, 1,9 mg/ml, 2,0 mg/ml, 2,5 mg/ml, 4,0 mg/ml, 4,5 mg/ml, 5,0 mg/ml, 5,1 mg/ml, 5,2 mg/ml, 5,3 mg/ml, 5,4 mg/ml, 5,5 mg/ml, 5,6 mg/ml, 5,7 mg/ml, 5,8 mg/ml, 5,9 mg/ml, 6,0 mg/ml, 6,5 mg/ml, 6,6 mg/ml, 6,7 mg/ml, 6,8 mg/ml, 6,9 mg/ml, 7,0 mg/ml, 7,1 mg/ml, 7,2 mg/ml, 7,3 mg/ml, 7,4 mg/ml, 7,5 mg/ml, 7,6 mg/ml, 7,7 mg/ml, 7,8 mg/ml, 7,9 mg/ml, 8,0 mg/ml, 8,1 mg/ml, 8,2 mg/ml, 8,3 mg/ml, 8,4 mg/ml, 8,5 mg/ml, 8,6 mg/ml, 8,7 mg/ml, 8,8 mg/ml, 8,9 mg/ml, 9,0 mg/ml, 9,5 mg/ml, 10,0 mg/ml, 15,0 mg/ml, 17,0 mg/ml, 17,1 mg/ml, 17,2 mg/ml, 17,3 mg/ml, 17,4 mg/ml, 17,5 mg/ml, 17,6 mg/ml, 17,7 mg/ml, 17,8 mg/ml, 17,9 mg/ml, 18,0 mg/ml, 18,1 mg/ml, 18,2 mg/ml, 18,3 mg/ml, 18,4 mg/ml, 18,5 mg/ml, 18,6 mg/ml, 18,7 mg/ml, 18,8 mg/ml, 18,9 mg/ml, 19,0 mg/ml, 19,5 mg/ml o 20,0 mg/ml en suero para CRP, niveles de referencia inferiores o iguales a 120,0 ng/ml, 115,0 ng/ml, 114,0 ng/ml, 113,0 ng/ml, 112,0 ng/ml, 111,0 ng/ml, 110,0 ng/ml, 109,0 ng/ml, 108,0 ng/ml, 107,0 ng/ml, 106,0 ng/ml,

105,0 ng/ml, 104,0 ng/ml, 103,0 ng/ml, 102,0 ng/ml, 101,0 ng/ml, 100,0 ng/ml, 99,0 ng/ml, 98,0 ng/ml, 97,0 ng/ml, 96,0 ng/ml, 95,0 ng/ml, 94,0 ng/ml, 93,0 ng/ml, 92,0 ng/ml, 91,0 ng/ml, 90,0 ng/ml, 89,0 ng/ml, 88,0 ng/ml, 87,0 ng/ml, 86,0 ng/ml, 85,0 ng/ml, 80,0 ng/ml, 75,0 ng/ml, 70,0 ng/ml, 65,0 ng/ml, 60,0 ng/ml, 55,0 ng/ml, 50,0 ng/ml, 45,0 ng/ml, 44,0 ng/ml, 43,0 ng/ml, 42,0 ng/ml, 41,0 ng/ml, 40,0 ng/ml, 39,0 ng/ml, 38,0 ng/ml, 37,0 ng/ml, 36,0 ng/ml, 35,0 ng/ml, 34,0 ng/ml, 33,0 ng/ml, 32,0 ng/ml, 31,0 ng/ml, 30,0 ng/ml, o 25,0 ng/ml en suero para ferritina, niveles de referencia superiores o iguales a 23,0 U/ml, 23,1 U/ml, 23,2 U/ml, 23,3 U/ml, 23,4 U/ml, 23,5 U/ml, 23,6 U/ml, 23,7 U/ml, 23,8 U/ml, 23,9 U/ml, 24,0 U/ml, 24,1 U/ml, 24,2 U/ml, 24,3 U/ml, 24,4 U/ml, 24,5 U/ml, 24,6 U/ml, 24,7 U/ml, 24,8 U/ml, 24,9 U/ml, 25,0 U/ml, 25,1 U/ml, 25,2 U/ml, 25,3 U/ml, 25,4 U/ml, 25,5 U/ml, 25,6 U/ml, 25,7 U/ml, 25,8 U/ml, 25,9 U/ml, 26,0 U/ml, 26,1 U/ml, 26,2 U/ml, 26,3 U/ml, 26,4 U/ml, 26,5 U/ml, 26,6 U/ml, 26,7 U/ml, 26,8 U/ml, 26,9 U/ml, 27,0 U/ml, 27,1 U/ml, 27,2 U/ml, 27,3 U/ml, 27,4 U/ml, 27,5 U/ml, 27,6 U/ml, 27,7 U/ml, 27,8 U/ml, 27,9 U/ml, 28,0 U/ml, 28,5 U/ml o 29,0 U/ml en suero para CA19-9 o combinaciones de los mismos, identifican al sujeto que tiene adenomas de alto riesgo y/o CRC. En otro aspecto, los niveles de referencia superiores (o mayores) o iguales a 3,5 a 8,0 ng/ml en suero para CEA, niveles de referencia superiores o iguales a 1,50 a 3,00 ng/ml en suero para CYFRA, niveles de referencia superiores o iguales a 1,0 a 20,0 mg/ml en suero para CRP, niveles de referencia inferiores o iguales a 120,0 a 25,0 ng/ml en suero para ferritina, niveles de referencia superiores o iguales a 23,0 a 29,0 U/ml en suero para CA19-9, identifican al sujeto que tiene adenomas de alto riesgo y/o CRC.

Por ejemplo, en un aspecto, niveles de referencia superiores o iguales a 1,0 ng/ml, 1,1 ng/ml, 1,2 ng/ml, 1,3 ng/ml, 1,4 ng/ml, 1,5 ng/ml, 1,6 ng/ml, 1,7 ng/ml, 1,8 ng/ml, 1,9 ng/ml, 2,0 ng/ml, 2,1 ng/ml, 2,2 ng/ml, 2,3 ng/ml, 2,4 ng/ml, 2,5 ng/ml, 3,0 ng/ml o 3,5 ng/ml en suero para CYFRA, niveles de referencia superiores o iguales a 9,0 mg/ml, 9,1 mg/ml, 9,2 mg/ml, 9,3 mg/ml, 9,4 mg/ml, 9,5 mg/ml, 9,6 mg/ml, 9,7 mg/ml, 9,8 mg/ml, 9,9 mg/ml, 10,0 mg/ml, 10,1 mg/ml, 10,2 mg/ml, 10,3 mg/ml, 10,4 mg/ml, 10,5 mg/ml, 10,6 mg/ml, 10,7 mg/ml, 10,8 mg/ml, 10,9 mg/ml, 11,0 mg/ml, 11,5 mg/ml, 12,0 mg/ml, 14,0 mg/ml, 14,1 mg/ml, 14,2 mg/ml, 14,3 mg/ml, 14,4 mg/ml, 14,5 mg/ml, 14,6 mg/ml, 14,7 mg/ml, 14,8 mg/ml, 14,9 mg/ml, 15,0 mg/ml, 15,1 mg/ml, 15,2 mg/ml, 15,3 mg/ml, 15,4 mg/ml, 15,5 mg/ml, 15,6 mg/ml, 15,7 mg/ml, 15,8 mg/ml, 15,9 mg/ml, 16,0 mg/ml, 16,1 mg/ml, 16,2 mg/ml, 16,3 mg/ml, 16,4 mg/ml, 16,5 mg/ml, 17,0 mg/ml o 17,5 mg/ml en suero para CRP, niveles de referencia superiores o iguales a 140 ng/ml, 141 ng/ml, 142 ng/ml, 143 ng/ml, 144 ng/ml, 145 ng/ml, 146 ng/ml, 147 ng/ml, 148 ng/ml, 149 ng/ml, 150 ng/ml, 151 ng/ml, 152 ng/ml, 153 ng/ml, 154 ng/ml, 155 ng/ml, 156 ng/ml, 157 ng/ml, 158 ng/ml, 159 ng/ml o 160 ng/ml en suero para TIMP-1, niveles de referencia superiores o iguales a 24,0 U/ml, 24,1 U/ml, 24,2 U/ml, 24,3 U/ml, 24,4 U/ml, 24,5 U/ml, 24,6 U/ml, 24,7 U/ml, 24,8 U/ml, 24,9 U/ml, 25,0 U/ml, 25,1 U/ml, 25,2 U/ml, 25,3 U/ml, 25,4 U/ml, 25,5 U/ml, 25,6 U/ml, 25,7 U/ml, 25,8 U/ml, 25,9 U/ml, 26,0 U/ml o 26,5 U/ml en suero para CA19-9, niveles de referencia superiores o iguales a 5,0 ng/ml, 5,1 ng/ml, 5,2 ng/ml, 5,3 ng/ml, 5,4 ng/ml, 5,5 ng/ml, 5,6 ng/ml, 5,7 ng/ml, 5,8 ng/ml, 5,9 ng/ml, 6,0 ng/ml, 6,1 ng/ml, 6,2 ng/ml, 6,3 ng/ml, 6,4 ng/ml, 6,5 ng/ml, 6,6 ng/ml, 6,7 ng/ml, 6,8 ng/ml, 6,9 ng/ml, 7,0 ng/ml, 7,5 ng/ml u 8,0 ng/ml en suero para AFP, niveles de referencia superiores o iguales a 4,0 ng/ml, 4,1 ng/ml, 4,2 ng/ml, 4,3 ng/ml, 4,4 ng/ml, 4,5 ng/ml, 4,6 ng/ml, 4,7 ng/ml, 4,8 ng/ml, 4,9 ng/ml, 5,0 ng/ml, 5,1 ng/ml, 5,2 ng/ml, 5,3 ng/ml, 5,4 ng/ml, 5,5 ng/ml, 5,6 ng/ml, 5,7 ng/ml, 5,8 ng/ml, 5,9 ng/ml, 6,0 ng/ml, 6,1 ng/ml, 6,2 ng/ml, 6,3 ng/ml, 6,4 ng/ml, 6,5 ng/ml, 6,6 ng/ml, 6,7 ng/ml, 6,8 ng/ml, 6,9 ng/ml, 7,0 ng/ml o 7,5 ng/ml en suero para CEA, o combinaciones de los mismos, identifican al sujeto que tiene un cáncer distinto del CRC. En otro aspecto, niveles de referencia superiores o iguales a 1,0 a 3,5 ng/ml en suero para CYFRA, niveles de referencia superiores o iguales a 9,0 a 17,5 mg/ml en suero para CRP, niveles de referencia superiores o iguales a 140 a 160 ng/ml en suero para TIMP-1, niveles de referencia superiores o iguales a 24,0 a 26,5 U/ml en suero para CA19-9, niveles de referencia superiores o iguales a 5,0 a 8,0 ng/ml en suero para AFP, niveles de referencia superiores o iguales a 4,0 a 7,5 ng/ml en suero para CEA, o combinaciones de los mismos, identifican al sujeto que tiene un cáncer distinto del CRC.

Los valores límite (o valores límite predeterminados) pueden determinarse mediante la metodología del modelo de índice adaptativo (AIM; del inglés, Adaptive Index Model). Los valores límite (o valores límite predeterminados) pueden determinarse mediante un análisis de una curva operativa del receptor (ROC; del inglés, receiver operating curve) a partir de muestras biológicas del grupo de pacientes. El análisis ROC, como son conocidos habitualmente en las técnicas biológicas, es una determinación de la capacidad de una prueba para discriminar una condición de otra, por ejemplo, para determinar el rendimiento de cada marcador en la identificación de un paciente que tiene CRC. Se proporciona una descripción de un análisis ROC aplicado de acuerdo con la presente divulgación en P.J. Heagerty *et al.*, Time-dependent ROC curves for censored survival data and a diagnostic marker, *Biometrics* 56:337-44(2000), la divulgación del cual se incorpora en el presente documento por referencia en su totalidad. Como alternativa, los valores límite se pueden determinar mediante un análisis de cuartiles de muestras biológicas de un grupo de pacientes. Por ejemplo, un valor límite se puede determinar mediante la selección de un valor que corresponde a cualquier valor en el intervalo del percentil 25-75, preferentemente un valor que corresponde al percentil 25, el percentil 50 o el percentil 75 y más preferentemente el percentil 75.

Tales análisis estadísticos se pueden realizar utilizando cualquier método conocido en la técnica y se puede implementar a través de un gran número de paquetes de software disponibles en el mercado (por ejemplo, de Analyse-it Software Ltd., Leeds, Reino Unido; StataCorp LP, College Station, Texas; SAS Institute Inc., Cary, Carolina del Norte).

b. Niveles de referencia para biomarcadores adicionales

Habitualmente, pueden emplearse niveles predeterminados o de referencia como un punto de referencia que permita

evaluar los resultados obtenidos tras ensayar una muestra de prueba para mS9, HbA1c, C3a, Cat X, suPAR(I), PAI-1, ENO2 o cualquier combinación de los mismos. Habitualmente, al hacer dicha comparación, los niveles predeterminados se obtienen ejecutando un ensayo particular un número suficiente de veces y en condiciones adecuadas, de manera que se puede hacer un enlace o asociación del analito presente, cantidad o concentración con una etapa particular o criterio de valoración del CRC con indicios en particular. Típicamente, los niveles predeterminados se obtienen con ensayos de sujetos de referencia (o poblaciones de sujetos). El sujeto de referencia puede ser un sujeto de control o un sujeto con cáncer. La población de referencia o el grupo de referencia puede ser un grupo de control o un grupo de cáncer. El mS9, HbA1c, C3a, Cat X, suPAR(I), PAI-1 y/o ENO2 medido puede incluir fragmentos de mS9, HbA1c, C3a, Cat X, suPAR(I), PAI-1 y/o ENO2 de los mismos, productos de degradación de los mismos y/o productos de escisión enzimática de los mismos.

En particular, con respecto a los niveles predeterminados como se emplea para vigilar la progresión y/o tratamiento de la enfermedad, la concentración o cantidad de mS9, HbA1c, C3a, Cat X, suPAR(I), PAI-1 y/o ENO2 o fragmentos de mS9, HbA1c, C3a, Cat X, suPAR(I), PAI-1 y/o ENO2 pueden ser "inalterados", "favorables" (o "alterados favorablemente") o "desfavorables" (o "alterados desfavorablemente"). "Elevada" o "aumentada" se refiere a una cantidad o una concentración en una muestra de prueba que es superior o mayor que un nivel o intervalo típico o normal (por ejemplo, nivel predeterminado), tal como un nivel típico o normal encontrado en un grupo de control o grupo de cáncer o es superior o mayor que otro nivel o intervalo de referencia (por ejemplo, muestra inicial o basal). El término "disminuido" o "reducido" se refiere a una cantidad o concentración en una muestra de prueba que es inferior o menor que un nivel o intervalo típico o normal (por ejemplo, nivel predeterminado), tal como un nivel típico o normal encontrado en un grupo de control o grupo de cáncer o es inferior o menor que otro nivel o intervalo de referencia (por ejemplo, muestra inicial o inicial). El término "alterado" se refiere a una cantidad o concentración en una muestra que está alterada (aumentada o disminuida) sobre un nivel o intervalo típico o normal (por ejemplo, nivel predeterminado), tal como un nivel típico o normal encontrado en un grupo de control o de cáncer o sobre otro nivel o intervalo de referencia (por ejemplo, muestra inicial o basal).

Los niveles típicos o normales o los intervalos para mS9, HbA1c, C3a, Cat X, suPAR(I), PAI-1 y/o ENO2 se definen de acuerdo con la práctica estándar. Puede considerarse que un nivel denominado alterado o una alteración se ha producido cuando hay un cambio neto en comparación con el nivel o intervalo típico o normal o un nivel o intervalo de referencia que no puede explicarse por el error experimental o la variación de la muestra. Por tanto, se comparará el nivel medido en una muestra particular con el nivel o intervalo de niveles determinados en muestras similares en un sujeto denominado normal. En este contexto, un sujeto "normal" (a veces denominado "control" o "sano") es un individuo sin cáncer detectable y un paciente o población "normal" es/son uno(s) que exhibe(n) cáncer no detectable, por ejemplo. Un "sujeto aparentemente normal" es uno en el que no se han evaluado o se están evaluando mS9, HbA1c, C3a, PAI-1 y/o ENO2. Se dice que el nivel de un analito es "elevado" cuando el analito es normalmente indetectable (por ejemplo, el nivel normal es cero o dentro de un intervalo de aproximadamente el percentil 25 a aproximadamente al percentil 75 de poblaciones normales), pero se detecta en una muestra de prueba, así como cuando el analito está presente en la muestra de prueba a un nivel superior que el nivel normal. En algunas realizaciones, el nivel medido en una muestra particular se comparará con el nivel o intervalo de niveles determinados en muestras similares de un sujeto con cáncer.

Los valores límite (o valores límite predeterminados) pueden determinarse mediante la metodología del modelo de índice adaptativo (AIM). Los valores límite (o valores límite predeterminados) pueden determinarse mediante un análisis de una curva operativa del receptor (ROC) a partir de muestras biológicas del grupo de pacientes. El análisis ROC, como son conocidos habitualmente en las técnicas biológicas, es una determinación de la capacidad de una prueba para discriminar una condición de otra, por ejemplo, para determinar el rendimiento de cada marcador en la identificación de un paciente que tiene CRC. Se proporciona una descripción de un análisis ROC aplicado de acuerdo con la presente divulgación en P.J. Heagerty *et al.*, Time-dependent ROC curves for censored survival data and a diagnostic marker, *Biometrics* 56:337-44(2000), la divulgación del cual se incorpora en el presente documento por referencia en su totalidad.

Como alternativa, los valores límite se pueden determinar mediante un análisis de cuartiles de muestras biológicas de un grupo de pacientes. Por ejemplo, un valor límite se puede determinar mediante la selección de un valor que corresponde a cualquier valor en el intervalo del percentil 25-75, preferentemente un valor que corresponde al percentil 25, el percentil 50 o el percentil 75 y más preferentemente el percentil 75.

Tales análisis estadísticos se pueden realizar utilizando cualquier método conocido en la técnica y se puede implementar a través de un gran número de paquetes de software disponibles en el mercado (por ejemplo, de Analyse-it Software Ltd., Leeds, Reino Unido; StataCorp LP, College Station, Texas; SAS Institute Inc., Cary, Carolina del Norte).

16. Medios para confirmar el estado del CRC de un sujeto

El sujeto identificado en los métodos descritos anteriormente que tiene niveles de AFP, CEA, ferritina, CYFRA, CA19-9, TIMP-1, Gal3 y/o CRP mayores que los valores analizados anteriormente se identifican como pacientes que padecen de adenomas de alto riesgo y/o CRC. A continuación, se puede administrar al sujeto unos medios para

confirmar el estado del CRC. Unos medios para confirmar el estado del CRC pueden incluir realizar un método de cribado de CRC, tal como una prueba fecal y/o pruebas de detección estructural, como se ha descrito anteriormente. La etapa del CRC se puede confirmar mediante examen patológico del colon resecado, sigmoidoscopia, colonoscopia y diversas técnicas de imágenes, así como una evaluación de nódulos linfáticos proximales, evaluación de nódulos centinelas, TC de pecho/abdomen/pelvis, exploraciones por IMR, exploraciones por tomografía de emisión de positrones (PET; del inglés, positron emission tomography), pruebas de funcionalidad hepática (para metástasis hepáticas) y análisis de sangre (recuento de sangre completa ("CBC"; del inglés, complete blood count), antígeno carcinoembrionario ("CEA"), CA 19-9).

17. Medios para vigilar el estado del CRC de un sujeto

El sujeto identificado en los métodos descritos anteriormente que tiene niveles de AFP, CEA, ferritina, CYFRA, CA19-9, TIMP-1, Gal3 y/o CRP mayores que los valores analizados se identifican como pacientes que padecen de CRC o cáncer distinto del CRC. Muchos pacientes pueden desarrollar una recurrencia de CRC tras una resección quirúrgica, particularmente en los primeros 2 o 3 años. Por consiguiente, los pacientes de CRC deben ser vigilados de cerca para determinar la respuesta a la terapia y para detectar la enfermedad y metástasis persistente o recurrente.

A continuación, el sujeto se puede someter a un régimen de vigilancia de CRC o de cáncer. Específicamente, al sujeto se le puede administrar un medio para vigilar la eficacia de cualquier régimen de tratamiento (tal como cirugía, terapia radioterapéutica, tratamientos radioterapéuticos, quimioterapia, terapia dirigida o cualquier combinación de los mismos) que se utilice para tratar el cáncer así como para evaluar el progreso (o falta del mismo) de la enfermedad. El régimen de vigilancia del cáncer o del CRC puede implicar la realización de la determinación de AFP, CEA, ferritina, CYFRA, CA19-9, TIMP-1, Gal3 y/o CRP en intervalos periódicos (tales como intervalos periódicos que sean de una vez a la semana, una vez al mes, una vez cada dos meses, una vez cada tres meses, una vez cada cuatro meses, una vez cada cinco meses, una vez cada seis meses, una vez cada siete meses, una vez cada ocho meses, una vez cada nueve meses, una vez cada diez meses, una vez cada once meses y una vez al año) o cualquier combinación de los mismos.

18. Regímenes de tratamiento

El sujeto identificado en los métodos descritos anteriormente que tiene niveles de AFP, CEA, ferritina, CYFRA, CA19-9, TIMP-1, Gal3 y/o CRP mayores que los valores analizados anteriormente se identifican como pacientes que padecen de adenomas de alto riesgo, CRC y/o un cáncer distinto del CRC. A continuación, los sujetos se tratan por adenomas de alto riesgo, CRC y/o un cáncer. Se puede utilizar un gran número de regímenes de tratamiento. Por ejemplo, tales regímenes de tratamiento pueden incluir uno o más de cirugía, quimioterapia, terapia radioterapéutica, tratamientos radioterapéuticos, terapia dirigida o cualquier combinación de los mismos.

a. Tratamiento del cáncer

La quimioterapia implica el uso de uno o más agentes quimioterapéuticos. La expresión "agente quimioterapéutico", como se utiliza en el presente documento, tiene por objeto hacer referencia a cualquier agente quimioterapéutico conocido por los expertos en la materia por ser eficaz para el tratamiento o la mejora del cáncer. Los agentes quimioterapéuticos incluyen, pero sin limitación; moléculas pequeñas; fármacos sintéticos; péptidos; polipéptidos; proteínas; ácidos nucleicos (por ejemplo, nucleótidos de ADN y ARN que incluyen, aunque no de forma limitativa, secuencias de nucleótidos antisentido, triples hélices y secuencias de nucleótidos que codifican proteínas, polipéptidos o péptidos biológicamente activos); anticuerpos; moléculas inorgánicas sintéticas o naturales; agentes miméticos; y moléculas orgánicas sintéticas o naturales. Cualquier agente que sea conocido por ser útil o que se ha utilizado o se está utilizando actualmente para el tratamiento o la mejora del cáncer se puede utilizar junto con un compuesto de vitamina D activo de acuerdo con la divulgación en el presente documento. Véase, por ejemplo, Hardman *et al.*, eds., 1996, Goodman and Gilman's The Pharmacological Basis Of Basis Of Therapeutics, 9ª ed., McGraw-Hill, Nueva York, Nueva York, para información respecto a agentes terapéuticos que se han utilizado o que se utilizan actualmente para el tratamiento o mejora del cáncer.

Los agentes quimioterapéuticos pueden incluir los agentes alquilantes, antimetabolitos, agentes antimitóticos, epipodofilotoxinas, antibióticos, hormonas y antagonistas de hormonas, enzimas, complejos de coordinación de platino, antracénodionas, ureas sustituidas, derivados de metilhidrazina, derivados de imidazotetrazina, agentes citoprotectores, inhibidores de ADN topoisomerasas, modificadores de la respuesta biológica, retinoides, anticuerpos terapéuticos, agentes diferenciadores, agentes inmunomoduladores e inhibidores de la angiogénesis.

Entre los ejemplos de agentes quimioterapéuticos que pueden utilizarse se incluyen aquellos que se han utilizado, se utilizan actualmente o que se conocen por ser útiles para el tratamiento o mejora del CRC. Los agentes preferidos incluyen, pero sin limitación, cisplatino, carboplatino, paclitaxel, docetaxel, etopósido, vincristina, vinblastina, ciclofosfamida, doxorubicina, vinorelbina, topotecán, gemcitabina, irinotecán, gifitinib, ifosfamida, tarceva, oblimersen y TLK286.

Otros agentes quimioterapéuticos que se pueden utilizar incluyen abarelix, aldesleucina, alemtuzumab, alitretinoína, alopurinol, altretamina, amifostina, anastrozol, trióxido de arsénico, asparaginasa, azacitidina, BCG live, bevaceizumab, bexaroteno, bleomicina, bortezomib, busulfán, calusterona, camptotecina, capecitabina, carboplatino, carmustina, celecoxib, cetuximab, clorambucilo, cinacalcet, cisplatino, cladribina, ciclofosfamida, citarabina, dacarbazina, dactinomicina, darbepoyetina alfa, daunorrubicina, denileucina difitox, dexrazoxano, docetaxel, doxorubicina, dromostanolona, solución B de Elliott, epirubicina, epoyetina alfa, estramustina, etopósido, exemestano, filgrastima, floxuridina, fludarabina, fluorouracilo, fulvestrant, gemcitabina, gemtuzumab ozogamicina, gefitinib, goserelina, hidroxiurea, ibritumomab tiuxetan, idarrubicina, ifosfamida, imatinib, interferón alfa-2a, interferón alfa-2b, irinotecán, letrozol, leucovorina, levamisol, lomustina, mecloretamina, megestrol, melfalán, mercaptopurina, mesna, metotrexato, metoxsaleno, metilprednisolona, mitomicina C, mitotano, mitoxantrona, nandrolona, nofetumomab, oblimersen, oprelvekin, oxaliplatino, paclitaxel, pamidronato, pegademasa, pegaspargasa, pegfilgrastim, pemetrexed, pentostatina, pipobromano, plicamicina, polifeprosan, porfímero, procarbazona, quinacrina, rasburicase, rituximab, sargramostim, SN-38, estreptozocina, talco, tamoxifeno, tarceva, temolozomida, tenipósido, testolactona, tioguanina, tiotepa, topotecán, toremifeno, tosimumab, trastuzumab, tretinoína, mostaza de uracilo, valrubicina, vinblastina, vincristina, vinorelbina y zoledronato.

Los agentes quimioterapéuticos incluyen también fármacos antiinflamatorios que se sabe que son útiles para mejorar la inflamación. Los fármacos antiinflamatorios adecuados incluyen, pero sin limitación, salicilatos (tal como aspirina, trisalicilato de colina inagnessio, salicilato de metilo, salsalto y diflunisal), ácidos acéticos (tal como indometacina, sulindaco, tolmetina, aceclofenaco y diclofenaco), ácidos 2-arilpropiónico o profenos (tal como ibuprofeno, ketoprofeno, naproxeno, fenoprofeno, flurbiprofeno y oxaprozina), ácidos N-arilnitrílicos o ácidos fenámicos (tal como ácido mefenámico, ácido flufenámico y meclofenamato), ácidos enólicos u oxicamas (tal como piroxicama y meloxicama), inhibidores de cox (como celecoxib, rofecoxib (retirado del mercado), valdecoxib, parecoxib y etoricoxib), sulfonanilidas, tal como nimesulida; naftilalcanones (tal como nabumetona), ácidos piranocarboxílico (tal como etodolac) y pirroles (tal como ketorolac).

Los agentes quimioterapéuticos pueden incluir adicionalmente agentes inmunomoduladores. Como se utiliza en el presente documento, la expresión "agente inmunomodulador" y variaciones del mismo incluyendo, aunque no de forma limitativa, agentes inmunomoduladores, inmunomoduladores, inmunomoduladores o fármacos inmunomoduladores, se refiere a un agente que modula el sistema inmunitario de un hospedador. En particular, un agente inmunomodulador es un agente que altera la capacidad del sistema inmunitario de un sujeto para responder a uno o más antígenos extraños. En un aspecto, un agente inmunomodulador es un agente que cambia un aspecto de la respuesta inmunitaria de un sujeto, por ejemplo, el agente cambia la respuesta inmunitaria de una respuesta Th1 a una Th2. En otro aspecto, un agente inmunomodulador es un agente que inhibe o reduce el sistema inmunitario de un sujeto (es decir, un agente inmunosupresor). En todavía ciertos aspectos, un agente inmunomodulador es un agente que activa o aumenta el sistema inmunitario de un sujeto (es decir, un agente inmunosupresor).

Los agentes inmunomoduladores que pueden utilizarse incluyen moléculas pequeñas, péptidos, polipéptidos, proteínas, ácidos nucleicos (por ejemplo, nucleótidos de ADN y ARN que incluyen, aunque no de forma limitativa, secuencias de nucleótidos antisentido, triples hélices y secuencias de nucleótidos que codifican proteínas, polipéptidos o péptidos biológicamente activos), anticuerpos, moléculas inorgánicas sintéticas o naturales, agente miméticos y moléculas orgánicas sintéticas o naturales. Un agente inmunomodulador particularmente útil es la talidomida.

Los ejemplos de agentes inmunosupresores que se pueden utilizar en los métodos de la presente divulgación incluyen agonistas del receptor de glucocorticoides (por ejemplo, cortisona, dexametasona, hidrocortisona, betametasona), inhibidores de calcineurina (por ejemplo, macrólidos tales como tacrolimus y pimecrolimus), inmunofilinas (por ejemplo, ciclosporina A) e inhibidores de mTOR (por ejemplo, sirolimus, comercializado como RAPAMUNE® por Wyeth). Entre los agentes inmunoestimuladores útiles para la presente divulgación se incluyen interferón y Zidovudina (AZT).

Los agentes quimioterapéuticos se pueden administrar en dosis que los expertos en la materia reconocen por ser eficaces para el tratamiento del CRC.

La radioterapia implica el uso de uno o más agentes radioterapéuticos. La expresión "agente radioterapéutico", como se utiliza en el presente documento, tiene por objeto hacer referencia a cualquier agente radioterapéutico conocido por los expertos en la materia por ser eficaz para el tratamiento o la mejora del cáncer, sin limitación. Por ejemplo, el agente radioterapéutico puede ser un agente como aquellos que se administran en la terapia con radionúclidos.

La terapia con radionúclidos se puede administrar de acuerdo con cualquier programa, dosis o método conocido por un experto en la materia por ser eficaz en el tratamiento o mejora del cáncer, sin limitación. En general, la terapia con radionúclidos comprende una administración sistémica de un radioisótopo que se acumula o se une preferentemente a la superficie de las células cancerosas. La acumulación preferencial del radionúclido puede estar mediada por numerosos mecanismos, incluyendo, aunque no de forma limitativa, la incorporación del radionúclido en células que proliferan rápidamente, una acumulación específica del radionúclido por el tejido canceroso sin un

direccionamiento especial o una conjugación del radionúclido hacia una biomolécula específica para una neoplasia.

Entre los radioisótopos representativos que se pueden administrar en terapia de radionúclidos se incluyen, pero sin limitación, fósforo 32, itrio 90, disprosio 165, indio 111, estroncio 89, samario 153, renio 186, yodo 131, yodo 125, lutecio 177 y bismuto 213. Si bien todos estos radioisótopos pueden unirse a una biomolécula que proporciona especificidad de direccionamiento, pueden administrarse yodo 131, indio 111, fósforo 32, samario 153 y renio 186, sistémicamente sin tal conjugación. Un experto en la materia puede seleccionar una biomolécula específica para utilizar en la actuación sobre un neoplasma particular para la terapia con radionúclidos basándose en las moléculas de superficie celular presentes en ese neoplasma. Se revisan ejemplos de biomoléculas que proporcionan especificidad para una célula particular en Thomas, Cancer Biother. Radiopharm. 17:71-82 (2002), que se incorpora al presente documento por referencia en su totalidad. Asimismo, los métodos de administración y las composiciones útiles para la terapia con radionúclidos pueden encontrarse en las patentes de Estados Unidos n.º 6.426.400, 6.358.194, 5.766.571 y 5.563.250, cada una de las cuales se incorpora en el presente documento por referencia en su totalidad.

"Tratamiento radioterapéutico", como se utiliza en el presente documento, tiene por objeto hacer referencia a cualquier tratamiento radioterapéutico conocido por un experto en la materia por ser eficaz para tratar o mejorar el cáncer, sin limitación. Por ejemplo, el tratamiento radioterapéutico puede ser radioterapia de haz externo, termoterapia, radiocirugía, radioterapia de partículas cargadas, radioterapia de neutrones o terapia fotodinámica.

La radioterapia de haz externo se puede administrar de acuerdo con cualquier programa, dosis o método conocido por un experto en la materia por ser eficaz en el tratamiento o mejora del cáncer, sin limitación. En general, la radioterapia de haz externo comprende irradiar un volumen definido dentro de un sujeto con un haz de alta energía, provocando de este modo la muerte de células dentro de ese volumen. El volumen irradiado contiene preferiblemente todo el cáncer a tratar y preferiblemente contiene la menor cantidad posible de tejido sano. Los métodos de administración y los aparatos y composiciones útiles para la radioterapia de haz externo se pueden encontrar en las patentes de Estados Unidos n.º 6.449.336, 6.398.710, 6.393.096, 6.335.961, 6.307.914, 6.256.591, 6.245.005, 6.038.283, 6.001.054, 5.802.136, 5.596.619 y 5.528.652, cada una de las cuales se incorpora en el presente documento por referencia en su totalidad.

La termoterapia se puede administrar de acuerdo con cualquier programa, dosis o método conocido por un experto en la materia por ser eficaz en el tratamiento o mejora del cáncer, sin limitación. En determinadas realizaciones, la termoterapia puede ser una terapia de crioblación. En otras realizaciones, la termoterapia puede ser una terapia hipertérmica. En todavía otras realizaciones, la termoterapia puede ser una terapia que eleva la temperatura del tumor más que en la terapia hipertérmica.

La terapia de crioblación implica la congelación de una masa neoplásica, lo que conduce al depósito de cristales de hielo intra y extracelulares; disrupción de membranas celulares, proteínas y orgánulos; e inducción de un entorno hiperosmótico, provocando así la muerte celular. Los métodos y aparatos útiles en la terapia de crioblación se describen en Murphy *et al.*, Sem. Urol. Oncol. 19: 133-140 (2001) y en las Patentes de Estados Unidos N° 6.383.181, 6.383.180, 5.993.444, 5.654.279, 5.437.673 y 5.147.355, cada una de las cuales se incorpora en el presente documento por referencia en su totalidad.

La terapia hipertérmica implica típicamente elevar la temperatura de una masa neoplásica a un intervalo de aproximadamente 42 ° C a aproximadamente 44 ° C. La temperatura del cáncer puede elevarse adicionalmente por encima de este intervalo; sin embargo, tales temperaturas pueden aumentar la lesión del tejido sano circundante sin causar un aumento de la muerte celular dentro del tumor a tratar. El tumor se puede calentar en terapia hipertérmica por cualquier medio conocido por un experto en la materia sin limitación. Por ejemplo y no a modo de limitación, el tumor se puede calentar mediante microondas, ultrasonido focalizado de alta intensidad, termosemillas ferromagnéticas, campos de corriente localizados, radiación infrarroja, ablación por radiofrecuencia húmeda o seca, fotocoagulación con láser, terapia térmica intersticial con láser y electrocauterización. Las microondas y las ondas de radio se pueden generar mediante aplicadores de guía de ondas, bocina, espiral, hoja de corriente y aplicadores compactos.

Otros métodos y aparatos y composiciones para elevar la temperatura de un tumor se revisan en un artículo de Wust *et al.*, Lancet Oncol. 3: 487-97 (2002) y se describe en las patentes de Estados Unidos N° 6.470.217, 6.379.347, 6.165.440, 6.163.726, 6.099.554, 6.009.351, 5.776.175, 5.707.401, 5.658.234, 5.620.479, 5.549.639 y 5.523.058, cada una de las cuales se incorpora en el presente documento por referencia en su totalidad.

La radiocirugía se puede administrar de acuerdo con cualquier programa, dosis o método conocido por un experto en la materia por ser eficaz en el tratamiento o mejora del cáncer, sin limitación. En general, la radiocirugía comprende exponer un volumen definido dentro de un sujeto a una fuente radiactiva dirigida manualmente, provocando de este modo la muerte de células dentro de ese volumen. El volumen irradiado contiene preferiblemente todo el cáncer a tratar y preferiblemente contiene la menor cantidad posible de tejido sano. Típicamente, el tejido que se va a tratar se expone primero utilizando técnicas quirúrgicas convencionales, a continuación, un cirujano dirige manualmente la fuente radiactiva a esa zona. Como alternativa, la fuente radiactiva

se puede colocar cerca del tejido a irradiar utilizando, por ejemplo, un laparoscopio. Los métodos y aparatos útiles para radiocirugía se describen adicionalmente en Valentini *et al.*, Eur. J. Surg. Oncol. Oncol. 28: 180-185 (2002) y en las patentes de Estados Unidos N° 6.421.416, 6.248.056 y 5.547.454, cada una de las cuales se incorpora en el presente documento por referencia en su totalidad.

La radioterapia de partículas cargadas se puede administrar de acuerdo con cualquier programa, dosis o método conocido por un experto en la materia por ser eficaz en el tratamiento o mejora del cáncer, sin limitación. En determinadas realizaciones, la radioterapia de partículas cargadas puede ser una radioterapia con haz de protones. En otras realizaciones, la radioterapia de partículas cargadas puede ser una radioterapia con iones de helio. En general, la radioterapia de partículas cargadas comprende irradiar un volumen definido dentro de un sujeto con un haz de partículas cargadas, provocando de este modo la muerte celular dentro de ese volumen. El volumen irradiado contiene preferiblemente todo el cáncer a tratar y preferiblemente contiene la menor cantidad posible de tejido sano. Un método para administrar radioterapia con partículas cargadas se describe en la patente de Estados Unidos n.º 5.668.371, que se incorpora en el presente documento por referencia en su totalidad.

La radioterapia de neutrones se puede administrar de acuerdo con cualquier programa, dosis o método conocido por un experto en la materia por ser eficaz en el tratamiento o mejora del cáncer, sin limitación. En determinadas realizaciones, la radioterapia de neutrones puede ser una terapia de captura de neutrones. En tales realizaciones, se administra a un sujeto un compuesto que emite radiación cuando se bombardea con neutrones y se acumula preferentemente en una masa neoplásica. Posteriormente, el tumor se irradia con un haz de neutrones de baja energía, activando el compuesto y provocando que emita productos de desintegración que matan las células cancerosas. Se puede provocar que el compuesto a activar se acumule preferentemente en el tejido diana de acuerdo con cualquiera de los métodos útiles para el direccionamiento de radionúclidos, como se describe anteriormente o en los métodos descritos en Laramore, Semin. Oncol. 24: 672-685 (1997) y en las patentes de Estados Unidos N° 6.400.796, 5.877.165, 5.872.107 y 5.653.957, cada una de las cuales se incorpora en el presente documento por referencia en su totalidad.

En otras realizaciones, la radioterapia de neutrones puede ser una radioterapia de neutrones rápidos. En general, la radioterapia de neutrones rápidos comprende irradiar un volumen definido dentro de un sujeto con un haz de neutrones, provocando de este modo la muerte celular dentro de ese volumen.

La terapia fotodinámica se puede administrar de acuerdo con cualquier programa, dosis o método conocido por un experto en la materia por ser eficaz en el tratamiento o mejora del cáncer, sin limitación. En general, la terapia fotodinámica comprende administrar un agente fotosensibilizante que se acumula preferentemente en una masa neoplásica y sensibiliza el neoplasma a la luz, exponiendo a continuación el tumor a la luz de una longitud de onda apropiada. Tras tal exposición, el agente fotosensibilizante cataliza la producción de un agente citotóxico, tal como, por ejemplo, oxígeno singlete, que mata las células cancerosas. Los métodos de administración y los aparatos y composiciones útiles para la terapia fotodinámica se describen en Hopper, Lancet Oncol. 1: 212-219 (2000) y en las Patentes de Estados Unidos N° 6.283.957, 6.071.908, 6.011.563, 5.855.595, 5.716.595 y 5.707.401, cada una de las cuales se incorpora en el presente documento por referencia en su totalidad.

La radioterapia se puede administrar para destruir las células tumorales antes o después de la cirugía, antes o después de la quimioterapia y a veces, durante la quimioterapia. La radioterapia también se puede administrar por razones paliativas para aliviar los síntomas del cáncer, por ejemplo, para disminuir el dolor. Entre los tipos de tumores que pueden tratarse con radioterapia están los tumores localizados que no se pueden extirpar completamente y las metástasis y los tumores cuya extirpación completa causaría defectos funcionales o cosméticos inaceptables o que están asociados con riesgos quirúrgicos inaceptables.

Se apreciará que tanto la dosis de radiación particular a utilizar en el tratamiento del CRC como el método de administración dependerán de diversos factores. Por tanto, las dosificaciones de radiación que se pueden utilizar de acuerdo con los métodos de la presente divulgación están determinadas por los requisitos particulares de cada situación. La dosificación dependerá de factores tales como el tamaño del tumor, la localización del tumor, la edad y el sexo del paciente, la frecuencia de la dosificación, la presencia de otros tumores, posibles metástasis y similares. Los expertos en la técnica de la radioterapia pueden determinar fácilmente la dosificación y el método de administración para cualquier tumor particular en referencia a Hall, E. J., Radiobiology for the Radiobiologist, 5ª edición, Lippincott Williams and Wilkins Publishers, Filadelfia, Pensilvania, 2000; Gunderson, L. L. y Tepper J. E., eds., Clinical Radiation Oncology, Churchill Livingstone, Londres, Inglaterra, 2000; y Grosch, D. S., Biological Effects of Radiation, 2ª Edición, Academic Press, San Francisco, California, 1980, cada una de las cuales se incorpora al presente documento por referencia.

b. Tratamiento del CRC

Para el tratamiento del CRC, la resección quirúrgica da como resultado una cura para alrededor el 50% de los pacientes. Los métodos quirúrgicos para el cáncer colorrectal incluyen cirugía de colon, que incluye la colectomía abierta (también conocida como hemicolectomía, colectomía parcial o resección segmentaria), colectomía asistida por laparoscopia y polipsectomía y escisión local y cirugía rectal, que incluye polipsectomía y escisión local, resección

transanal local (resección de espesor total), microcirugía endoscópica transanal (TEM; del inglés, transanal endoscopic microsurgery), resección anterior baja, proctectomía con anastomosis coloanal, resección abdominoperineal (RAP; en inglés, APR) y exenteración pélvica. Otros tratamientos incluyen ablación por radiofrecuencia, ablación con etanol (alcohol) (también conocido como inyección percutánea de etanol (IPE; en inglés, PEI)), criocirugía (crioterapia) y embolización de la arteria hepática.

La quimioterapia y la irradiación se pueden utilizar tanto preoperatoriamente (neoadyuvante) como posoperatoriamente (adyuvante) en el tratamiento del CRC. Los agentes quimioterapéuticos, particularmente el 5-fluorouracilo (5-FU), son armas poderosas en el tratamiento del CRC. Otros agentes incluyen oxaliplatino (Eloxatin®), irinotecán (Camptosar®), leucovorina, capecitabina (Xeloda®), bevacizumab (Avastin®), cetuximab (Erbix®) y panitumumab (Vectibix®). Estos fármacos se combinan con frecuencia. Las combinaciones comunes son FOLFOX (5-FU, leucovorina, oxaliplatino); FOLFIRI (5-FU, leucovorina, irinotecán); y FOLFOXIRI (5-FU, leucovorina, irinotecán, oxaliplatino). El bevacizumab es un tratamiento dirigido, específicamente un anticuerpo monoclonal que se une al factor de crecimiento endotelial vascular (VEGF; del inglés, vascular endothelial growth factor) para prevenir la formación de vasos sanguíneos alrededor del tumor. Cetuximab y panitumumab son anticuerpos monoclonales que se dirigen al receptor del factor de crecimiento epidérmico (EGFR; del inglés, epidermal growth factor receptor).

19. Inmunoensayos para medir marcadores

Los métodos descritos anteriormente cuantifican los niveles de la siguiente combinación de marcadores seleccionados del grupo que consiste en AFP, CEA, ferritina, CYFRA, CA19-9, TIMP-1, Gal3 y/o CRP. Los biomarcadores, es decir, AFP, CEA, ferritina, CYFRA, CA19-9, TIMP-1, Gal3 y/o CRP, pueden analizarse utilizando los métodos descritos anteriormente utilizando el inmunoensayo. La presencia o cantidad de marcador se puede determinar utilizando anticuerpos que se unen específicamente a cada marcador (en concreto, AFP, CEA, ferritina, CYFRA, CA19-9, TIMP-1, Gal3 y/o CRP, así como cualquier analito adicional si tales analitos adicionales se utilizan). Los ejemplos de anticuerpos que se pueden utilizar incluyen un anticuerpo policlonal, un anticuerpo monoclonal, un anticuerpo humano, una molécula de inmunoglobulina, un Fv ligado por disulfuro, un anticuerpo monoclonal, uno madurado por afinidad, un scFv, un anticuerpo quimérico, un anticuerpo de un solo dominio, un anticuerpo con CDR injertadas, un diacuerpo, un anticuerpo humanizado, un anticuerpo multiespecífico, un Fab, un anticuerpo dual específico, un DVD, un Fab', un anticuerpo biespecífico, un F(ab')₂, un Fv y combinaciones de los mismos. Por ejemplo, el método inmunológico puede incluir (a) medir los niveles de AFP mediante: (i) poner en contacto la muestra de prueba con al menos un anticuerpo de captura, en donde el anticuerpo de captura se une a un epítipo sobre AFP o un fragmento de AFP para formar un complejo de anticuerpo de captura-antígeno de AFP; (ii) poner en contacto el complejo de anticuerpo de captura-antígeno de AFP con al menos un anticuerpo de detección que comprende un marcador detectable, en donde el anticuerpo de detección se une a un epítipo sobre AFP al que no se une el anticuerpo de captura y forma un complejo de anticuerpo de captura-antígeno de AFP-anticuerpo de detección; y (iii) determinar los niveles de AFP en la muestra de prueba basándose en la señal generada por el marcador detectable en el complejo de anticuerpo de captura-antígeno de AFP-anticuerpo de detección formado en (a)(ii); (b) medir los niveles de CEA mediante: (i) poner en contacto la muestra de prueba con al menos un anticuerpo de captura, en donde el anticuerpo de captura se une a un epítipo sobre CEA o un fragmento de CEA para formar un complejo de anticuerpo de captura-antígeno de CEA; (ii) poner en contacto el complejo de anticuerpo de captura-antígeno de CEA con al menos un anticuerpo de detección que comprende un marcador detectable, en donde el anticuerpo de detección se une a un epítipo sobre CEA al que no se une el anticuerpo de captura y forma un complejo de anticuerpo de captura-antígeno de CEA-anticuerpo de detección; y (iii) determinar los niveles de CEA en la muestra de prueba basándose en la señal generada por el marcador detectable en el complejo de anticuerpo de captura-antígeno de CEA-anticuerpo de detección formado en (b)(ii); (c) medir los niveles de ferritina mediante: (i) poner en contacto la muestra de prueba con al menos un anticuerpo de captura, en donde el anticuerpo de captura se une a un epítipo sobre ferritina o un fragmento de ferritina para formar un complejo de anticuerpo de captura-antígeno de ferritina; (ii) poner en contacto el complejo de anticuerpo de captura-antígeno de ferritina con al menos un anticuerpo de detección que comprende un marcador detectable, en donde el anticuerpo de detección se une a un epítipo sobre ferritina al que no se une el anticuerpo de captura y forma un complejo de anticuerpo de captura-antígeno de ferritina-anticuerpo de detección; y (iii) determinar los niveles de ferritina en la muestra de prueba basándose en la señal generada por el marcador detectable en el complejo de anticuerpo de captura-antígeno de ferritina-anticuerpo de detección formado en (c)(ii); (d) medir los niveles de CYFRA mediante: (i) poner en contacto la muestra de prueba con al menos un anticuerpo de captura, en donde el anticuerpo de captura se une a un epítipo sobre CYFRA o un fragmento de CYFRA para formar un complejo de anticuerpo de captura-antígeno de CYFRA; (ii) poner en contacto el complejo de anticuerpo de captura-antígeno de CYFRA con al menos un anticuerpo de detección que comprende un marcador detectable, en donde el anticuerpo de detección se une a un epítipo sobre CYFRA al que no se une el anticuerpo de captura y forma un complejo de anticuerpo de captura-antígeno de CYFRA-anticuerpo de detección; y (iii) determinar los niveles de CYFRA en la muestra de prueba basándose en la señal generada por el marcador detectable en el complejo de anticuerpo de captura-antígeno de CYFRA-anticuerpo de detección formado en (d)(ii); (e) medir los niveles de CA19-9 mediante: (i) poner en contacto la muestra de prueba con al menos un anticuerpo de captura, en donde el anticuerpo de captura se une a un epítipo sobre CA19-9 o un fragmento de CA19-9 para formar un complejo de anticuerpo de captura-antígeno de CA19-9; (ii) poner en contacto el complejo de anticuerpo de captura-antígeno de CA19-9 con al menos un anticuerpo de detección que

comprende un marcador detectable, en donde el anticuerpo de detección se une a un epítipo sobre CA19-9 al que no se une el anticuerpo de captura y forma un complejo de anticuerpo de captura-antígeno de CA19-9-anticuerpo de detección; y (iii) determinar los niveles de CA19-9 en la muestra de prueba basándose en la señal generada por el marcador detectable en el complejo de anticuerpo de captura-antígeno de CA19-9-anticuerpo de detección formado en (e)(ii); (f) medir los niveles de TIMP-1 mediante: (i) poner en contacto la muestra de prueba con al menos un anticuerpo de captura, en donde el anticuerpo de captura se une a un epítipo sobre TIMP-1 o un fragmento de TIMP-1 para formar un complejo de anticuerpo de captura-antígeno de TIMP-1; (ii) poner en contacto el complejo de anticuerpo de captura-antígeno de TIMP-1 con al menos un anticuerpo de detección que comprende un marcador detectable, en donde el anticuerpo de detección se une a un epítipo sobre TIMP-1 al que no se une el anticuerpo de captura y forma un complejo de anticuerpo de captura-antígeno de TIMP-1-anticuerpo de detección; y (iii) determinar los niveles de TIMP-1 en la muestra de prueba basándose en la señal generada por el marcador detectable en el complejo de anticuerpo de captura-antígeno de TIMP-1-anticuerpo de detección formado en (f)(ii); (g) medir los niveles de GAL3 mediante: (i) poner en contacto la muestra de prueba con al menos un anticuerpo de captura, en donde el anticuerpo de captura se une a un epítipo sobre GAL3 o un fragmento de GAL3 para formar un complejo de anticuerpo de captura-antígeno de GAL3; (ii) poner en contacto el complejo de anticuerpo de captura-antígeno de GAL3 con al menos un anticuerpo de detección que comprende un marcador detectable, en donde el anticuerpo de detección se une a un epítipo sobre GAL3 al que no se une el anticuerpo de captura y forma un complejo de anticuerpo de captura-antígeno de GAL3-anticuerpo de detección; y (iii) determinar los niveles de GAL3 en la muestra de prueba basándose en la señal generada por el marcador detectable en el complejo de anticuerpo de captura-antígeno de GAL3-anticuerpo de detección formado en (g)(ii); y/o (h) medir los niveles de CRP mediante: (i) poner en contacto la muestra de prueba con al menos un anticuerpo de captura, en donde el anticuerpo de captura se une a un epítipo sobre CRP o un fragmento de CRP para formar un complejo de anticuerpo de captura-antígeno de CRP; (ii) poner en contacto el complejo de anticuerpo de captura-antígeno de CRP con al menos un anticuerpo de detección que comprende un marcador detectable, en donde el anticuerpo de detección se une a un epítipo sobre CRP al que no se une el anticuerpo de captura y forma un complejo de anticuerpo de captura-antígeno de CRP-anticuerpo de detección; y (iii) determinar los niveles de CRP en la muestra de prueba basándose en la señal generada por el marcador detectable en el complejo de anticuerpo de captura-antígeno de CRP-anticuerpo de detección formado en (h)(ii); o combinaciones de los mismos.

Se puede utilizar cualquier inmunoensayo. El inmunoensayo puede ser un inmunoensayo ligado a enzimas (ELISA), radioinmunoensayo (RIA), un ensayo de inhibición competitiva, tal como los ensayos de inhibición competitiva directa o inversa, un ensayo de polarización de fluorescencia o un ensayo de unión competitiva, por ejemplo. El ELISA puede ser un ELISA de tipo sándwich. La unión inmunológica específica del anticuerpo al marcador puede detectarse a través de marcadores directos, tales como etiquetas fluorescentes o luminiscentes, metales y radionúclidos unidos al anticuerpo o a través de marcadores indirectos, tales como fosfatasa alcalina o peroxidasa de rábano picante.

Puede incorporarse en el inmunoensayo el uso de anticuerpos o fragmentos de los mismos inmovilizados. Los anticuerpos pueden inmovilizarse sobre una variedad de soportes, tales como partículas magnéticas o cromatográficas, la superficie de una placa de ensayo (tal como pocillos de microtitulación), trozos de un material de sustrato sólido y similares. Puede prepararse una tira de ensayo recubriendo el anticuerpo o una pluralidad de anticuerpos en una matriz sobre un soporte sólido. A continuación, puede empaparse esta tira en la muestra biológica de ensayo y procesarse rápidamente mediante lavados y etapas de detección para generar una señal medible, tal como un punto coloreado.

El ELISA de tipo sándwich mide la cantidad de antígeno entre dos capas de anticuerpos (es decir, un anticuerpo de captura y un anticuerpo de detección (que puede estar marcado con un marcador detectable)). El marcador, es decir, AFP, CEA, ferritina, CYFRA, CA19-9, TIMP-1, Gal3 y/o CRP, que se va a medir puede contener al menos dos sitios antigénicos capaces de unirse al anticuerpo. Pueden utilizarse anticuerpos monoclonales o policlonales como anticuerpos de captura y de detección en el ELISA de tipo sándwich.

Habitualmente, se emplean al menos dos anticuerpos para separar y cuantificar el marcador, es decir, AFP, CEA, ferritina, CYFRA, CA19-9, TIMP-1, Gal3 y/o CRP (así como cualesquiera analitos adicionales), en una prueba o muestra biológica. Más específicamente, los al menos dos anticuerpos se unen a ciertos epítipos del marcador formando un complejo inmunitario que se denomina un "sándwich". Se pueden utilizar uno o más anticuerpos para capturar el marcador en la muestra de prueba (frecuentemente se hace referencia a estos anticuerpos como un anticuerpo de "captura" o anticuerpos de "captura") y uno o más anticuerpos se utilizan para unir un marcador detectable (en concreto, cuantificable) al sándwich (frecuentemente se hace referencia a estos anticuerpos como de "detección" o anticuerpos de "detección"). En un ensayo de tipo sándwich, la unión de ambos anticuerpos a su epítipo no puede disminuir por la unión de cualquier otro anticuerpo en el ensayo a su epítipo respectivo. En otras palabras, los anticuerpos pueden seleccionarse de modo que dichos uno o más anticuerpos primeros puestos en contacto con una muestra de prueba que se sospecha que contiene el marcador no se unen a todo o parte de un epítipo reconocido por el segundo anticuerpo o posteriores, interfiriendo así con la capacidad de uno o más anticuerpos segundos de detección para unirse al marcador.

En una realización preferida, una prueba o muestra biológica sospechosa de contener el marcador, es decir, AFP,

CEA, ferritina, CYFRA, CA19-9, TIMP-1, Gal3 y/o CRP, puede ponerse en contacto con al menos un primer anticuerpo de captura (o anticuerpos) y al menos un segundo anticuerpo de detección, simultánea o secuencialmente. En el formato de ensayo de tipo sándwich, una muestra de prueba que se sospecha que contiene el marcador se pone primero en contacto con el al menos un primer anticuerpo de captura que se une específicamente a un epítipo particular en condiciones que permiten la formación de un primer complejo anticuerpo-marcador. Si se utiliza más de un anticuerpo de captura, se forma un primer complejo anticuerpo-marcador de captura múltiple. En un ensayo de tipo sándwich, los anticuerpos, preferentemente, el al menos un anticuerpo de captura, se utilizan en cantidades molares en exceso de la cantidad máxima de marcador esperada en la muestra de prueba.

Opcionalmente, antes de poner en contacto la muestra de ensayo con el al menos un primer anticuerpo de captura, el al menos un primer anticuerpo de captura puede unirse a un soporte sólido, lo que facilita la separación del primer complejo de anticuerpo-marcador de la muestra de ensayo. Puede utilizarse cualquier soporte sólido conocido en la técnica, incluyendo, pero sin limitarse a, soportes sólidos hechos de materiales poliméricos en forma de pocillos, tubos o perlas. El anticuerpo (o los anticuerpos) puede unirse al soporte sólido mediante adsorción, mediante unión covalente usando un agente de acoplamiento químico o mediante otros medios conocidos en la técnica, dado que tal unión no interfiere con la capacidad del anticuerpo para unirse al marcador. Por otra parte, si es necesario, el soporte sólido puede derivatizarse para permitir la reactividad con diversos grupos funcionales sobre el anticuerpo. Dicha derivatización requiere del uso de ciertos agentes de acoplamiento tales como, aunque no de forma limitativa, anhídrido maleico, N-hidroxisuccinimida y 1-etil-3-(3-dimetilaminopropil)carbodiimida.

Después de que la muestra de prueba que se sospecha que contiene el marcador se pone en contacto con al menos un primer anticuerpo de captura, la muestra de prueba se incuba para permitir la formación de un primer complejo de anticuerpo de captura (o anticuerpo múltiple)-marcador. La incubación puede llevarse a cabo a un pH de aproximadamente 4,5 a aproximadamente 10,0, a una temperatura de aproximadamente 2 °C a aproximadamente 45 °C y durante un periodo de al menos un (1) minuto a dieciocho (18) horas, de aproximadamente 2-6 minutos o de aproximadamente 3-4 minutos.

Después de la formación del complejo de primer/múltiple anticuerpo de captura-marcador, se pone en contacto a continuación el complejo con al menos un segundo anticuerpo de detección (en condiciones que permiten la formación de un complejo de primer/múltiple anticuerpo-marcador segundo anticuerpo). Si el complejo primer anticuerpo-marcador se pone en contacto con más de un anticuerpo de detección, a continuación se forma un complejo de primer/múltiple anticuerpo-marcador-anticuerpo múltiple. Como con el primer anticuerpo, cuando se pone en contacto el al menos segundo (y posterior) anticuerpo con el complejo de primer anticuerpo-marcador, se necesita un periodo de incubación en condiciones similares a aquellas descritas anteriormente para la formación del complejo de primer/múltiple anticuerpo-marcador-segundo/múltiple anticuerpo. Preferentemente, al menos un segundo anticuerpo contiene un marcador detectable. El marcador detectable puede unirse al menos un segundo anticuerpos antes de, simultáneamente con o tras la formación del complejo de primer/múltiple anticuerpo-marcador-segundo/múltiple anticuerpo. Puede utilizarse cualquier marcador detectable conocido en la técnica.

20. Kits para realizar los métodos

En el presente documento se proporciona un kit, que puede utilizarse para realizar los métodos descritos anteriormente. El kit puede proporcionar (1) reactivos capaces de unirse específicamente a cada uno de los marcadores AFP, CEA, ferritina, CYFRA, CA19-9, TIMP-1, Gal3 y/o CRP, para cuantificar los niveles de los marcadores, AFP, CEA, ferritina, CYFRA, CA19-9, TIMP-1, Gal3 y/o CRP, en una muestra biológica aislada de un sujeto y (2) un estándar de referencia que indique los niveles de referencia de cada uno de los marcadores AFP, CEA, ferritina, CYFRA, CA19-9, TIMP-1, Gal3 y/o CRP, en donde al menos un reactivo comprende al menos un anticuerpo capaz de unirse específicamente al marcador apropiado. El kit puede comprender un reactivo que es capaz de unirse específicamente a AFP, un reactivo que es capaz de unirse específicamente a CEA, un reactivo que es capaz de unirse específicamente a ferritina, un reactivo que es capaz de unirse específicamente a CYFRA, un reactivo que es capaz de unirse específicamente a CA19-9, un reactivo que es capaz de unirse específicamente a TIMP-1, un reactivo que es capaz de unirse específicamente a Gal3 y/o un reactivo que es capaz de unirse específicamente a CRP, para cuantificar la concentración de cada biomarcador en la muestra biológica y un estándar de referencia indicando el nivel de referencia de cada uno de los biomarcadores en la muestra biológica (es decir, AFP, CEA, ferritina, CYFRA, CA19-9, TIMP-1, Gal3 y/o CRP). El kit puede comprender adicionalmente al menos un reactivo capaz de unirse específicamente (es decir, un anticuerpo) al menos un biomarcador adicional de mS9, HbA1c, C3a, Cat X, suPAR(l), PAI-1 y / o ENO2 o cualquier combinación de los mismos y un estándar de referencia que indica un nivel de referencia del al menos un biomarcador adicional de CRC, si está presente.

El kit puede comprender los anticuerpos y un medio para administrar los anticuerpos. El kit puede comprender adicionalmente instrucciones para utilizar el kit y realizar el análisis, la vigilancia o el tratamiento.

El kit puede comprender también uno o más envases, tales como viales o botellas, con cada envase conteniendo un reactivo separado. El kit puede incluir adicionalmente instrucciones escritas, que pueden describir cómo realizar o interpretar un análisis, vigilancia, tratamiento o método descrito en el presente documento.

Por ejemplo, el kit puede comprender instrucciones para analizar la muestra de prueba para AFP, CEA, ferritina, CYFRA, CA19-9, TIMP-1, Gal3 y/o CRP o mediante inmunoensayo, por ejemplo, inmunoensayo de micropartículas quimioluminiscentes. Las instrucciones pueden estar en papel o en formato legible por ordenador, tal como un disco, CD, DVD o similar. El anticuerpo puede ser un anticuerpo de captura de AFP, CEA, ferritina, CYFRA, CA19-9, TIMP-1, Gal3 y/o CRP o anticuerpo de detección de AFP, CEA, ferritina, CYFRA, CA19-9, TIMP-1, Gal3 y/o CRP (es decir, un anticuerpo marcado con un marcador detectable). Por ejemplo, el kit puede contener al menos un anticuerpo de captura que se une específicamente a AFP, al menos un anticuerpo que se une específicamente a CEA, al menos un anticuerpo que se une específicamente a ferritina, al menos un anticuerpo que se une específicamente a CYFRA, al menos un anticuerpo que se une específicamente a CA19-9, al menos un anticuerpo que se une específicamente a TIMP-1, al menos un anticuerpo que se une específicamente a Gal3 y/o al menos un anticuerpo que se une específicamente a CRP. El kit también puede contener un anticuerpo conjugado (tal como un anticuerpo marcado con un marcador detectable) para cada anticuerpo de captura (en concreto, un anticuerpo conjugado para cada uno de los anticuerpos de captura que se unen específicamente a AFP, CEA, ferritina, CYFRA, CA19-9, TIMP-1, Gal3 y/o CRP, respectivamente). Como alternativa o adicionalmente, el kit puede contener un calibrador o control, por ejemplo, purificada y opcionalmente liofilizada, (por ejemplo, AFP, CEA, ferritina, CYFRA, CA19-9, TIMP-1, Gal3 y/o CRP), y/o al menos un envase (por ejemplo, tubo, placas o tiras de microtitulación, que pueden estar ya recubiertos con un anticuerpo monoclonal anti-AFP, CEA, ferritina, CYFRA, CA19-9, TIMP-1, Gal3 y/o CRP) para llevar a cabo el ensayo y/o un tampón, tal como un tampón de ensayo o un tampón de lavado, cualquiera de los cuales puede proporcionarse como una solución concentrada, una solución de sustrato para el marcador detectable (por ejemplo, un marcador enzimático) o una solución de detención. Preferentemente, el kit comprende todos los componentes, es decir, reactivos, estándares, tampones, diluyentes, etc., que son necesarios para realizar el ensayo. Las instrucciones también pueden incluir instrucciones para generar una curva estándar o un patrón de referencia con el fin de cuantificar el anticuerpo AFP, CEA, ferritina, CYFRA, CA19-9, TIMP-1, Gal3 y/o CRP.

Como se mencionó anteriormente, cualesquier anticuerpos, que se proporcionan en el kit, tal como anticuerpos recombinantes específicos para AFP, CEA, ferritina, CYFRA, CA19-9, TIMP-1, Gal3 y/o CRP, pueden incorporar un marcador detectable, tal como un fluoróforo, fracción radiactiva, enzima, marcador de biotina/avidina, cromóforo, marcador quimioluminiscente o similares o el kit puede incluir reactivos para marcar los anticuerpos o reactivos para detectar los anticuerpos (por ejemplo, anticuerpos de detección) y/o para marcar los analitos o reactivos para detectar el analito. Los anticuerpos, calibradores y/o controles pueden proporcionarse en envases separados o dispensados previamente en un formato de ensayo apropiado, por ejemplo, en placas de microtitulación.

Opcionalmente, el kit incluye componentes de control de calidad (por ejemplo, paneles de sensibilidad, calibradores y controles positivos). La preparación de reactivos de control de calidad es bien conocida en la técnica y se describe en hojas de inserción para una diversidad de productos de inmunodiagnóstico. Los miembros del panel de sensibilidad se utilizan opcionalmente para establecer las características de rendimiento del ensayo y de forma adicional opcionalmente son indicadores útiles de la integridad de los reactivos del kit de inmunoensayo y la estandarización de los ensayos.

El kit también puede incluir opcionalmente otros reactivos necesarios para realizar un ensayo de diagnóstico o facilitar evaluaciones de control de calidad, tales como tampones, sales, enzimas, cofactores de enzimas, sustratos, reactivos de detección y similares. Otros componentes, tales como tampones y soluciones para el aislamiento y/o tratamiento de una muestra de prueba (por ejemplo, reactivos de pretratamiento), se pueden incluir también en el kit. El kit puede incluir adicionalmente uno o más controles diferentes. Uno o más de los componentes del kit pueden liofilizarse, en cuyo caso el kit puede comprender adicionalmente reactivos adecuados para la reconstitución de los componentes liofilizados.

Los diversos componentes del kit se proporcionan opcionalmente en envases adecuados según sea necesario, por ejemplo, una placa de microtitulación. El kit puede incluir además envases para contener o almacenar una muestra (por ejemplo, un envase o cartucho para una muestra de orina). Cuando sea apropiado, el kit opcionalmente también puede contener recipientes de reacción, recipientes de mezcla y otros componentes que facilitan la preparación de reactivos o la muestra de prueba. El kit también puede incluir uno o más instrumentos para ayudar a obtener una muestra de prueba, tales como una jeringuilla, pipeta, fórceps, cuchara medidora o similares.

Si el marcador detectable es al menos un compuesto de acridinio, el kit puede comprender al menos una acridinio-9-carboxamida, al menos un éster arílico de acridinio-9-carboxilato o cualquier combinación de los mismos. Si el marcador detectable es al menos un compuesto de acridinio, el kit también puede comprender una fuente de peróxido de hidrógeno, tal como un tampón, solución y/o al menos una solución básica.

Si se desea, el kit puede contener una fase sólida, tales como una partícula magnética, perla, tubo de ensayo, placa de microtitulación, cubeta, membrana, molécula de andamio, película, papel de filtro, un cristal de cuarzo, disco o chip. El kit puede incluir también un marcador detectable que puede estar o está conjugado con un anticuerpo, tal como un anticuerpo que funciona como un anticuerpo de detección. El marcador detectable puede ser, por ejemplo, un marcador directo, que puede ser una enzima, oligonucleótido, nanopartícula, quimioluminóforo, fluoróforo, desactivador de fluorescencia, desactivador de quimioluminiscencia o biotina. Los kits pueden incluir opcionalmente

cualesquiera reactivos adicionales necesarios para detectar el marcador.

Si se desea, el kit puede comprender además uno o más componentes, solos o en combinación adicional con instrucciones, para ensayar la muestra de ensayo para otro analito, que puede ser un biomarcador, tal como un biomarcador de cáncer. Los ejemplos de analitos incluyen, pero sin limitación, a AFP, CEA, ferritina, CYFRA, CA19-9, TIMP-1, Gal3 y/o CRP o fragmentos de AFP, CEA, ferritina, CYFRA, CA19-9, TIMP-1, Gal3 y/o CRP, así como otros analitos y biomarcadores analizados en el presente documento o conocidos en la técnica de otra manera. En algunas realizaciones uno o más componentes para analizar una muestra de prueba para AFP, CEA, ferritina, CYFRA, CA19-9, TIMP-1, Gal3 y/o CRP permiten la determinación de la presencia, cantidad o concentración de AFP, CEA, ferritina, CYFRA, CA19-9, TIMP-1, Gal3 y/o CRP. Una muestra, tal como una muestra de suero, se puede analizar para AFP, CEA, ferritina, CYFRA, CA19-9, TIMP-1, Gal3 y/o CRP utilizando TOF-MS y un estándar interno.

El kit (o los componentes del mismo), así como el método para determinar la concentración de AFP, CEA, ferritina, CYFRA, CA19-9, TIMP-1, Gal3 y/o CRP en una muestra de prueba mediante un inmunoensayo como se describe en el presente documento, puede adaptarse para su uso en una diversidad de sistemas automatizados y semi-automatizados (incluyendo aquellos en donde la fase sólida comprende una micropartícula), como se describe, por ejemplo, en las patentes de Estados Unidos n.º 5.089.424 y 5.006.309 y como se distribuye comercialmente, por ejemplo, por Abbott Laboratories (Abbott Park, Illinois) como ARCHITECT®.

Algunas de las diferencias entre un sistema automatizado o semiautomatizado en comparación con un sistema no automatizado (por ejemplo, ELISA) incluyen el sustrato al que se une el primer compañero de unión específica (por ejemplo, analito, anticuerpo o anticuerpo de captura) (que puede tener impacto sobre la formación del sándwich y la reactividad del analito) y la duración y el tiempo de la captura, detección y/o cualesquiera etapas de lavado opcionales. Si bien un formato no automatizado, tal como un ELISA, puede requerir un tiempo de incubación relativamente más prolongado con la muestra y el reactivo de captura (por ejemplo, alrededor de 2 horas), un formato automatizado o semiautomatizado (por ejemplo, ARCHITECT® y cualquier plataforma nueva, de Abbott Laboratories) puede tener un tiempo de incubación relativamente más corto (por ejemplo, aproximadamente 18 minutos para ARCHITECT®). Análogamente, si bien un formato no automatizado, tal como un ELISA, puede incubar un anticuerpo de detección, tal como el reactivo conjugado, durante un tiempo de incubación relativamente más prolongado (por ejemplo, aproximadamente 2 horas), un formato automatizado o semiautomatizado (por ejemplo, ARCHITECT® y cualquier plataforma nueva) puede tener un tiempo de incubación relativamente más corto (por ejemplo, 4 minutos para el ARCHITECT® y cualquier plataforma nueva).

Otras plataformas comercializadas por Abbott Laboratories incluyen, pero sin limitación, AxSYM®, IMx® (véase, por ejemplo, la patente de Estados Unidos n.º 5.294.404, que se incorpora en el presente documento como referencia en su totalidad), PRISM®, EIA (perla) y Quantum™ II, así como otras plataformas. Adicionalmente, los ensayos, Los kits y los componentes del kit pueden emplearse en otros formatos, por ejemplo, en sistemas electroquímicos u otros sistemas de ensayo portátiles o de punto de atención. La presente divulgación es, por ejemplo, aplicable al sistema de inmunoensayo electroquímico comercial Abbott Point of Care Abbott Point of Care (i-STAT®, de Abbott Laboratories) que realiza inmunoensayos de tipo sándwich. Se describen los inmunosensores y sus métodos de fabricación y operación en dispositivos de prueba de un solo uso, por ejemplo en, la patente de Estados Unidos n.º 5.063.081, la publicación de solicitud de patente de Estados Unidos n.º 2003/0170881, la publicación de solicitud de patente de Estados Unidos n.º 2004/0018577, la publicación de solicitud de patente de Estados Unidos n.º 2005/0054078 y la publicación de solicitud de patente de Estados Unidos n.º 2006/0160164, que están incorporados por referencia en su totalidad por sus enseñanzas respecto a las mismas.

En particular, con respecto a la adaptación de un ensayo al sistema I-STAT®, se prefiere la siguiente configuración. Un chip de silicio microfabricado se fabrica con un par de electrodos de trabajo amperométricos de oro y un electrodo de referencia de plata-cloruro de plata. En uno de los electrodos de trabajo, las perlas de poliestireno (0,2 mm de diámetro) con anticuerpo de captura inmovilizado se adhieren a un recubrimiento de polímero de alcohol polivinílico estampado sobre el electrodo. Este chip se ensambla en un cartucho I-STAT® con un formato de fluidos adecuado para inmunoensayo. En una parte de la pared de la cámara de retención de muestras del cartucho hay una capa que comprende el anticuerpo de detección marcado con fosfatasa alcalina (u otro marcador). Dentro de la bolsa de fluido del cartucho hay un reactivo acuoso que incluye fosfato de p-aminofenol.

En la operación, una muestra sospechosa de contener AFP, CEA, ferritina, CYFRA, CA19-9, TIMP-1, Gal3 y/o CRP, se añade a la cámara de retención del cartucho de prueba y se inserta el cartucho en el lector del I-STAT®. Después de haberse disuelto el segundo anticuerpo (anticuerpo de detección) en la muestra, un elemento de bomba en el cartucho fuerza a la muestra al interior del conducto que contiene el chip. Aquí se oscila para promover la formación del sándwich entre el primer anticuerpo de captura, AFP, CEA, ferritina, CYFRA, CA19-9, TIMP-1, Gal3 y/o CRP y el segundo anticuerpo de detección marcado. En la penúltima etapa del ensayo, el fluido se expulsa de la bolsa y se introduce en el conducto para lavar la muestra del chip y colocarla en una cámara de desechos. En la etapa final del ensayo, el marcador fosfatasa alcalina reacciona con fosfato de p-aminofenol para escindir el grupo fosfato y permitir que el p-aminofenol liberado se oxide electroquímicamente en el electrodo de trabajo. Basándose en la corriente medida, el lector es capaz de calcular la cantidad de AFP, CEA, ferritina, CYFRA, CA19-9, TIMP-1, Gal3 y/o CRP en

la muestra mediante un algoritmo incorporado y una curva de calibración determinada de fábrica.

5 Será evidente inmediatamente para los expertos en la materia que son fácilmente aplicables y apreciables otra modificación adecuada y las adaptaciones de los métodos de la presente divulgación descritos en el presente documento y que se pueden realizar utilizando equivalentes adecuados sin apartarse del alcance de la presente divulgación o los aspectos y realizaciones descritos en este documento. Habiendo descrito ahora la presente divulgación en detalle, la misma se entenderá más claramente haciendo referencia a los siguientes ejemplos que están destinados meramente a ilustrar algunos aspectos y realizaciones de la divulgación y no deben observarse como limitantes del alcance de la divulgación. Las divulgaciones de todas las referencias de revistas, patentes de Estados Unidos y otras publicaciones a las que se hacen referencia en el presente documento se incorporan por referencia en su totalidad.

15 La presente invención tiene múltiples aspectos, ilustrados por los siguientes ejemplos no limitantes. Los Ejemplos que no están dentro del alcance de las reivindicaciones se proporcionan como referencia.

Ejemplos

Ejemplo 1

Métodos y materiales

25 Se utilizaron poblaciones clínicas (análisis primario sobre 4521 de un total de 4698 pacientes) de las muestras de plasma de los pacientes de la prueba de endoscopia II del Hospital Hvidovre. Grupo 1 (3610): 290 adenomas de bajo riesgo y 3320 otra población sin cáncer; Grupo 2 (911): 399 adenomas de alto riesgo, 512 CRC (~50% estadio temprano) - Información de estadificación: S1 (107), S2 (163), S3 (139), S4 (108) y 1 estadio ausente. Grupo 3 (177): Otras neoplasias malignas diferentes del CRC: Total 176 (no CRC) (véase la Tabla 1), que se eliminaron del análisis primario. Historial clínico: registro nacional danés y capacidad para "auditar" datos. Se recogieron 110 parámetros clínicos centrados en parámetros objetivos/fiables.

Tabla 1

Cáncer	Número de sujetos
pulmón	33
ovario	16
mama	4
riñón	7
canal anal	6
primario desconocido	16
linfoma de linfocitos B	17
útero	1
próstata	10

(continuación)

Cáncer	Número de sujetos
vesícula biliar	8
laringe	3
melanoma maligno	2
páncreas	22
LLC	3
mieloma maligno	5
testículos	1
intestino delgado	3
vejiga	1
estómago	9
mesotelioma	3
glándula suprarrenal	1
neuroendocrino	2
esófago	3

35 Los individuos con síntomas de CRC que fueron remitidos a sigmoidoscopia y/o colonoscopia en uno de los seis hospitales daneses participantes se incluyeron en el estudio (todos recibieron colonoscopia como parte de la participación en el estudio). Durante el reclutamiento, se registraron datos y se recogieron muestras en situación basal. Se resumieron los datos basales (promedios $\pm$ desviaciones estándar o medianas e intervalos intercuartiles para los datos continuos y proporciones para los datos categóricos). Para analizar las diferencias estadísticas entre grupos se utilizaron, según fueran apropiados, la prueba t de Student desapareada, la prueba de la U de MannWhitney, χ^2 o la prueba exacta de Fisher. Los criterios de inclusión y exclusión se muestran en la Tabla 2.

Tabla 2

Criterios de inclusión:	Criterios de exclusión:
Edad > 18 años	CRC previo, adenoma o miembro de familias de HNPCC o FAP
Síntomas que indican cáncer colorrectal	Incapaces de entender el idioma danés
No tienen colonoscopia hecha anterior.	Incapaces de leer y/o entender la información al paciente distribuida.

El cribado de neoplasias y cánceres relevantes se definió como estos hallazgos en pacientes seleccionados:

- a. Adenomas con displasia de alto grado (evaluados por patólogos)-Definido por el grado danés de conversión a malignidad (solo de alto grado);
- b. Adenomas mayores o iguales a 1 cm;
- c. Número de pólipos en el intestino (mayor o igual a 3);
- d. CRC de todos los estadios.

Se recogieron 54 ml de sangre de una vena antecubital periférica, véase el Ejemplo 2. Todas las muestras de sangre se tomaron antes de la colonoscopia. Los niveles de biomarcadores se determinaron en las muestras de sangre recolectadas. Las muestras restantes se almacenaron a -80 ° C en un biobanco en el Hospital Hvidovre, donde todos los congeladores a -80 ° C estuvieron bajo vigilancia electrónica 24 horas/7 días a la semana.

Ejemplo 2

Extracción y manipulación de muestras de sangre

Todos los dispositivos de recogida, tubos de colección, pipetas, viales de almacenamiento, etc. se suministraron por la gestión del protocolo. Todos los dispositivos y tubos estuvieron libres de endotoxina, ADNasa y ARNasa.

Las muestras se recogieron a temperatura ambiente utilizando un torniquete ligero, se almacenaron antes de la centrifugación a temperatura ambiente, se centrifugaron en 2 horas a 3.200xG, 10 min, se separaron cuidadosamente sin alterar los 0,5 cm de plasma/suero por encima de la capa leucocitaria (banda blanca como se muestra en la introducción al estudio). Las muestras se separaron justo antes de que la centrifugación terminara.

1. 30 ml de sangre de una vena periférica del antebrazo en 3 tubos con EDTA de 10 ml cada uno (violeta). Los sobrenadantes del tubo 1 se transfirieron a 4 viales CM-lab con aproximadamente 1 ml en cada tubo - marcados con los códigos de barras 1-4. Los sobrenadantes de los tubos 2 y 3 se transfirieron a tubos CM-lab con aproximadamente 2 ml en cada tubo - marcados con los códigos de barras 5-8.

2. 20 ml de sangre, 2 tubos de 10 ml cada uno sin aditivos (rojo). Los sobrenadantes de los 2 tubos se transfirieron a 6 viales CM-lab con aproximadamente 1,5 ml en cada uno - marcados con los códigos de barras 9-14.

3. 9 ml de sangre en 2 tubos con aditivo citrato - 4,5 ml en cada tubo (azul claro). Los sobrenadantes de los 2 tubos se transfirieron a 4 viales CM-lab con aproximadamente 1,2 ml en cada uno - marcados con los códigos de barras 15-18.

4. Las capas leucocitarias de los 3 tubos de EDTA. Se transfirieron capas leucocitarias de cada tubo a 1 (un) vial de CM-lab cada uno (3 en total). Se añadió NaCl isotónico estéril en una proporción de dilución de 1:1 y se voltearon hacia arriba y hacia abajo 8-10 veces para mezclar - marcados con los códigos de barras 19-21.

Todos los viales se almacenaron inmediatamente a -80 ° C en los congeladores del protocolo y utilizando las cajas de almacenamiento entregadas (5,5 x 5,5 x 13 cm). Los viales almacenados se transfirieron con frecuencia al depósito del Hospital Hvidovre para su almacenamiento a largo plazo a -80 ° C bajo vigilancia electrónica de 24/7.

Ejemplo 3

Evaluación estadística

Los análisis se realizaron con SAS v9.2, R v3.0.3 o JMP Pro v11. La evaluación estadística multivariante de las variables se realizó mediante AIM (modelo de índice adaptativo) (Tian Lu, Tibshirani Robert. Adaptive Index models for marker-based risk stratification. Biostatistics (2011), 12, 1, págs 68-86).

Ejemplo 4

Selección de biomarcadores

Se investigó una combinación de biomarcadores para nuevas utilidades clínicas como una ayuda en la detección de neoplasias de colon y recto (por ejemplo adenomas de alto grado) y cánceres colorrectales en etapa temprana (CRC). La población de estudio incluyó un total de 4698 sujetos.

Desarrollo de algoritmos. Se seleccionó la metodología del modelo de índice adaptativo (AIM) para identificar un subconjunto óptimo de variables y sus límites que cuando se combinan como un algoritmo ("índice") podrían seleccionar personas con alto riesgo para el resultado bajo evaluación. La Tabla 7 describe las cifras de los resultados. En este procedimiento, se utilizó un modelo de regresión logística para estimar secuencialmente una secuencia de modelos de índice adaptativo con hasta un número máximo especificado de reglas binarias. Este procedimiento empleó la selección directa de variables y sus límites para construir este conjunto secuencial de índices con un número creciente de reglas binarias. El número óptimo de reglas binarias o variables, a incluirse en el índice se eligió a través de una validación cruzada de k veces. La validación cruzada de k veces es un método de reutilización de muestras que divide los datos en k segmentos elegidos al azar. Para cada una de las iteraciones, uno de los segmentos k se utilizó como un conjunto de datos de "prueba" y los otros segmentos $k-1$ combinados se utilizaron como el conjunto de datos de "entrenamiento". Como resultado, el procedimiento se repitió k veces. Para cada una de las iteraciones del procedimiento, el estadístico de la prueba de puntuación se estimó en el conjunto de datos de la prueba para analizar la asociación entre el resultado y el índice construido utilizando los datos de entrenamiento. El número óptimo de reglas binarias permitidas o variables, a incluir en el índice se determinó por el estadístico de puntuación de validación cruzada (promedio más grande).

Los datos se dividieron aleatoriamente en un conjunto de datos internos para utilizarse para el desarrollo del algoritmo utilizando el procedimiento descrito anteriormente y un conjunto de datos externo que no se utilizó en absoluto en el desarrollo del algoritmo, pero que actuó como una evaluación independiente del rendimiento del algoritmo para cada resultado. Este método de un conjunto de datos internos y externos fue preferible para imitar un escenario del mundo real. Utilizando todos los datos evaluables para cada resultado del conjunto de datos internos, los Modelo 1-Modelo 6 se construyeron a través de validación cruzada, identificando el número óptimo de variables y sus límites por género. Se evaluaron el Resultado 1, Resultado 5 y Resultado 12. Los parámetros a evaluación incluyeron: los marcadores AFP, CEA, ferritina, Galectina-3, CYFRA 21-1, CA 19-9 XR, TIMP-1 y hs-CRP; edad, la comorbilidad cuenta como una variable categórica (0, 1 o 2+) y las comorbilidades de ECV y diabetes medidas por los códigos daneses. La Tabla 3 muestra los criterios para cada modelo.

Tabla 3

Resultado	Resultado 1, Resultado 5 o Resultado 12
Conjunto de datos	Conjunto de datos de entrenamiento para el conjunto de datos internos
Género	Hombres o Mujeres
N	Tamaño muestral para construir el modelo
Variables	Variables consideradas para el algoritmo
Netapas	Máximo número de reglas binarias permitidas (es decir, el número máximo de variables permitido en el modelo)

(continuación)

Kveces	Validación cruzada 10 veces
Kmáx	Número óptimo de variables devueltas desde el procedimiento AIM
Índice	las variables óptimas y sus límites devueltos desde el procedimiento AIM

Además, se calculó una puntuación AIM del índice identificado para los sujetos en los conjuntos de datos internos y externos. La puntuación AIM es el número de variables del índice en las que se cumple el criterio de límite. Esta puntuación AIM toma valores discretos de 0 a J (donde J es el número óptimo de variables identificadas en el índice). Una puntuación de 0 indica que la persona no cumple con los criterios de límite para ninguna variable en el índice. Una puntuación de 1 indica que la persona cumple con los criterios de límite para solo 1 variable en el índice. No importa cuál de los criterios de límite cumple J . Una puntuación de J indica que una persona cumple con los criterios de límite para todas las variables del índice. A continuación, se puede calcular una matriz de confusión (tasa de clasificación errónea, precisión sensibilidad, especificidad, valor predictivo negativo y valor predictivo positivo) para cada valor de la puntuación AIM de 1 a J , utilizando ese valor de puntuación como un umbral. Los sujetos con una puntuación mayor o igual a ese umbral se consideraron "positivos" para el resultado de interés. Se seleccionó un umbral que sería clínicamente útil en términos de sus parámetros de matriz de confusión estimados. Al calcular la matriz de confusión para los conjuntos de datos internos y externos, el grado de optimismo que resulta del sobreajuste se observó en la diferencia en las medidas entre los conjuntos de datos internos y externos.

La Tabla 4 muestra la metodología AIM, donde Lista: marcadores AFP, CEA, ferritina, Galectina-3, CYFRA 21-1, CA 19-9 XR, TIMP-1 y hs-CRP; edad, comorbilidad de ECV, comorbilidad de diabetes y comorbilidad cuentan como una variable categórica (0, 1 o 2+).

Tabla 4 Metodología AIM

	Modelo 1	Modelo 2	Modelo 3	Modelo 4	Modelo 5	Modelo 6
Resultado	1	1	5	5	12	12
Conjunto de datos	Interno	Interno	Interno	Interno	Interno	Interno
Género	Hombres	Mujeres	Hombres	Mujeres	Hombres	Mujeres
N	1373	1526	1236	1409	1101	1328
Variables	Lista de marcadores	Lista de marcadores	Lista de marcadores	Lista de marcadores	Lista de marcadores	Lista de marcadores
Netapas	12	11	12	11	12	11
K-veces	10	10	10	10	10	10
Kmáx	5	5	5	5	5	3
Índice	cea>6,5	cyfra>1,72	cea>6,9	cea>5,9	cyfra>2,13	cyfra>2,06
	edad>54	cea>4,8	cyfra>2,17	cyfra>2,01	crp>15,4	cea>5,7
	cyfra>1,98	crp>5,5	crp>18,3	CA19-9>24	TIMP-1>148	crp>10,4
	crp>1,8	ferritina<38	ferritina<97	ferritina<36	CA19-9>25,0	
	ferritina<109	edad>63	CA19-9>26,9	crp>7,8	afp>6,7	

Rendimiento del modelo: Definiciones

Umbral: nivel potencial de una "puntuación".

% clasificados erróneamente: la proporción de gente que el algoritmo clasifica como opuestas a su designación verdadera.

Sensibilidad (SE): la proporción de personas con la enfermedad que dan positivo en la prueba.

Especificidad (SP): la proporción de personas sin la enfermedad que dan negativo en la prueba.

Valor predictivo positivo (PPV): la probabilidad de que una persona con una prueba positiva tenga la enfermedad.

Valor predictivo negativo (NPV): la probabilidad de que una persona con una prueba negativa no tenga la enfermedad.

Exactitud: proporción de diagnóstico correcto.

Razón de probabilidad positiva (LR +): Proporción entre la probabilidad de un resultado positivo de una prueba en una persona con la enfermedad y la probabilidad de un resultado positivo de una prueba en una persona sin la enfermedad.

Razón de probabilidad negativa (LR-): Proporción entre la probabilidad de un resultado negativo de una prueba en una persona con la enfermedad y la probabilidad de un resultado negativo de una prueba en una persona sin la enfermedad.

Probabilidad posprueba (Post PR +): la probabilidad de tener la enfermedad, dada la prevalencia de la enfermedad y la probabilidad de una prueba positiva.

Ejemplo 5

Resultados-Hombres

La matriz de confusión para Hombres se muestra en la Tabla 5. Resultado 1 Tamaño muestral: Interno = 1373, Externo = 769 (178 positivos); Resultado 5 Tamaño muestral: Interno = 1236, Externo = 690 (38 positivos, pequeño); Resultado 12 Tamaño muestral: Interno = 1101, Externo = 618 (33 positivos, pequeño). El sombreado indica los umbrales que tienen cerca del 60 % de especificidad y/o 60 % sensibilidad.

Interpretación de la matriz de confusión. Utilizando el Resultado 1, conjunto de datos externos, Umbral ≥ 3 de la Tabla 5 como un ejemplo:

% clasificados erróneamente: el 25 % de los sujetos están clasificados erróneamente (se predice que tienen cáncer cuando no lo tienen o se predice que no tienen cáncer cuando sí lo tienen); tasa de error global.

Exactitud: 75 % diagnóstico correcto global.

SE: 55 % de las personas con la enfermedad cumplen al menos 3 de los límites de las variables en este algoritmo (una puntuación de al menos 3).

SP: 81 % de las personas sin la enfermedad tienen una puntuación inferior a 3.

5 PPV: 47 % de las personas que tienen una puntuación de al menos 3 en realidad tienen la enfermedad.

NPV: 86 % de las personas que tienen una puntuación inferior a 3 no tienen la enfermedad.

LR+: 2,96 > 1 significa que una persona con al menos una puntuación de 3 tiene una probabilidad aumentada de tener la enfermedad.

10 LR-: 0,55 < 1 significa que una persona con al menos una puntuación de 3 tiene una probabilidad disminuida de tener la enfermedad.

Post PR+: tener un núcleo de al menos 3 aumenta la probabilidad de tener la enfermedad de un 20% (la prevalencia*) a un 43%.

*Se utilizó una prevalencia del 20% para el Resultado 1, del 12% para el resultado 5 y del 5% para el Resultado 12, basada en la tasa real observada en este estudio.

15

Tabla 5

Resultado	Conjunto de datos	Umbral	N.º Clasificados erróneamente	Exactitud	SE	SP	PPV	NPV	LR+	LR-	Post Posibilidades+	Post PR+
1	Interno	≥1	0,67	0,33	98,84	11,27	27,13	96,67	1,11	0,10	0,28	0,22
		≥2	0,46	0,54	86,34	43,05	33,64	90,41	1,52	0,32	0,38	0,27
		≥3	0,25	0,75	57,85	80,27	49,50	85,07	2,93	0,53	0,73	0,42
		≥4	0,21	0,79	27,62	96,02	69,85	79,87	6,93	0,75	1,73	0,63
		≥5	0,24	0,76	5,81	99,61	83,33	75,98	14,96	0,95	3,74	0,79
	Externo	≥1	0,67	0,33	98,31	12,86	25,36	96,20	1,13	0,13	0,28	0,22
		≥2	0,46	0,54	85,39	43,99	31,47	90,91	1,52	0,33	0,38	0,28
		≥3	0,25	0,75	55,06	81,39	47,12	85,74	2,96	0,55	0,74	0,43
		≥4	0,20	0,80	23,03	96,79	68,33	80,68	7,16	0,80	1,79	0,64
		≥5	0,23	0,77	4,49	99,32	66,67	77,54	6,64	0,96	1,66	0,62
5	Interno	≥1	0,38	0,62	87,94	56,99	28,18	96,10	2,04	0,21	0,28	0,22
		≥2	0,15	0,85	57,29	90,65	54,03	91,71	6,12	0,47	0,84	0,46
		≥3	0,12	0,88	34,67	98,46	81,18	88,71	22,47	0,66	3,06	0,75
		≥4	0,13	0,87	18,09	99,81	94,74	86,39	93,80	0,82	12,79	0,93
		≥5	0,15	0,85	4,02	100,00	100,00	84,45	0	0,96	0	0
	Externo	≥1	0,39	0,61	76,64	57,63	24,92	93,07	1,81	0,41	0,25	0,20
		≥2	0,17	0,83	41,12	90,57	44,44	89,34	4,36	0,65	0,59	0,37
		≥3	0,13	0,87	23,36	98,63	75,76	87,52	17,03	0,78	2,32	0,70
		≥4	0,13	0,87	15,89	99,83	94,44	86,61	92,63	0,84	12,63	0,93
		≥5	0,15	0,85	1,87	100,00	100,00	84,74	0	0,98	0	0
12	Interno	≥1	0,33	0,67	81,82	66,09	13,33	98,28	2,41	0,28	0,13	0,11
		≥2	0,12	0,88	57,58	90,24	27,34	97,09	5,90	0,47	0,31	0,24
		≥3	0,06	0,94	40,91	97,39	50,00	96,28	15,68	0,61	0,83	0,45
		≥4	0,05	0,95	19,70	99,52	72,22	95,11	40,77	0,81	2,15	0,68
		≥5	0,06	0,94	1,52	100,00	100,00	94,09	0	0,98	0	0
	Externo	≥1	0,32	0,68	87,88	66,67	12,95	98,98	2,64	0,18	0,14	0,12
		≥2	0,10	0,90	39,39	93,33	25,00	96,47	5,91	0,65	0,31	0,24
		≥3	0,06	0,94	21,21	98,12	38,89	95,67	11,28	0,80	0,59	0,37
		≥4	0,06	0,94	6,06	99,49	40,00	94,94	11,82	0,94	0,62	0,38
		≥5	0,05	0,95	6,06	100,00	100,00	94,97	0	0,94	0	0

Ejemplo 6

Resultados-Mujeres

- 5 La matriz de confusión para Mujeres se muestra en la Tabla 6. Resultado 1 Tamaño muestral: Interno = 1526, Externo = 851 (133 positivos); Resultado 5 Tamaño muestral: Interno = 1409, Externo = 785 (73 positivos); Resultado 12 Tamaño muestral: Interno = 1328, Externo = 738 (32 positivos, pequeño). El sombreado indica los umbrales que tienen cerca del 60 % de especificidad y/o 60 % sensibilidad.
- 10 **Interpretación de la matriz de confusión.** Utilizando el Resultado 1, conjunto de datos externos, Umbral ≥ 3 de la Tabla 6 como un ejemplo:
- 15 % clasificados erróneamente: el 20 % de los sujetos están clasificados erróneamente (se predice que tienen cáncer cuando no lo tienen o se predice que no tienen cáncer cuando sí lo tienen); tasa de error global.
Exactitud: 80 % diagnóstico correcto global.
SE: 28 % de las personas con la enfermedad cumplen al menos 3 de los límites de las variables en este algoritmo (una puntuación de al menos 3).
SP: 90 % de las personas sin la enfermedad tienen una puntuación inferior a 3.
PPV: 34 % de las personas que tienen una puntuación de al menos 3 en realidad tienen la enfermedad.
- 20 NPV: 87 % de las personas que tienen una puntuación inferior a 3 no tienen la enfermedad.
LR+: 2,77 > 1 significa que una persona con al menos una puntuación de 3 tiene una probabilidad aumentada de tener la enfermedad.
LR-: 0,80 < 1 significa que una persona con al menos una puntuación de 3 tiene una probabilidad disminuida de tener la enfermedad.
- 25 Post PR+: tener un núcleo de al menos 3 aumenta la probabilidad de tener la enfermedad de un 20% (la prevalencia*) a un 41 %.
*Se utilizó una prevalencia del 20% para el Resultado 1, del 12% para el resultado 5 y del 5% para el Resultado 12, basada en la tasa real observada en este estudio.

Tabla 6

Resultado	Conjunto de datos	Umbral	N.º Clasificados erróneamente	Exactitud	SE	SP	PPV	NPV	LR+	LR-	Post Posibilidades+	Post PR+
1	Interno	≥1	0,62	0,38	89,84	27,87	20,07	93,16	1,25	0,36	0,31	0,24
		≥2	0,33	0,67	65,63	67,72	29,07	90,72	2,03	0,51	0,51	0,34
		≥3	0,18	0,82	35,55	91,89	46,91	87,61	4,38	0,70	1,10	0,52
		≥4	0,15	0,85	17,97	98,82	75,41	85,67	15,21	0,83	3,80	0,79
		≥5	0,16	0,84	3,52	99,92	90,00	83,71	44,65	0,97	11,16	0,92
	Externo	≥1	0,63	0,37	89,47	26,74	18,45	93,20	1,22	0,39	0,31	0,23
		≥2	0,33	0,67	62,41	67,41	26,18	90,64	1,91	0,56	0,48	0,32
		≥3	0,20	0,80	27,82	89,97	33,94	87,06	2,77	0,80	0,69	0,41
		≥4	0,15	0,85	9,77	98,61	56,52	85,51	7,02	0,91	1,75	0,64
		≥5	0,16	0,84	0,75	99,72	33,33	84,43	2,70	1,00	0,67	0,40
5	Interno	≥1	0,45	0,55	81,95	52,51	15,24	96,54	1,73	0,34	0,24	0,19
		≥2	0,15	0,85	50,38	88,71	31,75	94,49	4,46	0,56	0,61	0,38
		≥3	0,08	0,92	27,07	98,59	66,67	92,84	19,19	0,74	2,62	0,72
		≥4	0,08	0,92	14,29	99,69	82,61	91,77	45,57	0,86	6,21	0,86
		≥5	0,09	0,91	0,75	99,92	50,00	90,62	9,59	0,99	1,31	0,57
	Externo	≥1	0,42	0,58	82,19	55,06	15,79	96,79	1,83	0,32	0,25	0,20
		≥2	0,15	0,85	50,68	88,62	31,36	94,60	4,46	0,56	0,61	0,38
		≥3	0,08	0,92	30,14	98,17	62,86	93,20	16,51	0,71	2,25	0,69
		≥4	0,08	0,92	17,81	99,58	81,25	92,20	42,26	0,83	5,76	0,85
		≥5	0,09	0,91	5,48	100,00	100,00	91,17	0	0,95	0	0
12	Interno	≥1	0,24	0,76	80,43	75,82	10,66	99,08	3,33	0,26	0,18	0,15
		≥2	0,05	0,95	47,83	96,72	34,38	98,10	14,60	0,54	0,77	0,43
		≥3	0,03	0,97	17,39	99,61	61,54	97,11	44,59	0,83	2,35	0,70
	Externo	≥1	0,23	0,77	81,25	76,49	13,54	98,90	3,46	0,25	0,18	0,15
		≥2	0,06	0,94	43,75	96,74	37,84	97,43	13,43	0,58	0,71	0,41
		≥3	0,04	0,96	12,50	99,72	66,67	96,17	44,12	0,88	2,32	0,70

Ejemplo 7

Evaluación de estadios y edades

- 5 La Tabla 7 describe las cifras de los Resultados. El algoritmo de Resultado 1 (Adenomas de alto riesgo + todos los CRC frente a Todos sin cánceres) se utilizó para evaluar y predecir un "Grupo de enfermedad" frente a un "Grupo de control", como se muestra en la Tabla 8. La Tabla 8 muestra las subevaluaciones que utilizan el algoritmo de resultado primario (Todos los demás sin otros cánceres frente a adenomas de alto riesgo + todos los CRC). Adicionalmente, el algoritmo del Resultado 1 se utilizó también en el grupo de comparación de Todos los adenomas de alto riesgo frente a los adenomas de bajo riesgo.
- 10

Tabla 7

Número de resultado	Resultados primarios:
1	○ CRC (todos los estadios) y adenomas de alto grado frente a todos los demás (incluyendo adenoma de bajo grado, otros hallazgos y no hallazgos y <i>excluyendo</i> "otros cánceres no de tipo CRC")
2	○ Adenomas de alto grado frente a todos los demás (incluyendo adenoma de bajo grado, otros hallazgos y no hallazgos y <i>excluyendo</i> "otros cánceres no de tipo CRC")
3	○ CRC (todos los estadios) frente a todos los demás, otros hallazgos y no hallazgos y <i>excluyendo</i> "otros cánceres no de tipo CRC")
	Resultados secundarios:
4	○ Todos los estadios de CRC y todos los otros cánceres no de tipo CRC frente a Todos los demás (incluyendo todos los adenomas, otros hallazgos y no hallazgos)
5	○ Todos los estadios de CRC frente a Todos los demás (incluyendo adenoma de bajo grado, otros hallazgos y no hallazgos)
6	○ CRC en estadios I y II frente a Todos los demás (incluyendo adenoma de bajo grado, otros hallazgos y no hallazgos)
7	○ Todos los estadios de CRC frente a Adenomas
8	○ CRC en estadios I y II frente a Adenomas
9	○ Todos los estadios de CRC frente a Sin hallazgos
10	○ CRC en estadios I y II frente a Sin hallazgos
11	○ Adenomas de alto grado frente a Adenomas de bajo grado
12	○ Cánceres no colorrectales (-CRC y -adenomas de alto grado) frente a todos los demás

Tabla 8

Hombres		n	≥1 % positivo	≥2 % positivo	≥3 % positivo	≥4 % positivo	≥5 % positivo
Grupo de control	Grupo de enfermedad						
Todos sin cánceres*	Todos adenomas de alto riesgo y CRC	769	98,31	85,39		23,03	4,49
Todos sin cánceres*	Todos los adenomas de alto riesgo	1838	99,54	77,78	40,28	9,26	1,39
Todos sin cánceres*	Estadio 1/2 de CRC	1778	100,00	95,51		28,21	7,69
Todos sin cánceres*	Estadio 3/4 de CRC	1772	98,67	94,67	78,00	51,33	10,67
Todos sin cánceres*	Todos los adenomas de alto riesgo y CRC, <65años	1105	96,43	73,81	44,05	15,48	1,79
Todos sin cánceres*	Todos los adenomas de alto riesgo y CRC, ≥65años	1039	100,00	93,79	63,56	31,64	7,06
Todos sin cánceres*	otros cánceres	1721	100,00	91,92		29,29	3,03
Todos sin cánceres*	Todos los CRC + todos los demás cánceres	2027	99,51	94,32	68,40	37,04	7,65
Adenomas de bajo riesgo	Todos los adenomas de alto riesgo	384	98,15	76,39	38,89	7,87	0,00
Mujeres			≥1	≥2	≥3	≥4	≥5
Grupo de control	Grupo de enfermedad	n	% positivo	% positivo	% positivo	% positivo	% positivo
Todos sin cánceres*	Todos adenomas de alto riesgo y CRC	851	89,47	62,41		9,77	0,75
Todos sin cánceres*	Todos los adenomas de alto riesgo	2171	86,89	49,73	18,03	2,19	0,00
Todos sin cánceres*	Estadio 1/2 de CRC	2096	92,59	76,85		25,93	7,41
Todos sin cánceres*	Estadio 3/4 de CRC	2085	94,85	79,38	46,39	27,84	3,09
Todos sin cánceres*	Todos los adenomas de alto riesgo y CRC, <65años	1231	71,75	34,35	12,98	1,53	0,00
Todos sin cánceres*	Todos los adenomas de alto riesgo y CRC, ≥65años	1146	100,00	80,23	44,57	22,48	4,26
Todos sin cánceres*	otros cánceres	2066	94,87	80,77	56,41	17,95	0,00
Todos sin cánceres*	Todos los CRC + todos los demás cánceres	2272	94,01	78,87		24,65	3,87
Adenomas de bajo riesgo	Todos los adenomas de alto riesgo	305	86,89	49,73	18,03	2,19	0,00

* Incluye todas las afecciones benignas, incluidos los adenomas de bajo riesgo y excluye todos los cánceres.

- Como se muestra en la Tabla 8, el algoritmo del Resultado 1 funciona bien para predecir el resultado de la enfermedad en comparación con un grupo de control. En particular, el algoritmo del Resultado 1 utilizado para comparar el grupo de todos los estadios de cáncer ("Todos los adenomas de alto riesgo y CRC") frente al grupo sin cánceres ("Todos sin cánceres") en la situación basal en Hombres y Mujeres predijo positivo un 85,39 % y un 62,41 %, respectivamente, cuando se utiliza una puntuación de más de 2. El algoritmo del Resultado 1 utilizado para comparar el CRC en estadio I y II frente al grupo de sin cánceres ("Todos sin cánceres") en Hombres y Mujeres predijo positivo un 95,51 % y un 76,85 %, respectivamente, cuando se utiliza una puntuación de más de 2. El algoritmo del Resultado 1 utilizado para comparar el CRC en estadio III y IV frente al grupo de sin cánceres ("Todos sin cánceres") en Hombres y Mujeres predijo positivo un 94,67 % y un 79,38 %, respectivamente, cuando se utiliza una puntuación de más de 2. El algoritmo del Resultado 1 utilizado para comparar otros cánceres (incluyendo los cánceres enumerados en la Tabla 1) frente al grupo de sin cánceres ("Todos sin cánceres") en Hombres y Mujeres predijo positivo un 91,92 % y un 80,77 %, respectivamente, cuando se utiliza una puntuación de más de 2, indicando que el algoritmo del Resultado 1 se puede utilizar para detectar otros cánceres además de los cánceres colorrectales.
- Ha de entenderse que la descripción detallada anterior y los ejemplos adjuntos son únicamente ilustrativos y no han de interpretarse como limitaciones en el alcance de la invención, que se define únicamente por las reivindicaciones adjuntas y sus equivalentes.
- Los diversos cambios y modificaciones divulgados en las realizaciones serán evidentes para los expertos en la materia. Tales cambios y modificaciones, incluyendo, sin limitación, aquellos relacionados con las estructuras químicas, sustituyentes, derivados, intermedios, síntesis, composiciones, formulaciones o métodos de uso de la invención, se pueden hacer sin desviarse del alcance de las reivindicaciones.

REIVINDICACIONES

1. Un método *in vitro* para determinar si un sujeto padece o está en riesgo de padecer, adenomas de alto riesgo o cáncer colorrectal (CRC), el método que comprende las etapas de:

- (a) proporcionar una muestra biológica obtenida de un sujeto previamente;
- (b) determinar los niveles de antígeno carcinoembrionario (CEA), fragmento de citoqueratina 19 (CYFRA), proteína reactiva con C (CRP) y ferritina en la muestra biológica del sujeto;
- (c) comparar los niveles de CEA, CYFRA, CRP y ferritina en la muestra biológica en referencia a los niveles de CEA, CYFRA, CRP y ferritina;

- (i) proporcionar una puntuación de CEA para el sujeto en donde el sujeto obtiene una puntuación de 1 si el nivel de CEA en la muestra biológica es mayor que el nivel de referencia de CEA y una puntuación de 0 si el nivel de CEA en la muestra biológica es igual o inferior al nivel de referencia de CEA;

- (ii) proporcionar una puntuación CYFRA para el sujeto en donde el sujeto obtiene una puntuación de 1 si el nivel de CYFRA en la muestra biológica es mayor que el nivel de referencia de CYFRA y una puntuación de 0 si el nivel de CYFRA en la muestra biológica es igual o inferior al nivel de referencia de CYFRA;

- (iii) proporcionar una puntuación de CRP para el sujeto en donde el sujeto obtiene una puntuación de 1 si el nivel de CRP en la muestra biológica es mayor que el nivel de referencia de CRP y una puntuación de 0 si el nivel de CRP en la muestra biológica es igual o inferior al nivel de referencia de CRP; y

- (iv) proporcionar una puntuación de ferritina para el sujeto en donde el sujeto obtiene una puntuación de 1 si el nivel de ferritina en la muestra biológica es inferior al nivel de referencia de ferritina y una puntuación de 0 si el nivel de ferritina en la muestra biológica es igual o mayor que el nivel de referencia de ferritina;

- (d) sumar las puntuaciones de la etapa (c) para generar una puntuación total; y

- (e) proporcionar un diagnóstico de un sujeto como que padece o está en riesgo de padecer adenomas de alto riesgo o CRC si la puntuación total es superior a una puntuación de referencia o un diagnóstico de que un sujeto no padece o no tiene riesgo de padecer adenomas de alto riesgo o CRC si la puntuación total es igual o inferior a la puntuación de referencia.

2. El método de la reivindicación 1, que comprende adicionalmente: determinar la edad del sujeto en la etapa (b); comparar la edad del sujeto con una edad de referencia en la etapa (c); y

- (v) proporcionar una puntuación de edad para el sujeto en donde el sujeto obtiene una puntuación de 1 si la edad del sujeto es mayor o igual a la edad de referencia y una puntuación de 0 si la edad del sujeto es inferior a la edad de referencia.

3. El método de la reivindicación 1 o 2, en donde el sujeto es masculino o femenino.

4. El método de la reivindicación 3, en donde:

- (a) en un sujeto masculino de al menos 54 años de edad, el nivel de referencia de CEA es de al menos 6,5 ng/ml, el nivel de referencia de CYFRA es de al menos 1,98 ng/ml, el nivel de referencia de CRP es de al menos 1,8 mg/ml y el nivel de referencia de ferritina es menor de 109 ng/ml; y

- (b) en un sujeto femenino de al menos 63 años de edad, el nivel de referencia de CEA es de al menos 4,8 ng/ml, el nivel de referencia de CYFRA es de al menos 1,72 ng/ml, el nivel de referencia de CRP es de al menos 5,5 mg/ml y el nivel de referencia de ferritina es menor de 38 ng/ml.

5. El método de la reivindicación 2, en donde la edad de referencia para un sujeto masculino es 54 y la edad de referencia para un sujeto femenino es de 63.

6. El método de una cualquiera de las reivindicaciones 1-5, en donde la puntuación de referencia es 0, 1, 2, 3, 4, o 5.

7. El método de la reivindicación 6, en donde la puntuación de referencia es 2 o 3 para un sujeto masculino y la puntuación de referencia es 2 para un sujeto femenino.

8. El método de la reivindicación 6 o 7, en donde una puntuación total superior a 2 para un sujeto masculino o femenino indica que el sujeto padece o está en riesgo de padecer adenomas de alto riesgo o CRC.

9. El método de una cualquiera de las reivindicaciones anteriores, que comprende adicionalmente un régimen de detección estructural de CRC o un régimen de vigilancia de CRC hacia el sujeto diagnosticado como que padece o está en riesgo de riesgo de padecer adenomas de alto riesgo o CRC; en donde:

- el régimen de detección estructural del CRC puede ser una colonoscopia o una sigmoidoscopia; y
- el régimen de vigilancia de CRC comprende determinar los niveles de CEA, CYFRA, CRP y ferritina en intervalos periódicos.

10. El método de una cualquiera de las reivindicaciones 1-9, en donde la determinación de los niveles de CEA, CYFRA, CRP y ferritina, comprende un método inmunológico con al menos un anticuerpo capaz de unirse específicamente a CEA, CYFRA, CRP, ferritina o combinaciones de los mismos.

5 11. El método de la reivindicación 10, en donde el método inmunológico comprende:

(a) medir los niveles de CEA mediante:

- 10 (i) poner en contacto la muestra de prueba con al menos un anticuerpo de captura, en donde el anticuerpo de captura se une a un epítipo sobre CEA o un fragmento de CEA para formar un complejo de anticuerpo de captura-antígeno de CEA;
- 15 (ii) poner en contacto el complejo de anticuerpo de captura-antígeno de CEA con al menos un anticuerpo de detección que comprende un marcador detectable, en donde el anticuerpo de detección se une a un epítipo sobre CEA al que no se une el anticuerpo de captura y forma un complejo de anticuerpo de captura-antígeno de CEA-anticuerpo de detección; y
- (iii) determinar los niveles de CEA en la muestra de prueba basándose en la señal generada por el marcador detectable en el complejo de anticuerpo de captura-antígeno de CEA-anticuerpo de detección formado en (a)(ii);

20 (b) medir los niveles de CYFRA mediante:

- (i) poner en contacto la muestra de prueba con al menos un anticuerpo de captura, en donde el anticuerpo de captura se une a un epítipo sobre CYFRA o un fragmento de CYFRA para formar un complejo de anticuerpo de captura-antígeno de CYFRA;
- 25 (ii) poner en contacto el complejo de anticuerpo de captura-antígeno de CYFRA con al menos un anticuerpo de detección que comprende un marcador detectable, en donde el anticuerpo de detección se une a un epítipo sobre CYFRA al que no se une el anticuerpo de captura y forma un complejo de anticuerpo de captura-antígeno de CYFRA-anticuerpo de detección; y
- 30 (iii) determinar los niveles de CYFRA en la muestra de prueba basándose en la señal generada por el marcador detectable en el complejo de anticuerpo de captura-antígeno de CYFRA-anticuerpo de detección formado en (b)(ii);

(c) medir los niveles de CRP mediante:

- 35 (i) poner en contacto la muestra de prueba con al menos un anticuerpo de captura, en donde el anticuerpo de captura se une a un epítipo sobre CRP o un fragmento de CRP para formar un complejo de anticuerpo de captura-antígeno de CRP;
- 40 (ii) poner en contacto el complejo de anticuerpo de captura-antígeno de CRP con al menos un anticuerpo de detección que comprende un marcador detectable, en donde el anticuerpo de detección se une a un epítipo sobre CRP al que no se une el anticuerpo de captura y forma un complejo de anticuerpo de captura-antígeno de CRP-anticuerpo de detección; y
- (iii) determinar los niveles de CRP en la muestra de prueba basándose en la señal generada por el marcador detectable en el complejo de anticuerpo de captura-antígeno de CRP-anticuerpo de detección formado en (c)(ii); y

45

(d) medir los niveles de ferritina mediante:

- 50 (i) poner en contacto la muestra de prueba con al menos un anticuerpo de captura, en donde el anticuerpo de captura se une a un epítipo sobre ferritina o un fragmento de ferritina para formar un complejo de anticuerpo de captura-antígeno de ferritina;
- (ii) poner en contacto el complejo de anticuerpo de captura-antígeno de ferritina con al menos un anticuerpo de detección que comprende un marcador detectable, en donde el anticuerpo de detección se une a un epítipo sobre ferritina al que no se une el anticuerpo de captura y forma un complejo de anticuerpo de captura-antígeno de ferritina-anticuerpo de detección; y
- 55 (iii) determinar los niveles de ferritina en la muestra de prueba basándose en la señal generada por el marcador detectable en el complejo de anticuerpo de captura-antígeno de ferritina-anticuerpo de detección formado en (d)(ii).

60 12. El método de una cualquiera de las reivindicaciones 1-11, que comprende adicionalmente determinar el nivel de al menos un biomarcador adicional de CRC en la muestra biológica seleccionada de: Septina 9 metilada (mS9), Galectina-3 (Gal3), Hemoglobina glucosilada (HbA1c), componente 3 del complemento (C3a), Catepsina X (Cat X), receptor de uroquinasa soluble (suPAR (I)), inhibidor del activador de plasminógeno-1 (PAI-1), Enolasa 2 (ENO2) o combinaciones de los mismos y comparar el nivel de al menos un biomarcador de CRC adicional a un nivel de referencia para al menos un biomarcador adicional de CRC.

65

13. El método de una cualquiera de las reivindicaciones anteriores, en donde la muestra biológica es una muestra de

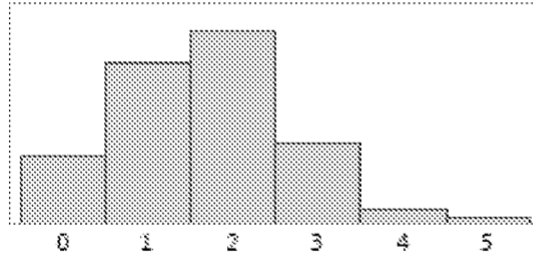
tejido, sangre completa, plasma, suero, orina, fluido de lavado broncoalveolar o una suspensión de cultivo celular o una fracción de la misma.

14. El método de la reivindicación 10, en donde el anticuerpo se selecciona de un anticuerpo policlonal, un anticuerpo monoclonal, un anticuerpo humano, un Fv ligado por disulfuro, un anticuerpo madurado por afinidad, un scFv, un anticuerpo quimérico, un anticuerpo de un solo dominio, un anticuerpo con CDR injertadas, un diacuerpo, un anticuerpo humanizado, un anticuerpo multiespecífico, un Fab, una inmunoglobulina de dominio variable dual (DVD), un Fab', un anticuerpo biespecífico, un F(ab')₂ y un Fv.
- 10 15. Utilización de un kit para realizar el método de una cualquiera de las reivindicaciones 1-14, el kit que comprende:
 - (a) un reactivo capaz de unirse específicamente a CEA, un reactivo capaz de unirse específicamente a CYFRA, un reactivo capaz de unirse específicamente a CRP y un reactivo capaz de unirse específicamente a ferritina, para cuantificar los niveles de CEA, CYFRA, CRP y ferritina en la muestra biológica de un sujeto;
 - 15 (b) una referencia estándar indicando los niveles de referencia de CEA, CYFRA, CRP y ferritina; y opcionalmente
 - (c) al menos un reactivo adicional capaz de unirse específicamente al menos a un biomarcador adicional seleccionado de Septina 9 metilada (mS9), Galectina-3 (Gal3), Hemoglobina glucosilada (HbA1c), componente 3 del complemento (C3a), Catepsina X (Cat X), receptor de uroquinasa soluble (suPAR (I)), inhibidor del activador de plasminógeno-1 (PAI-1), Enolasa 2 (ENO2) o combinaciones de los mismos y
 - 20 (d) una referencia estándar que indique un nivel de referencia del al menos un biomarcador adicional de Septina 9 metilada (mS9), Galectina-3 (Gal3), Hemoglobina glucosilada (HbA1c), componente 3 del complemento (C3a), Catepsina X (Cat X), receptor de uroquinasa soluble (suPAR (I)), inhibidor del activador de plasminógeno-1 (PAI-1), Enolasa 2 (ENO2) o combinaciones de los mismos.

prueba de resultado1

Distribuciones Resultado1=0

x



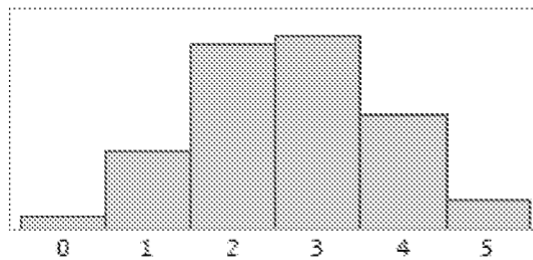
Frecuencias

Nivel	Recuento	Prob
0	76	0,12860
1	184	0,31134
2	221	0,37394
3	91	0,15398
4	15	0,02538
5	4	0,00677
Total	591	1,00000

N ausentes 0
6 Niveles

Distribuciones Resultado1=1

x



Frecuencias

Nivel	Recuento	Prob
0	3	0,01685
1	23	0,12921
2	54	0,30337
3	57	0,32022
4	33	0,18539
5	8	0,04494
Total	178	1,00000

N ausentes 0
6 Niveles

FIG. 1

prueba de resultado5

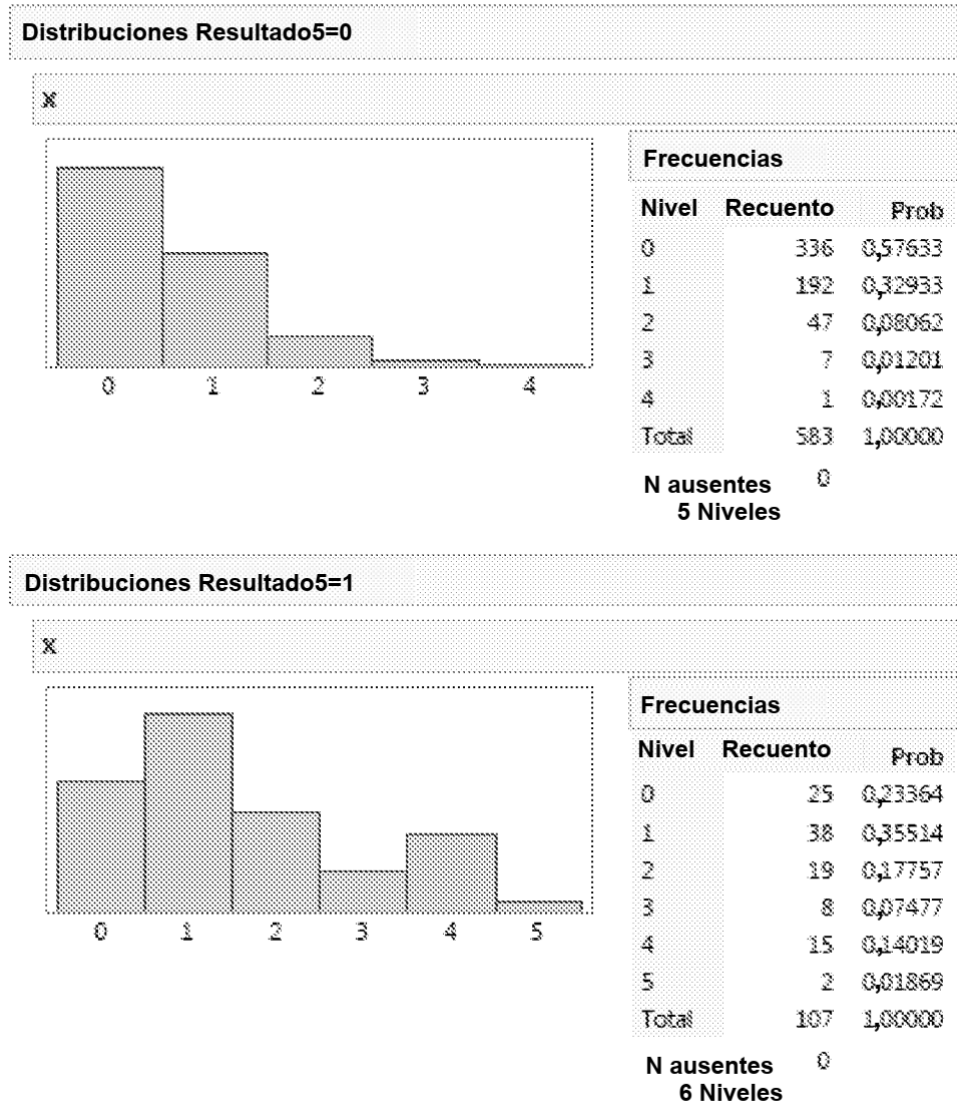


FIG. 2

prueba de resultado12

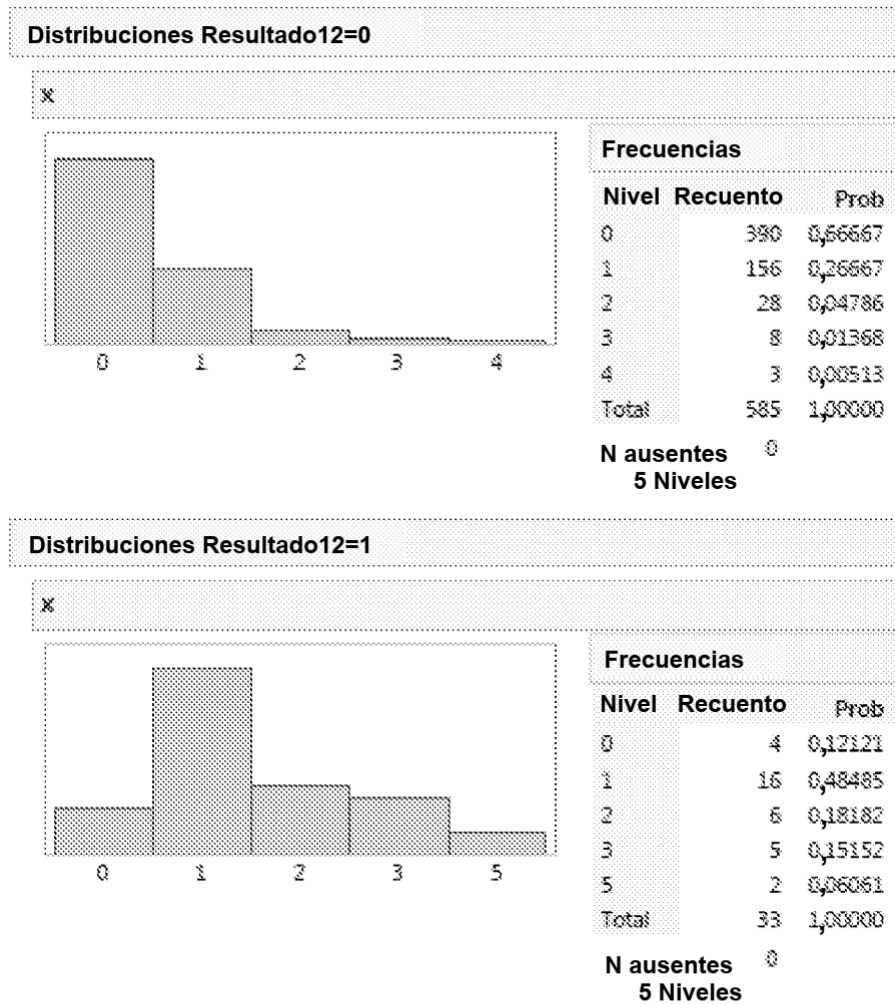


FIG. 3

prueba de resultado1

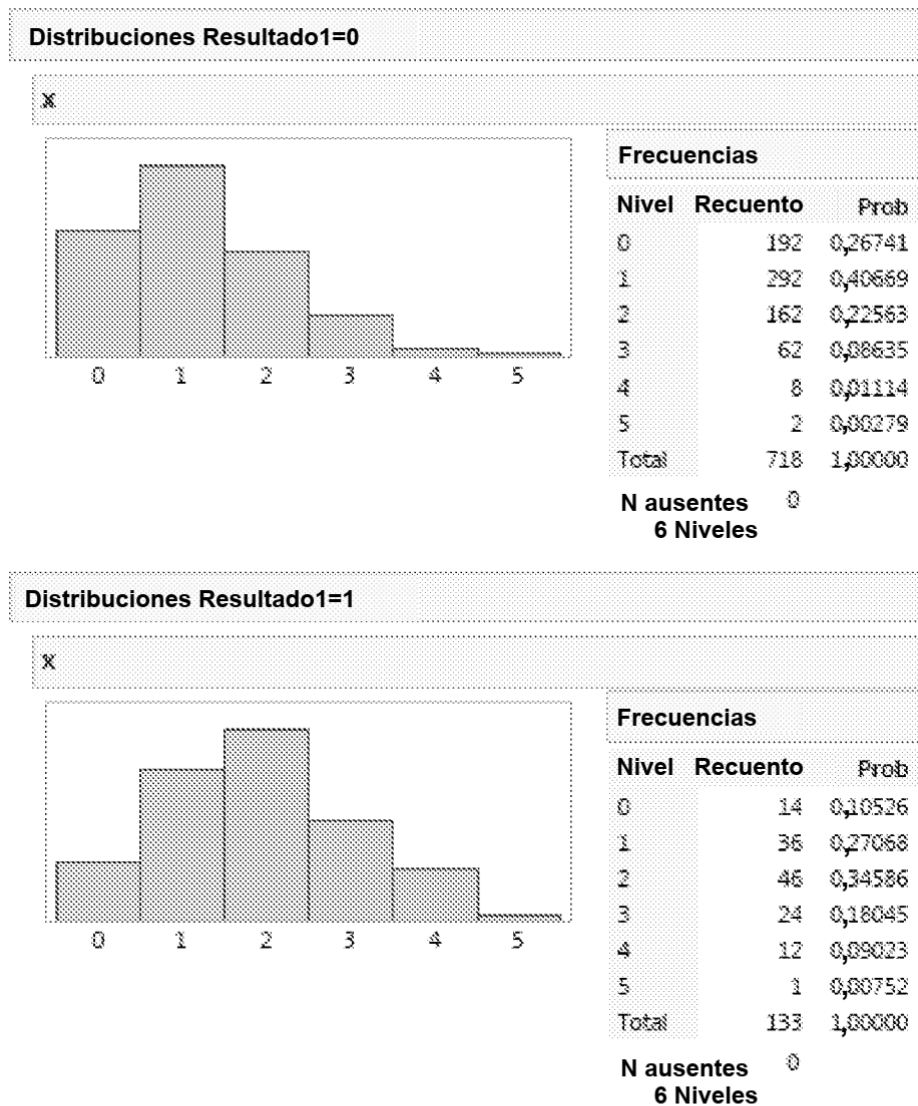


FIG. 4

prueba de resultado5

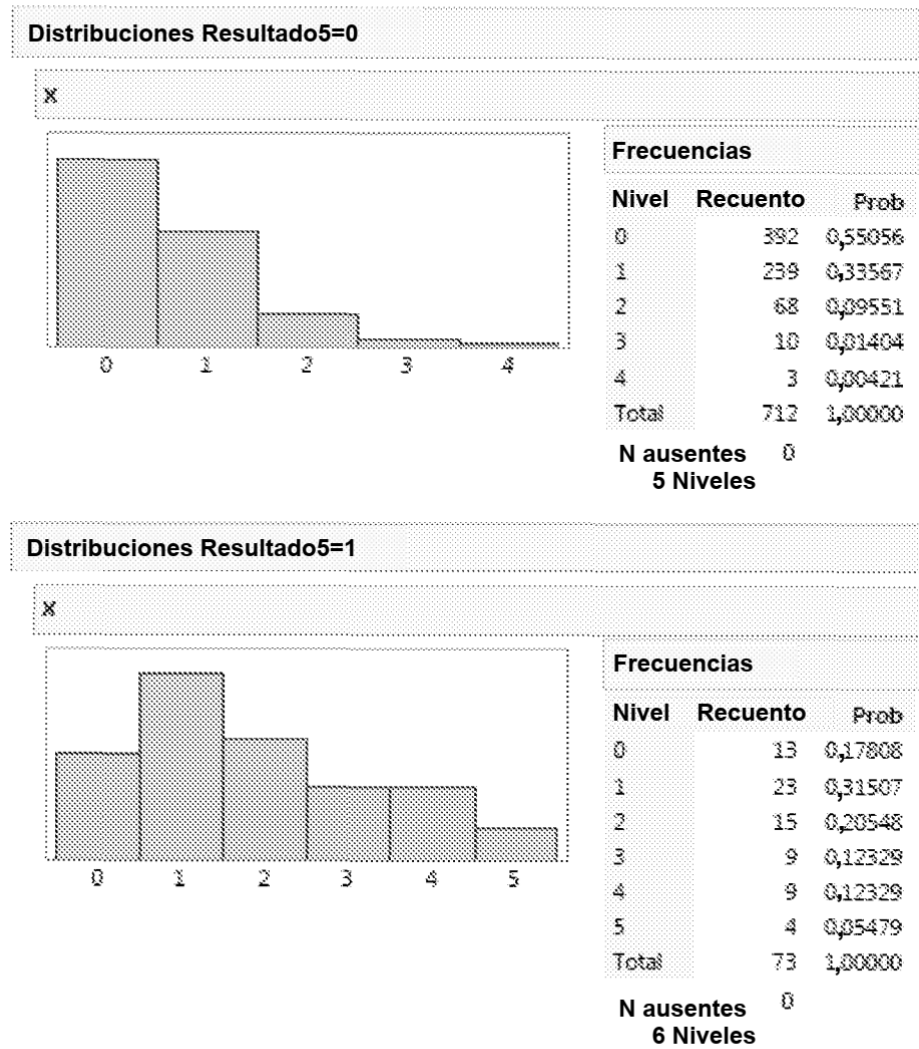


FIG. 5

prueba de resultado12

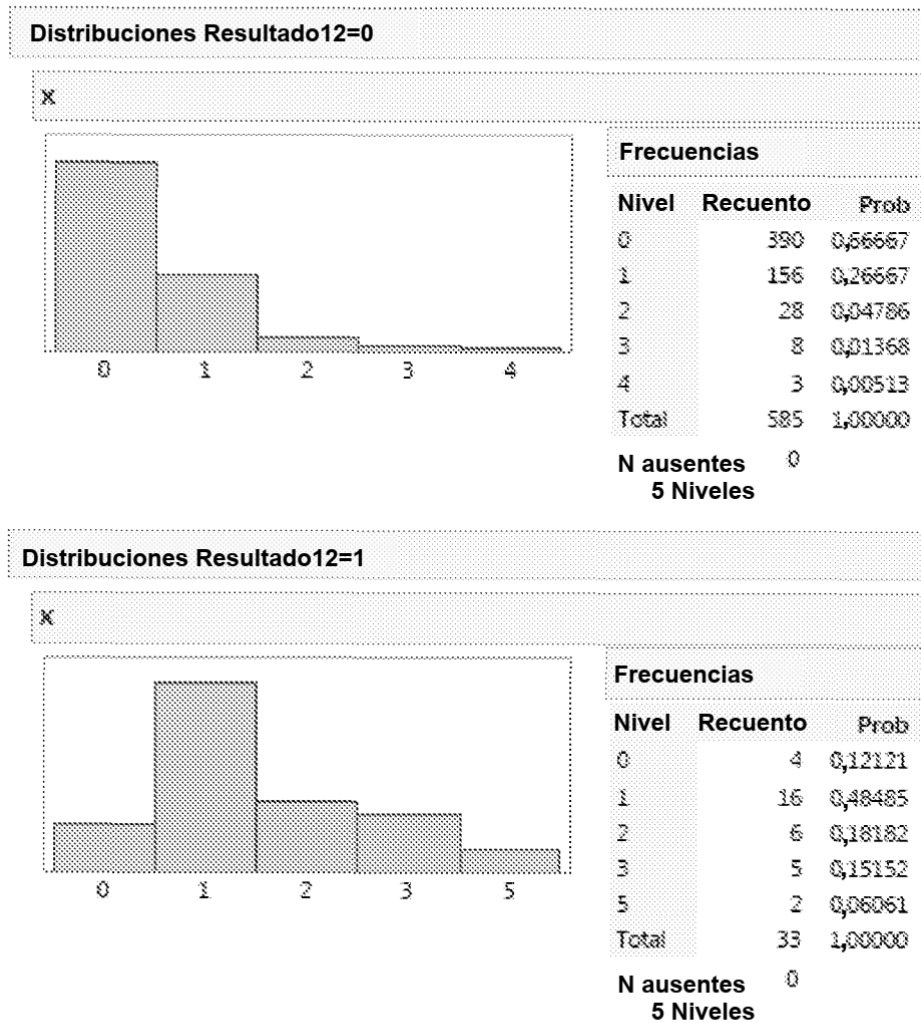


FIG. 6