

19



OFICINA ESPAÑOLA DE
PATENTES Y MARCAS

ESPAÑA



11 Número de publicación: **2 374 194**

51 Int. Cl.:
C12Q 1/68 (2006.01)

12

TRADUCCIÓN DE PATENTE EUROPEA

T3

- 96 Número de solicitud europea: **08718327 .3**
96 Fecha de presentación: **28.03.2008**
97 Número de publicación de la solicitud: **2140028**
97 Fecha de publicación de la solicitud: **06.01.2010**

54 Título: **MÉTODO DE ANÁLISIS DE ÁCIDO NUCLEICO PARA ANALIZAR EL PATRÓN DE METILACIÓN DE ISLAS CPG EN DIFERENTES MUESTRAS.**

30 Prioridad:
30.03.2007 ES 200700965

45 Fecha de publicación de la mención BOPI:
14.02.2012

45 Fecha de la publicación del folleto de la patente:
14.02.2012

73 Titular/es:
Oryzon Genomics, S.A.
C. Sant Ferran, 74
08940 CORNELLÀ DE LLOBREGAT, ES

72 Inventor/es:
MAES, Tamara;
DURANY TURK, Olga y
AIBAR DURÁN, Elena

74 Agente: **Zea Checa, Bernabé**

ES 2 374 194 T3

Aviso: En el plazo de nueve meses a contar desde la fecha de publicación en el Boletín europeo de patentes, de la mención de concesión de la patente europea, cualquier persona podrá oponerse ante la Oficina Europea de Patentes a la patente concedida. La oposición deberá formularse por escrito y estar motivada; sólo se considerará como formulada una vez que se haya realizado el pago de la tasa de oposición (art. 99.1 del Convenio sobre concesión de Patentes Europeas).

DESCRIPCIÓN

Método de análisis de ácido nucleico para analizar el patrón de metilación de islas CpG en diferentes muestras.

5 CAMPO DE LA INVENCION

[0001] La presente invención se enmarca en el campo de la biología molecular. En particular, la presente invención tiene por objeto un método de análisis de ácido nucleico que puede ser utilizado para analizar el patrón de metilación que presentan las islas CpG en diferentes muestras.

10

ANTECEDENTES DE LA INVENCION

[0002] En los últimos tiempos se ha puesto de manifiesto que los factores epigenéticos pueden jugar un papel muy importante en el control genético de procesos celulares, entre ellos el desarrollo del cáncer. Entre estos factores epigenéticos, la metilación de determinados fragmentos de ADN es uno de los más relevantes.

15

[0003] La metilación del ADN es un proceso epigenético que participa en la regulación de la expresión génica de dos maneras: directamente al impedir la unión de factores de transcripción, e indirectamente propiciando la estructura "cerrada" de la cromatina (Singal R, & Ginder GD. DNA methylation. Blood. 1999 Jun 15;93(12):4059-70). El ADN presenta regiones de 1000-1500 pb ricas en dinucleótidos CpG ("islas CpG"), que son reconocidas por las enzimas ADN-metiltransferasas, las cuales, durante la replicación del ADN metilan el carbono de la posición 5 de las citosinas de la cadena recién sintetizada, manteniéndose así la memoria del estado metilado en la molécula hija de ADN. En general se considera que la metilación es un proceso unidireccional, de manera que, cuando una secuencia CpG se metila de novo, esta modificación se hace estable y es heredada como un patrón de metilación clonal. Por otra parte, la alteración en el estado de metilación de genes reguladores (hipometilación o hipermetilación), como evento primario, se asocia frecuentemente con el proceso neoplásico y es proporcional a la severidad de la enfermedad (Paluszczak J, & Baer-Dubowska W. Epigenetic diagnostics of cancer - the application of DNA methylation markers. J Appl Genet. 2006;47(4):365-75).

20

25

[0004] Los genomas de las células preneoplásicas, cancerosas y envejecidas comparten tres cambios importantes en los niveles de metilación, como eventos tempranos en el desarrollo de algunos tumores. Primero, la hipometilación de la heterocromatina que conduce a una inestabilidad genómica e incrementa los eventos de recombinación mitótica; segundo, hipermetilación de genes individuales y, finalmente hipermetilación de las islas CpG de genes constitutivos y genes supresores de tumor. Los dos niveles de metilación pueden presentarse de manera individual o simultánea; en general, la hipermetilación está involucrada en el silenciamiento de genes y la hipometilación en la sobreexpresión de ciertas proteínas involucradas en los procesos de invasión y metástasis.

30

[0005] Las estrategias metodológicas para el análisis del estado de metilación de las islas CpG han estado en constante evolución. La mayoría de los métodos se basan en la transformación química de las citosinas no metiladas a uracilos, por el tratamiento con bisulfito de sodio, que no afecta las 5-metilcitosinas, y marca de forma fidedigna e individual el estado metilado o no metilado de los dinucleótidos CpG. La modificación del ADN, su amplificación por la reacción en cadena de la polimerasa (PCR) y/o secuenciación automatizada son las técnicas más usadas con este propósito (Esteller M. Aberrant DNA methylation as a cancer-inducing mechanism. Annu Rev Pharmacol Toxicol. 2005;45:629-56).

35

40

[0006] En los últimos años la tecnología basada en el análisis del ADN metilado es considerada una poderosa herramienta para el diagnóstico, terapia y pronóstico de enfermedad, así como en el campo de la medicina forense, farmacogenética y en estudios epidemiológicos. La asociación entre el estado hipometilado del ADN y cáncer, y posteriormente su relación con la hipermetilación, se conocen desde 1983; sin embargo, en los últimos cinco años, por el impulso de las nuevas estrategias moleculares para el estudio de la metilación de novo de las islas CpG, el análisis del ADN metilado se ha convertido en un poderoso biomarcador para la detección temprana de cáncer; además, permite clasificar los cánceres considerando los subtipos histológicos, el grado de malignidad, diferencias en la respuesta al tratamiento, y los diversos pronósticos. Una importante y reciente aplicación es precisamente su uso como biomonitor de respuesta a terapia y predictor del pronóstico del cáncer.

45

50

[0007] La metilación del ADN es un marcador epigenético del silenciamiento de genes con aplicación en diversos campos de investigación de la genética y la biomedicina, que mediante la aplicación de procesos metodológicos moleculares permite la distinción individual de los patrones de metilación de las islas CpG. Por otra parte, las características de metilación de los genes involucrados en la neoplasia permiten la clasificación y el pronóstico de los cánceres, y el seguimiento del tratamiento.

55

[0008] El desarrollo de las micromatrices de ADN (también denominadas chips o microarrays de ADN), ha permitido que sean rápidamente integradas en los estudios genómicos, con lo que se obtienen unos mejores niveles de resolución y sensibilidad en el análisis comparativo de ADN genómico y una mayor capacidad de reproducción que permiten la detección fiable de alteraciones a nivel individual en los genes. Gracias a su versatilidad, la tecnología de micromatrices de ADN presenta aplicaciones en los campos de la transcriptómica, la genética y la epigenética.

60

[0009] Hatada et al., "A microarray-based method for detecting methylated loci", Journal of Human Genetics-2002, vol. 47, p. 448-451, describía un método basado en un micromatriz denominado chip de amplificación metilación de ADN (MAD) que comprende las etapas de digerir el ADN con el enzima sensible a metilación SmaI y el enzima no sensible a metilación XmaI, ligar con un adaptador, amplificar por PCR, marcar Cy3/Cy5 y co-hibridar a un micromatriz. El método permite la amplificación específica de las islas CpG, lo que lleva a amplicones útiles en la hibridación que resultan en una elevada sensibilidad. Hatada et al., propone el uso del método para detectar genes o genes supresores de tumor cuyos niveles de expresión son demasiado bajos como para ser detectados mediante un método basado en expresión.

DESCRIPCIÓN RESUMIDA DE LA INVENCIÓN

[0010] La presente invención se refiere a un método de análisis de ácido nucleico que comprende ADN. La presente invención se refiere a un método de análisis de ácido nucleico que comprende una fragmentación del ADN, la ligación de adaptadores específicos, una etapa de amplificación y el marcaje de las muestras utilizando ARN polimerasa. En esta etapa se generan un conjunto de fragmentos de ARN representativos de los fragmentos de ADN a analizar. Estos fragmentos de ARN pueden, por ejemplo, hibridarse posteriormente con una micromatriz de ADN para realizar el análisis. El método de la presente invención puede utilizarse para identificar selectivamente eventos de metilación en las muestras analizadas.

[0011] En una realización, la invención proporciona un método para determinar la metilación de un ácido nucleico. El método de esta realización comprende proporcionar u obtener una muestra que tiene un ácido nucleico, tratar la muestra de ácido nucleico con un enzima de restricción no sensible a metilación, tratar la muestra con un enzima de restricción sensible a metilación, ligar un adaptador al sitio creado por el enzima de restricción no sensible a metilación, someter los ácidos nucleicos ligados al adaptador a condiciones de amplificación, marcar el ácido nucleico amplificado mediante transcripción in vitro, y detectar el ácido nucleico marcado.

[0012] En otra realización, la invención proporciona un método para determinar la metilación de un ácido nucleico. El método de esta realización comprende (1) proporcionar u obtener una muestra que tiene ácido nucleico, (2) tratar la muestra de ácido nucleico con un enzima de restricción no sensible a metilación, (3) tratar la muestra con un enzima de restricción sensible a metilación, (4) ligar un adaptador al sitio creado por el enzima de restricción no sensible a metilación, (5) ligar un adaptador al sitio creado por el enzima de restricción sensible a metilación, en donde dicho adaptador está manipulado genéticamente para incluir un promotor adecuado para la transcripción in vitro, (6) someter los ácidos nucleicos ligados al adaptador a condiciones de amplificación, (7) marcar el ácido nucleico amplificado a transcripción in vitro basada en la secuencia del promotor en el adaptador ligado al sitio creado por el enzima sensible a metilación, y (8) detectar el ácido nucleico marcado. En algunos aspectos de esta realización, las condiciones de amplificación son condiciones de amplificación por PCR. De acuerdo con un aspecto de este método, el tratamiento de un ácido nucleico que es metilado en el sitio de restricción por la endonucleasa de restricción sensible a metilación, produce fragmentos mayores de ADN cuando se comparan con el ácido nucleico no metilado equivalente. Los fragmentos más grandes son amplificados con menos probabilidad. En algunos aspectos de esta realización, los ácidos nucleicos marcados se detectan en un micromatriz.

BREVE DESCRIPCIÓN DE LOS DIBUJOS

[0013]

FIG. 1 muestra un diagrama detallado de las etapas de un ejemplo del método de la presente invención. La etapa (A) se refiere al tratamiento con un enzima de restricción no sensible a metilación (RE1). La etapa (B) se refiere al tratamiento con un enzima de restricción sensible a metilación (RE2). La etapa (C) se refiere a la ligación de un adaptador específico para el sitio creado por RE1 (SARE1) y un adaptador específico para el sitio creado por RE2 (SARE2). En este ejemplo SARE2 tiene una secuencia para un promotor de la ARN polimerasa. La etapa (D) se refiere a la amplificación por PCR. La etapa (E) se refiere al marcaje por transcripción in vitro. De acuerdo con este ejemplo, la muestra metilada no acaba de ser marcada puesto que el fragmento no incluye el promotor para la ARN polimerasa mientras que la muestra no metilada tiene los adaptadores SARE2 ligados al fragmento que tiene el promotor. La etapa (F) se refiere a la hibridación. La etapa (G) se refiere a la detección. La C* se refiere a una citosina metilada en la muestra de ADN metilado mientras que "C" en la muestra no metilada representa una citosina no metilada. El tratamiento con RE2 corta por la citosina no metilada pero no por la citosina metilada.

FIG. 2 muestra los resultados de la digestión de un ADN plasmídico pUC18 y la posterior ligación de adaptadores según se describe en el Ejemplo 1. La distribución de carriles es la siguiente:

- Carril 1.- 50 ng de plásmido pUC18 (2686 bp) sin digerir.
- Carril 2.- 50 ng de plásmido pUC18 + enzima NdeI (resulta una banda lineal de 2686 bp). Tubo 1.

- Carril 3.- 50 ng de digestión Tubo 1+ No Metilado + enzima TspMI (resulta una banda de 2435 bp + otra banda de 251 bp).
- Carril 4.- 50 ng de plásmido pUC18 + enzima Ndel (resulta una banda lineal de 2686 bp).Tubo 2.
- 5 • Carril 5.- 50 ng de digestión Tubo 2 + No Metilado + enzima TspMI (resulta una banda de 2435 bp + otra banda de 251 bp).
- Carril 6.- 50 ng de plásmido pUC18 + enzima Ndel (resulta una banda lineal de 2686 bp).Tubo 3.
- Carril 7.- 50 ng de digestión Tubo 3 + Metilado con Sssl Metilasa + enzima TspMI (no hay modificación de la banda de 2686 bp).
- 10 • Carril 8.- 50 ng de plásmido pUC18 + enzima Ndel (resulta una banda lineal de 2686 bp).Tubo 4.
- Carril 9.- 50 ng de digestión Tubo 4 + Metilado con enzima Sssl Metilasa + enzima TspMI (no hay modificación de la banda de 2686 bp).
- Carril 10.- Control negativo de digestión Ndel, es decir pUC18 sin enzima Ndel (resulta en un perfil de pUC18 original con banda extra resultado de la conformación de superenrollamiento (supercoiled) del plásmido). Tubo 5.
- 15 • Carril 11. Control negativo de digestión Ndel + enzima TspMI. Tubo 5 + digestión con enzima TspMI. (resulta una banda lineal de 2686 bp).

FIG. 3 muestra los resultados de la amplificación de un ADN plasmídico pUC18 según se describe en el Ejemplo 1. La distribución de carriles es la siguiente:

- 20 • Carril 1- PCR de Tubo 1 sin cebadores digerido con Ndel+TspMI ligado. Control negativo (no amplificación).
- Carril 2- PCR de Tubo 1 digerido con Ndel+TspMI – no metilado y ligado (resulta en una banda de 2435 bp + otra banda de 251 bp).
- Carril 3- PCR de Tubo 2 digerido con Ndel+TspMI – no metilado y ligado (resulta en una banda de 2435 bp + otra banda de 251 bp).
- 25 • Carril 4- PCR de Tubo 3 digerido con Ndel+TspMI – metilado y ligado. (resulta en una única banda de 2686 bp).
- Carril 5- PCR de Tubo 4 digerido con Ndel+TspMI – metilado y ligado (resulta en una única banda de 2686 bp).
- Carril 7- Control positivo de PCR.
- 30 • Carril 8- Control negativo de PCR.

FIG. 4 muestra los resultados de la etapa de transcripción in vitro según se describe en el ejemplo 1. La distribución de carriles es la siguiente:

- 35 • Carril 1- Transcripción in vitro resultado de Tubo 2. (plásmido digerido con Ndel+TspMI no metilado). Resultan dos bandas mayoritarias que corresponden con las bandas amplificadas en la PCR de 2435 bp + la banda 251 bp. La presencia de otras dos bandas aproximadamente a 900 bp y 500 bp se explicarían como bandas inespecíficas producidas por la PCR o bien artefactos como resultado de una concatenación del fragmento pequeño de 251 bp del plásmido.
- 40 • Carril 2- Transcripción in vitro resultado de Tubo 2. (plásmido digerido con Ndel+TspMI metilado). En este carril se observa que no hay presencia de ARN marcado cuando la muestra se halla metilada ya que no ha habido corte por TspMI y por lo tanto no ha habido ligación ni producto de PCR que contenga el promotor T7.

DESCRIPCIÓN DE LA INVENCION

45 **[0014]** La presente invención se refiere al descubrimiento de métodos y composiciones útiles en el análisis de ácidos nucleicos. El método es útil en la caracterización del estado de metilación o perfil de metilación de ADN. Las composiciones de la invención se pueden usar para determinar la metilación del ADN de un ADN genómico. El método es útil en numerosas aplicaciones que incluyen el diagnóstico y pronóstico de enfermedades que tienen los

patrones de metilación de ADN alterados. El método de la invención también es útil para el descubrimiento de biomarcadores. La invención se puede usar para identificar biomarcadores específicos asociados con fenotipos y para determinar la huella de metilación (por ejemplo, patrones, estados, perfiles o el metiloma). Cuando se determinan los patrones, estados, perfiles de metilación y el metiloma por los métodos de la invención, se pueden asociar con fenotipos (pronóstico, diagnóstico, respuesta a terapia, etc.). El método y las composiciones de la invención son útiles en la determinación de los patrones de metilación del genoma completo.

[0015] En una realización, la presente invención proporciona un método de análisis de ácido nucleico que comprende las siguientes etapas:

- a) fragmentación de una muestra de ADN genómico, con al menos un enzima de restricción sensible a metilación y al menos un enzima de restricción no sensible a metilación,
- b) ligación, en los extremos de los fragmentos de ADN obtenidos, de adaptadores específicos donde uno de los adaptadores específicos comprende una secuencia promotora funcional,
- c) amplificación de los fragmentos que incluyen ambos adaptadores utilizando cebadores específicos basados en los adaptadores,
- d) marcaje de los fragmentos de ADN amplificados mediante transcripción in vitro con una ARN polimerasa capaz de iniciar la transcripción a partir de la secuencia promotora contenida en uno de los adaptadores utilizando una mezcla de nucleótidos y
- e) determinación del estado de metilación de la muestra.

[0016] En una realización de la invención, la fragmentación de una muestra de ADN genómico se realiza mediante digestión en primer lugar con al menos un enzima de restricción no sensible a metilación y posteriormente con al menos un enzima de restricción sensible a metilación.

[0017] En una realización de la invención, la fragmentación de una muestra de ADN genómico se realiza mediante digestión en primer lugar con al menos un enzima de restricción sensible a metilación y posteriormente con al menos un enzima de restricción no sensible a metilación.

[0018] En una realización de la invención, la fragmentación de una muestra de ADN genómico se realiza mediante digestión con al menos un enzima de restricción no sensible a metilación y simultáneamente con al menos un enzima de restricción sensible a metilación.

[0019] En una realización de la invención, el enzima de restricción no sensible a metilación reconoce una diana de restricción de 4, 5 ó 6 pares de bases.

[0020] En una realización de la invención, el enzima de restricción no sensible a metilación se selecciona entre el grupo formado por Bfal, Taql, Msel y Ndel.

[0021] En una realización de la invención, el enzima de restricción sensible a metilación reconoce una diana de un enzima de restricción de 4, 5 ó 6 pares de bases.

[0022] En una realización de la invención, el enzima de restricción sensible a metilación se selecciona entre el grupo que comprende Smal, Paul, TspMI, BsePI, y BssHII.

[0023] En una realización de la invención, el adaptador específico que comprende una secuencia promotora funcional es el adaptador específico para el enzima de restricción sensible a metilación.

[0024] En una realización de la invención, el marcaje comprende la incorporación de análogos de nucleótidos que contienen marcajes detectables directamente, tales como fluoróforos, análogos de nucleótidos que incorporan marcajes que pueden ser detectados en una reacción posterior, tales como biotina o haptenos, o cualquier otro tipo de marcaje de ácidos nucleicos.

[0025] En una realización de la invención, el análogo de nucleótido se selecciona entre el grupo que comprende Cy3-UTP, Cy5-UTP, fluoresceína-UTP, biotina-UTP y aminoalil-UTP.

[0026] El término secuencia promotora funcional se refiere a una secuencia de nucleótidos que puede ser reconocida por una ARN polimerasa y a partir de la cual se puede iniciar la transcripción. En general, cada ARN polimerasa reconoce una secuencia específica, por lo que la secuencia promotora funcional comprendida en los adaptadores se elige de acuerdo con la ARN polimerasa que se utilice. Ejemplos de ARN polimerasas que pueden utilizarse en el método de la presente invención incluyen, pero no se limitan a, T7 ARN polimerasa, T3 ARN polimerasa y SP6 ARN polimerasa.

- [0027]** La determinación del estado de metilación de la muestra puede llevarse a cabo mediante cualquier técnica de análisis de ácidos nucleicos.
- [0028]** En una realización de la invención, la determinación del estado de metilación de la muestra se realiza mediante hibridación de los fragmentos de ADN obtenidos en la etapa d) con los oligonucleótidos inmovilizados sobre una micromatriz de ADN, la detección del marcaje incorporado en los fragmentos a analizar y la comparación cuantitativa de los valores de las señales de los fragmentos hibridados con los valores de las señales de referencia.
- [0029]** En una realización de la invención, los oligonucleótidos inmovilizados sobre la micromatriz se diseñan de manera que incluyan la diana de restricción del enzima de restricción sensible a metilación.
- [0030]** En una realización de la invención, los oligonucleótidos inmovilizados sobre la micromatriz se diseñan de manera que estén localizados entre las dianas de restricción del enzima de restricción sensible a metilación.
- [0031]** El término micromatriz o micromatriz de ADN se refiere a una colección de múltiples oligonucleótidos inmovilizados sobre un sustrato sólido, donde cada oligonucleótido está inmovilizado en una posición conocida de forma que la hibridación con cada uno de los múltiples oligonucleótidos se puede detectar por separado. El sustrato puede ser sólido o poroso, plano o no plano, unitario o distribuido. Las micromatrices de ADN sobre las que se puede llevar a cabo la hibridación y detección pueden ser elaboradas con oligonucleótidos depositados por cualquier mecanismo o con oligonucleótidos sintetizados in situ mediante fotolitografía o por cualquier otro mecanismo.
- [0032]** La presente invención también tiene por objeto un kit que comprende los reactivos, enzimas y aditivos necesarios para llevar a cabo el método de análisis de ácidos nucleicos de la invención.
- [0033]** En una realización, la presente invención proporciona un kit que comprende, (a) un componente para la fragmentación de una muestra de ADN, (b) un componente para la ligación de adaptadores específicos a los extremos de los fragmentos de ADN obtenidos, (c) uno o más adaptadores para ligar al ADN fragmentado, en donde al menos uno de los adaptadores específicos comprende una secuencia promotora funcional, (d) un componente para la amplificación de los fragmentos que incluyen ambos adaptadores usando cebadores específicos basados en los adaptadores, y (e) un componente para marcar los fragmentos de ADN amplificados por transcripción in vitro con una ARN polimerasa capaz de iniciar la transcripción a partir de la secuencia promotora contenida en uno de los adaptadores usando una mezcla de nucleótidos.
- [0034]** El componente para la fragmentación de una muestra de ADN comprende una o más endonucleasas. En un aspecto, el componente para la fragmentación de ADN comprende una endonucleasa de restricción sensible a metilación y una endonucleasa de restricción no sensible a metilación. En un aspecto, la endonucleasa de restricción sensible a metilación se selecciona del grupo que consiste en SmaI, PvuII, TspMI, BsePI y BssHII. En un aspecto, la endonucleasa de restricción no sensible a metilación se selecciona del grupo que consiste en MspI, TaqI, XmaI y FspBI.
- [0035]** El componente para la ligación de adaptadores específicos a los extremos de los fragmentos de ADN comprende una ligasa. En un aspecto, la ligasa es una ADN ligasa T4.
- [0036]** El uno o más adaptadores para la ligación al ADN fragmentado son en donde al menos uno de los adaptadores específicos comprende una secuencia promotora funcional y en donde los adaptadores se diseñan para hibridar con los extremos cohesivos creados por la fragmentación del ADN.
- [0037]** El componente para la amplificación de los fragmentos se puede utilizar para amplificar el ADN genómico fragmentado usando cebadores específicos basados en los adaptadores. En un aspecto, el componente para la amplificación comprende cebadores específicos basados en la secuencia de los adaptadores. En un aspecto, el componente para la amplificación comprende una polimerasa. En un aspecto, la polimerasa es la Taq polimerasa. En un aspecto, el componente para la amplificación comprende dNTPs. En un aspecto, el componente para la amplificación comprende cebadores específicos basados en la secuencia de los adaptadores, dNTPs y una polimerasa.
- [0038]** El componente para el marcaje de los fragmentos de ADN amplificados por transcripción in vitro comprende una ARN polimerasa capaz de iniciar la transcripción a partir de la secuencia promotora contenida en uno de los adaptadores usando una mezcla de nucleótidos.
- [0039]** Otro objeto de la presente invención es el uso del método descrito anteriormente para analizar el patrón de metilación que presentan las islas CpG en la muestra analizada.
- [0040]** La presente invención también tiene por objeto el uso del método descrito anteriormente para el diagnóstico de un estado patológico.
- [0041]** En una realización de la invención, el estado patológico es cáncer. En otra realización de la invención, el estado patológico es una enfermedad neurodegenerativa.

[0042] La muestra de ADN (o ácido nucleico) a usar en la invención puede proceder de cualquier fuente y/o organismo. Por ejemplo, el ADN puede proceder de células humanas, células humanas cancerosas, líneas celulares cancerígenas, células de mamífero, células cancerosas de mamífero, células de ratón, células cancerosas obtenidas de ratones, células de plantas, etc. La muestra de ADN también se puede obtener mediante varios métodos, por ejemplo a partir de una biopsia, muestra de sangre, aspirado, sección de tejido, muestra de fluido, frotis (en inglés "swab"), etc.

[0043] La invención permite la determinación del perfil de metilación del genoma de una célula o un grupo de células. El perfil de metilación de una célula, tejido o fluido se puede correlacionar con información fenotípica específica y/o comparada con perfiles de metilación "normales". El perfil de metilación se puede utilizar también para información pronóstica y/o diagnóstica.

[0044] El método de la presente invención se basa en la digestión del material genómico con enzimas de restricción (ER) y la introducción de adaptadores específicos para los puntos de corte. Mediante la selección de parejas de ER, para los fragmentos generados con la combinación de ambos ER, si uno de los adaptadores incorpora la secuencia de unión (es decir, promotora) de una ARN-polimerasa, será posible la transcripción in vitro de ese fragmento para su amplificación lineal y su marcaje.

[0045] Considerando esta aproximación, podemos plantear la siguiente situación: ER2 es el enzima para el que se utilizará un adaptador que comprende la secuencia de unión (es decir promotora) de una ARN-polimerasa y ER1 es el segundo enzima cuyo adaptador no contiene la secuencia promotora de una ARN-polimerasa. Tras las etapas de fragmentación, ligación y amplificación, sólo los fragmentos que incluyen el segmento de ER2 (ER1-ER2; ER2-ER1; ER2-ER2) son capaces de ser amplificados y marcados por transcripción in vitro. Los fragmentos ER1-ER1 son capaces de ser amplificados pero no se pueden marcar por transcripción in vitro (no disponen de sitio de unión (es decir, promotora) para la ARN-polimerasa) y no generarán material final.

[0046] FIG. 1 muestra un diagrama de un ejemplo del método de la presente invención donde se indican las etapas que conforman dicho ejemplo.

[0047] En el método de la presente invención se amplifican en la etapa c) preferentemente aquellos fragmentos de ADN que provienen de fragmentos digeridos tanto por enzimas sensibles a metilación como no sensibles a metilación y que presentan fragmentos estadísticamente de menor tamaño, y se marcarán sólo los fragmentos que han incorporado el adaptador con el promotor. Esto representa una ventaja respecto a otros métodos conocidos en el estado de la técnica, como por ejemplo el que se describe en WO2006088978, en los que se amplifican fragmentos que presentan estadísticamente mayor tamaño, es decir, fragmentos no sensibles a la digestión con el enzima no sensible a metilación, lo que puede reducir la eficiencia y la fiabilidad de la amplificación.

[0048] El método de la presente invención permite obtener como producto final una pluralidad de ARN marcados, los cuales a su vez pueden constituir la muestra que posteriormente se puede hibridar con una micromatriz de ADN, lo que comporta algunas ventajas en relación a otros métodos. Por un lado, la interacción ARN-ADN es más fuerte que la interacción ADN-ADN, pudiendo obtenerse un aumento de la intensidad de la señal promedio. Por otro lado, la cadena simple de ARN no encuentra competencia por parte de moléculas complementarias presentes en solución para la hibridación sobre la micromatriz, con lo que se puede obtener un mayor grado de hibridación con los oligonucleótidos de la superficie de la micromatriz de ADN.

[0049] Tal y como se utiliza en el presente documento, la expresión "perfil de metilación" se refiere a un conjunto de datos que representan los estados de metilación de uno o más loci dentro de una molécula de ADN procedente de, por ejemplo, el genoma de un individuo o células o tejidos de un individuo. El perfil puede indicar el estado de metilación de cada base en un individuo, puede tener información sobre un subconjunto de pares de bases (por ejemplo, el estado de metilación de promotores específicos o la cantidad de promotores) en un genoma o puede tener información sobre la densidad regional de metilación de cada locus.

[0050] Tal y como se utiliza en el presente documento, la expresión "estado de metilación" se refiere a la presencia, ausencia y/o cantidad de metilación en un nucleótido o nucleótidos en una porción de ADN. El estado de metilación de una secuencia de ADN concreta puede indicar el estado de metilación de cada base en la secuencia o puede indicar el estado de metilación de un subconjunto de pares de bases (por ejemplo, si la base es citosina o 5-metilcitosina) dentro de la secuencia. El estado de metilación puede también indicar la información sobre la densidad regional de metilación en una secuencia sin especificar la localización exacta.

[0051] Tal y como se utiliza en el presente documento, la expresión "ligación" se refiere a cualquier proceso de formación de enlaces fosfodiéster entre dos o más polinucleótidos, tales como los que comprenden ADNs de doble cadena. Técnicas y protocolos para la ligación se pueden encontrar en manuales y referencias estándar de laboratorio. Sambrook et al., In: Molecular Cloning. A Laboratory Manual 2nd Ed.; Cold Spring Harbor Laboratory Press, Cold Spring Harbor, N.Y. (1989) y Maniatis et al., pg. 146.

[0052] Tal y como se utiliza en el presente documento, la expresión "sonda" se refiere a cualquier ácido nucleico u oligonucleótido que forma una estructura híbrida con una secuencia de interés en una región (o secuencia) de un gen diana debido a la complementariedad de al menos una secuencia en la sonda con una secuencia en una región diana.

5 **[0053]** Tal y como se utiliza en el presente documento, las expresiones "ácido nucleico", "polinucleótido" y "oligonucleótido" se refieren a regiones de ácido nucleico, segmentos de ácido nucleico, cebadores, sondas, amplicones y fragmentos oligoméricos. Las expresiones no se limitan por la longitud y son genéricas para polímeros lineales de polidesoxirribonucleótidos (que contienen 2-desoxi-D-ribosa), polirribonucleótidos (que contienen D-ribosa), y cualquier otro N-glicósido de una base purina o pirimidina, o bases de purina o pirimidina modificadas. Estas expresiones incluyen ADN de cadena sencilla o doble, así como ARN de cadena sencilla o doble. Un ácido nucleico, polinucleótido u oligonucleótido puede comprender, por ejemplo, engarces fosfodiéster o engarces modificados que incluyen, pero no se limitan a, fosfotriéster, fosforamidita, siloxano, carbonato, carboximetiléster, acetamidato, carbamato, tioéter, puente de fosforamidita, puente de metilfosfonato, fosforotioato, metilfosfonato, fosforoditioato, puente de fosforotioato o engarces de sulfona y combinaciones de dichos engarces.

10 **[0054]** Tal y como se utiliza en el presente documento, "Isla CpG", se refiere a cualquier región de ADN en la que la composición en GC está por encima del 50% en una "ventana de ácido nucleico" que tiene una longitud mínima de 200 nucleótidos bp y un contenido en CpG superior al 0.6.

15 **[0055]** Tal y como se utiliza en el presente documento, la expresión "promotor" se refiere a una secuencia de nucleótidos que se localiza en el extremo 5' de un marco de lectura abierto de un gen. Los promotores comprenden generalmente secuencias de ácido nucleico que se unen a proteínas tales como, pero no se limitan a, ARN polimerasa y varias histonas.

20 **[0056]** En algunas realizaciones, el estado de metilación de al menos una citosina, una isla CpG o promotor se compara con el estado de metilación de un locus control. En algunas realizaciones, el locus control es un control endógeno (por ejemplo, comparación de tejido tumoral respecto tejido sano del mismo origen que el tumor). En algunas realizaciones, el locus control es un gen exógeno (por ejemplo, comparación del ADN de un tejido de un individuo con el ADN del mismo tejido de otro individuo).

25 **[0057]** En algunos aspectos de la invención, el estado de metilación del tejido normal se compara con el estado de metilación del tejido con la patología. Con el método de la invención se pueden utilizar varias variantes de estas comparaciones, incluyendo la comparación del tejido normal de un grupo de sujetos con el tejido con patología emparejado de un grupo de pacientes. Por ejemplo, el estado de metilación del tejido de cáncer de próstata obtenido de pacientes que tienen cáncer de próstata se puede comparar con tejido de próstata normal no canceroso (ya sea derivado de la población de muestras de pacientes y/o de pacientes sanos). Otro ejemplo puede usar otro tejido en lugar del tejido con la patología: macrófagos de la piel procedentes de pacientes sanos comparados con macrófagos de la piel de pacientes que tienen la patología (por ejemplo, cáncer de pulmón). Con un tamaño de muestra adecuado y un diseño experimental suficiente, los cambios en el estado de metilación entre grupos normales y con la patología pueden identificar biomarcadores que correlacionen con la característica de interés (por ejemplo, diagnóstico, pronóstico, probabilidad de respuesta a un agente terapéutico, etc.). La invención, por lo tanto, permite la determinación del perfil de metilación del genoma de una célula o grupo de células. El perfil de metilación de una célula, tejido o fluido se puede correlacionar con información fenotípica específica y/o comparar con los perfiles de metilación "normales" para identificar patrones o marcadores específicos asociados con una determinada información fenotípica.

30 **[0058]** En todavía otra realización, la presente invención proporciona métodos de diagnóstico o predicción de cáncer mediante determinación del perfil de metilación del genoma completo. El método de esta realización puede comprender (1) obtener una muestra de prueba de células o tejido, (2) obtener una muestra control de células o tejido que es normal, y (3) detectar o medir tanto en la muestra de prueba como en la muestra control el perfil de metilación del genoma completo usando el método de la invención. Si el perfil de metilación de la muestra de prueba está alterado, comparado con el de la muestra control (o valor), esto indica un cáncer o afección precancerosa en las células de la muestra de ensayo. Si el nivel de metilación de uno o más supresores de tumor es alto en la muestra de prueba, cuando se compara con la muestra control (valor), esto indica un cáncer o afección precancerosa en las células o tejido de prueba. Si el nivel de metilación de uno o más oncogenes (por ejemplo, genes cuya mayor expresión confiera un fenotipo más neoplásico o canceroso (tal como EGFR)) es menor en la muestra de ensayo cuando se compara con la muestra control (o valor), esto indica cáncer o una afección precancerosa en las células o tejido de la muestra de ensayo. En otro aspecto, la muestra control se puede obtener de un individuo diferente o puede ser un valor normalizado basado en datos de una línea base obtenidos de una población.

55 **[0059]** En una realización, el método de la invención se usa en la determinación de si dos o más tumores son más probables que hayan surgido de manera independiente o que sean más probablemente clonales (por ejemplo, primario y metástasis). De acuerdo con este método, se comparan los perfiles de metilación determinado por el método de la invención. Si los perfiles de metilación son sustancialmente similares, indican que con mucha

probabilidad sean clonales mientras que perfiles de metilación sustancialmente diferentes indican que es más probable que tengan un origen independiente.

5 **[0060]** En todavía otra realización, el método de la invención proporciona un método de análisis de ácido nucleico. De acuerdo con esta realización, el ADN se extrae o se proporciona. En un aspecto específico de esta realización, el ADN se extrae homogeneizando el tejido en condiciones de frío, de manera que el ADN no se degrade (por ejemplo, estas condiciones se consiguen usando nitrógeno líquido (-180°C) y con refrigeración continua del mortero y tejido en uso). A continuación, el tejido homogeneizado se vuelve a suspender en un tampón de extracción de ADN (por ejemplo, 100 mM Tris-HCl; 50 mM EDTA pH 8; 500 mM NaCl). En algunos aspectos de esta realización, los tejidos que se han vuelto a suspender se llevan a 65 °C. En algunos aspectos, la muestra se trata para destruir o eliminar ARN (por ejemplo, se añade ARNasa A). En algunos aspectos de este método, el tejido que se ha vuelto a suspender se trata con un agente que rompe o elimina proteína (por ejemplo, se añade 20 µl de Proteinasa K y SDS). En algunos aspectos, se añade a continuación un disolvente a la muestra que se ha vuelto a suspender (por ejemplo, se añade fenol-cloroformo). A continuación, se puede precipitar el ADN (por ejemplo, adición de acetato sódico y etanol al 100%). En algunos aspectos, el precipitado se lava y se disuelve a continuación (por ejemplo, en 15 50 µl de agua estéril). El resultado de estas etapas es proporcionar ADN de suficiente pureza para proceder con las etapas restantes de esta realización. Como reconocerá el experto en la materia, otros métodos o variantes de estos métodos pueden proporcionar un ADN de suficiente pureza como para proceder con las etapas restantes del método.

20 **[0061]** A continuación, el ADN se digiere con una endonucleasa no sensible a metilación (por ejemplo, Bfal) y una endonucleasa sensible a metilación (por ejemplo, TspMI) ya sea secuencial (cualquier tratamiento puede ser el primero) o a la vez. A continuación, los fragmentos de ADN generados durante la digestión se ligan a los adaptadores (por ejemplo, un adaptador de Bfal compatible con el extremo cohesivo del enzima Bfal y el adaptador de TspMI compatible con el extremo cohesivo de TspMI) con una ligasa (por ejemplo, ADN ligasa de T4). Como el experto en la materia reconoce, se pueden sustituir por otros enzimas de restricción y adaptadores los descritos más arriba.

25 **[0062]** Los fragmentos ligados a adaptador se amplifican, a continuación (por ejemplo, los fragmentos Bfal/TspMI se amplifican por PCR usando dos cebadores específicos basados en la secuencia de adaptadores.

30 **[0063]** El ADN amplificado por PCR se somete a continuación a condiciones suficientes para transcripción in vitro (por ejemplo, transcripción in vitro a ARN a partir de una secuencia promotora contenida en el adaptador para la endonucleasa sensible a metilación). Esta reacción se puede llevar a cabo por duplicado usando nucleótidos marcados de manera diferente.

[0064] Los ácidos nucleicos resultantes se pueden detectar a continuación (por ejemplo, hibridados a una micromatriz de ácido nucleico).

35 **[0065]** En algunas realizaciones, el método comprende determinar el estado de metilación de al menos 1, 2, 3, 4, 5, 6, 7, 8, 9, 10, 15, 20, 25, 30, 35, 40, 50, 75 ó 100, 150, 200, 250, 300, 400, 500, 750 ó 1000 citosinas en una muestra de ADN.

[0066] En algunas realizaciones, el método comprende determinar el estado de metilación de al menos 1, 2, 3, 4, 5, 6, 7, 8, 9, 10, 15, 20, 25, 30, 35, 40, 50, 75 ó 100, 150, 200, 250, 300, 400, 500, 750 ó 1000 promotores en una muestra de ADN.

40 **[0067]** En algunas realizaciones, el método comprende determinar el estado de metilación de al menos 1, 2, 3, 4, 5, 6, 7, 8, 9, 10, 15, 20, 25, 30, 35, 40, 50, 75 ó 100, 150, 200, 250, 300, 400, 500, 750 ó 1000 islas CpG en la muestra de ADN.

45 **[0068]** En una realización, la invención proporciona una micromatriz para determinar el estado de metilación de al menos 1, 2, 3, 4, 5, 6, 7, 8, 9, 10, 11, 12, 13, 14, 15, 20, 25, 30, 35, 40, 45 ó 50 promotores supresores de tumor. De acuerdo con esta realización, la micromatriz se diseña para que tenga sondas que determinen el estado de metilación (o perfil) de cada promotor para cada supresor de tumor, de acuerdo con el método de la invención.

50 **[0069]** En una realización, la invención proporciona una micromatriz para determinar el estado de metilación de al menos 1, 2, 3, 4, 5, 6, 7, 8, 9, 10, 11, 12, 13, 14, 15, 20, 25, 30, 35, 40, 45 ó 50 oncogenes. De acuerdo con esta realización, la micromatriz se diseña para que tenga sondas que determinen el estado de metilación (o perfil) de cada promotor para cada oncogén tumoral, de acuerdo con el método de la invención.

55 **[0070]** La práctica de la presente invención utiliza, a menos que se indique de otra manera, técnicas convencionales de química, biología molecular, microbiología, ADN recombinante, genética, inmunología, biología celular, cultivos celulares y biología transgénica, que forman parte del conocimiento del experto. Véase, por ejemplo, Maniatis, T., et al. (1982) Molecular Cloning: A Laboratory Manual (Cold Spring Harbor Laboratory, Cold Spring Harbor, N.Y.); Sambrook, J., et al. (1989) Molecular Cloning: A Laboratory Manual, 2nd Ed. (Cold Spring Harbor Laboratory, Cold

Spring Harbor, N.Y.); Ausubel, F. M., et al. (1992) Current Protocols in Molecular Biology, (J. Wiley and Sons, NY); Glover, D. (1985) DNA Cloning, I and II (Oxford Press); Anand, R. (1992) Techniques for the Analysis of Complex Genomes, (Academic Press); Guthrie, G. and Fink, G. R. (1991) Guide to Yeast Genetics and Molecular Biology (Academic Press); Harlow and Lane (1988) Antibodies: A Laboratory Manual (Cold Spring Harbor Laboratory, Cold Spring Harbor, N.Y.); Jakoby, W. B. and Pastan, I. H. (eds.) (1979) Cell Culture. Methods in Enzymology, Vol. 58 (Academic Press, Inc., Harcourt Brace Jovanovich (NY); Nucleic Acid Hybridization (B. D. Hames & S. J. Higgins eds. 1984); Transcription And Translation (B. D. Hames & S. J. Higgins eds. 1984); Culture Of Animal Cells (R. I. Freshney, Alan R. Liss, Inc., 1987); Immobilized Cells And Enzymes (IRL Press, 1986); B. Perbal, A Practical Guide To Molecular Cloning (1984); the treatise, Methods In Enzymology (Academic Press, Inc., N.Y.); Gene Transfer Vectors For Mammalian Cells (J. H. Miller and M. P. Calos eds., 1987, Cold Spring Harbor Laboratory); Methods In Enzymology, Vols. 154 and 155 (Wu et al. eds.), Immunochemical Methods In Cell And Molecular Biology (Mayer and Walker, eds., Academic Press, London, 1987).

EJEMPLOS

[0071] A continuación se describen algunos ejemplos no limitativos del método de la presente invención.

15 **Ejemplo 1: Análisis del estado de metilación de un fragmento de ADN**

Digestión de ADN y ligación de adaptadores

[0072] Se digirió el ADN plasmídico pUC18 (500 ng) con NdeI (enzima no sensible a metilación) (Fermentas) durante toda la noche a 37°C. Las muestras digeridas con NdeI fueron metiladas o no de forma artificial con tal de simular la situación real de un ADN con CpG metilado. Para metilar las muestras se utilizó el enzima SssI Methylase (New England Biolabs) junto con SAM (S-adenosyl methionine) en un tiempo de 3 horas a 37°C de incubación. Las muestras representativas no metiladas fueron guardadas a -20°C hasta que se llevó a cabo el siguiente paso de digestión enzimática con el enzima TspMI (enzima sensible a metilación) (New England Biolabs), en un tiempo de 3 horas a 75 °C consecutivamente. A los fragmentos de ADN generados tras la última digestión, se ligaron el adaptador NdeI compatible con el extremo cohesivo del enzima NdeI y el adaptador TspMI compatible con el extremo cohesivo TspMI mediante la T4 ADN ligasa (Fermentas) en el tampón T4 ligasa buffer (Fermentas) en un tiempo de incubación de 4 horas a temperatura ambiente.

[0073] Los resultados se muestran en FIG. 2.

Amplificación de ADN

[0074] Se amplificaron las muestras Sí/No Metiladas digeridas con NdeI/TspMI mediante PCR usando dos cebadores específicos basados en la secuencia de los adaptadores, a una concentración 200 nM cada uno, en una reacción con tampón 1x Taq, 1,5 mM de MgCl₂, 200 nM de dNTP, 1 U de Taq polimerasa (Fermentas) usando el siguiente programa de ciclos: 72°C 2 min, 94°C 2 min, 35 ciclos (94°C 30 s, 58°C 30 s, 72°C 3 min) y 72°C 10 min.

[0075] Los resultados se muestran en la figura 3.

Transcripción in vitro

[0076] Se utilizaron 2,5 µl de ADN amplificado por PCR para llevar a cabo la transcripción in vitro a ARN a partir de una secuencia promotora contenida en el adaptador SacI mediante la adición de 40 U de T7 ARN polimerasa (Ambion) y 7,5 mM de rNTPs, e incubando las muestras a 37°C durante 1 h y 30 minutos. Esta reacción se llevó a cabo por duplicado en paralelo con Cy3-dUTP o bien Cy5-dUTP (Perkin-Elmer) como nucleótidos marcados. Tras la transcripción, los productos marcados fueron purificados usando columnas MEGAclear™ (Ambion).

[0077] Los resultados se muestran en la figura 4.

Hibridación sobre micromatriz

[0078] Se combinan 20 ng de ARN de muestra no metilada marcada con Cy3 y 20 ng de ARN de muestra metilada marcada con Cy5 para ser hibridadas sobre los oligonucleótidos de la micromatriz. A esta mezcla de ARN se le añade 100 µl de solución de hibridación 2x (Agilent) y se carga en el chip tal y como recomienda la casa comercial Agilent Technologies. La hibridación puede tener lugar a 60°C durante toda una noche en un horno de hibridación: Después se lava la micromatriz con soluciones 6x SSPE + 0,005% N-Lauroylsarcosine (SIGMA) a temperatura ambiente 1 min en agitación, y 0,06X SSPE + 0,005% N-Lauroylsarcosine a temperatura ambiente 1 min en agitación para eliminar el exceso de transcritos no hibridados. Acto seguido el chip se lava en una solución protectora de fluoróforos que contiene acetónitrilo durante 30 segundos y se extrae de esta solución lentamente y a velocidad constante para conseguir un secado eficiente e uniforme del chip. Las señales de intensidad de cada oligonucleótido en la micromatriz se detectan con el escáner Agilent 62505B.

Ejemplo 2: Análisis del estado de metilación de una muestra de ADN humano.Preparación del ADN

5 **[0079]** Se extrae el ADN genómico a partir de una especie de tejido humano. Se disgrega el tejido y se rompen las células machacándolo en un mortero de porcelana frío. Esta ruptura del tejido se ha de realizar en condiciones de frío ya que se puede degradar el ADN, y estas condiciones se consiguen gracias al uso de Nitrógeno líquido (-180° C) refrigerando continuamente el mortero y el tejido en uso. Una vez conseguido un homogenizado del tejido se resuspende en 600 µl de solución de extracción de ADN (100 mM Tris-HCl; 50 mM EDTA pH 8; 500 mM de NaCl) precalentado a 65°C. Se añaden 2 µl de RNasa A (10 mg/ml) y se mantuvo a 37°C durante 15 min. Después se añaden 20 µl de Proteinasa K (20 mg/ml)+ 50 µl de SDS 20%, se mezcla bien y se incuba 3 horas a 65°C. Se añade 10 1 volumen de fenol-cloroformo, se homogeniza bien la mezcla durante 5 minutos manualmente y después se centrifuga a 4°C a 13000 rpm durante 5 minutos en microcentrífuga. Se pipetea en un tubo nuevo el sobrenadante y se vuelve a añadir 1 volumen de fenol-cloroformo. Se vuelve a centrifugar a 4°C a 13000 rpm durante 5 minutos. Se pipetea en otro nuevo tubo el sobrenadante añadiendo 1/10 Volumen de acetato de sodio 5 M y 2 Volúmenes de etanol 100% frío. Se ponen los tubos de muestras a -20° C durante 1 hora para que precipite el ADN. Después de 15 este periodo de tiempo el ADN se precipita mediante centrifugación a 13000 rpm durante 30 minutos a 4°C, el precipitado se lava con 500 µl de etanol 70% y se deja secar. Se disuelve el precipitado en 50 µl de agua estéril.

Digestión de ADN y ligación de adaptadores

20 **[0080]** Se digiere el ADN genómico total (2 µg) con Bfal (enzima no sensible) (Fermentas) y TspMI (enzima sí sensible a grupos metil) (New England Biolabs) en un tiempo de incubación de 3 horas a 37 °C más 3 horas a 75 °C consecutivamente. A los fragmentos de ADN generados tras la digestión, se ligan el adaptador Bfal compatible con el extremo cohesivo del enzima Bfal y el adaptador TspMI compatible con el extremo cohesivo TspMI mediante la T4 ADN ligasa (Fermentas, Lituania) en el tampón T4 ligasa buffer (Fermentas, Lituania) en un tiempo de incubación de 4 horas a temperatura ambiente.

Amplificación de ADN

25 **[0081]** Se amplifican los fragmentos Bfal/TspMI mediante PCR usando dos cebadores específicos basados en la secuencia de los adaptadores, a una concentración 200 nM cada uno, en una reacción con tampón 1x Taq, 1,5 mM de MgCl₂, 200 nM de dNTP, 1 U de Taq polimerasa (Fermentas, Lituania) usando el siguiente programa de ciclos: 2 min a 72°C; 2 min a 94°C; 34 ciclos de 30 s a 94° C, 30 s a 56°C, 90 s a 72°C y 10 min a 72°C.

Transcripción in vitro

30 **[0082]** Se utilizan 2,5 µg de ADN amplificado por PCR para llevar a cabo la transcripción in vitro a ARN a partir de una secuencia promotora contenida en el adaptador SacI mediante la adición de 40 U de T7 ARN polimerasa (Ambion, USA) y 7,5 mM de rNTPs, e incubando las muestras a 37°C toda la noche. Esta reacción se lleva a cabo por duplicado en paralelo con Cy3-dUTP o bien Cy5-dUTP (Perkin-Elmer, USA) como nucleótidos marcados. Tras la transcripción, se elimina el ADN mediante tratamiento con 2 U de DNasa I (Ambion, USA) a 37°C durante 30 35 minutos. Los productos marcados se purifican usando columnas MEGAclean™ (Ambion, USA).

Hibridación sobre micromatriz

40 **[0083]** Se combinan 0,75 µg de ARN de muestra marcada con Cy3 y 0.75 µg de ARN de muestra marcada con Cy5 para ser hibridadas sobre los oligonucleótidos de la micromatriz. A esta mezcla de ARN se le añaden 100 µl de solución de hibridación 2 x (Agilent, USA) y se carga en el chip tal y como recomienda la casa comercial Agilent Technologies. La hibridación tiene lugar a 60°C durante toda una noche en un horno de hibridación: Después se lava la micromatriz con soluciones 6x SSPE + 0,005% N-Laurilsarcosina (SIGMA) a temperatura ambiente 1 min en agitación, y 0,06X SSPE + 0,005% N-Laurilsarcosina a temperatura ambiente 1 min en agitación para eliminar el exceso de transcritos no hibridados. Acto seguido el chip se lava en una solución protectora de fluoróforos que 45 contiene acetonitrilo durante 30 segundos y se extrae de esta solución lentamente y a velocidad constante para conseguir un secado eficiente e uniforme del chip. Las señales de intensidad de cada oligonucleótido en la micromatriz se detectaron con el escáner Agilent 62505B.

REIVINDICACIONES

1. Método para determinar la metilación de un ácido nucleico que comprende las siguientes etapas:

- 5 a) fragmentación de una muestra de ADN genómico con al menos un enzima de restricción sensible a metilación y al menos un enzima de restricción no sensible a metilación,
- b) ligación, en los extremos de los fragmentos de ADN obtenidos, de adaptadores específicos donde uno de los adaptadores específicos comprende una secuencia promotora funcional,
- 10 c) amplificación de los fragmentos que incluyen ambos adaptadores utilizando cebadores específicos basados en los adaptadores,
- d) marcaje de los fragmentos de ADN amplificados mediante transcripción in vitro con una ARN polimerasa capaz de iniciar la transcripción a partir de la secuencia promotora contenida en uno de los adaptadores utilizando una mezcla de nucleótidos y
- 15 e) determinación del estado de metilación de la muestra.

2. Método según la reivindicación 1, en donde la fragmentación de una muestra de ADN genómico se realiza mediante digestión en primer lugar con al menos un enzima de restricción no sensible a metilación y posteriormente con al menos un enzima de restricción sensible a metilación; o en donde la fragmentación de una muestra de ADN genómico se realiza mediante digestión en primer lugar con al menos un enzima de restricción sensible a metilación y posteriormente con al menos un enzima de restricción no sensible a metilación; o en donde la fragmentación de una muestra de ADN genómico se realiza mediante digestión con al menos un enzima de restricción no sensible a metilación y simultáneamente con al menos un enzima de restricción sensible a metilación.

3. Método según la reivindicación 1, en donde el enzima de restricción no sensible a metilación reconoce una diana de de enzimas de restricción de 4, 5 ó 6 pares de bases.

4. Método según la reivindicación 3, en donde el enzima de restricción no sensible a metilación se selecciona del grupo que comprende Bfal, TaqI, MseI y NdeI.

5. Método según la reivindicación 1, en donde el enzima de restricción sensible a metilación reconoce una diana de enzimas de restricción de 4, 5 ó 6 pares de bases.

6. Método según la reivindicación 5, en donde el enzima de restricción sensible a metilación se selecciona del grupo que comprende SmaI, PvuII, TspMI, BsePI y BssHII.

7. Método según la reivindicación 1, en donde el adaptador específico que comprende una secuencia promotora funcional es el adaptador específico para el enzima de restricción sensible a metilación.

8. Método según la reivindicación 1, en donde el marcaje comprende la incorporación de análogos de nucleótidos que contienen sustancias marcadoras detectables directamente, tales como fluoróforos, análogos de nucleótidos que incorporan sustancias marcadoras detectables en una reacción posterior, tales como biotina o haptenos, o cualquier otro tipo de sustancia marcadora de ácidos nucleicos.

9. Método según la reivindicación 1, en donde la ARN polimerasa se selecciona del grupo que comprende ARN polimerasa de T7, ARN polimerasa de T3 y ARN polimerasa de SP6.

10. Método según la reivindicación 1, en donde la determinación del estado de metilación de la muestra se realiza mediante hibridación de los fragmentos de ADN obtenidos en la etapa d) con los oligonucleótidos inmovilizados sobre una micromatriz de ADN, la detección del marcaje incorporado en los fragmentos a analizar y la comparación cuantitativa de los valores de las señales de los fragmentos hibridados con los valores de las señales de referencia.

11. Método según la reivindicación 10, en donde los oligonucleótidos inmovilizados sobre la micromatriz se diseñan de forma que incluyan la diana de restricción del enzima de restricción sensible a metilación; o en donde los oligonucleótidos inmovilizados sobre la micromatriz se diseñan de forma que estén localizados entre las dianas de restricción del enzima de restricción sensible a metilación.

12. Kit que comprende los reactivos, enzimas y aditivos apropiados para llevar a cabo el método de cualquiera de las reivindicaciones 1 a 11.

13. Uso del método reivindicado en cualquiera de las reivindicaciones 1 a 11 para analizar el patrón de metilación que presentan las islas CpG en la muestra analizada.

14. Uso del método reivindicado en cualquiera de las reivindicaciones 1 a 11 para el diagnóstico de un estado patológico.

65

15. Uso del método según la reivindicación 14, donde el estado patológico se selecciona del grupo que consiste en cáncer y una enfermedad neurodegenerativa.

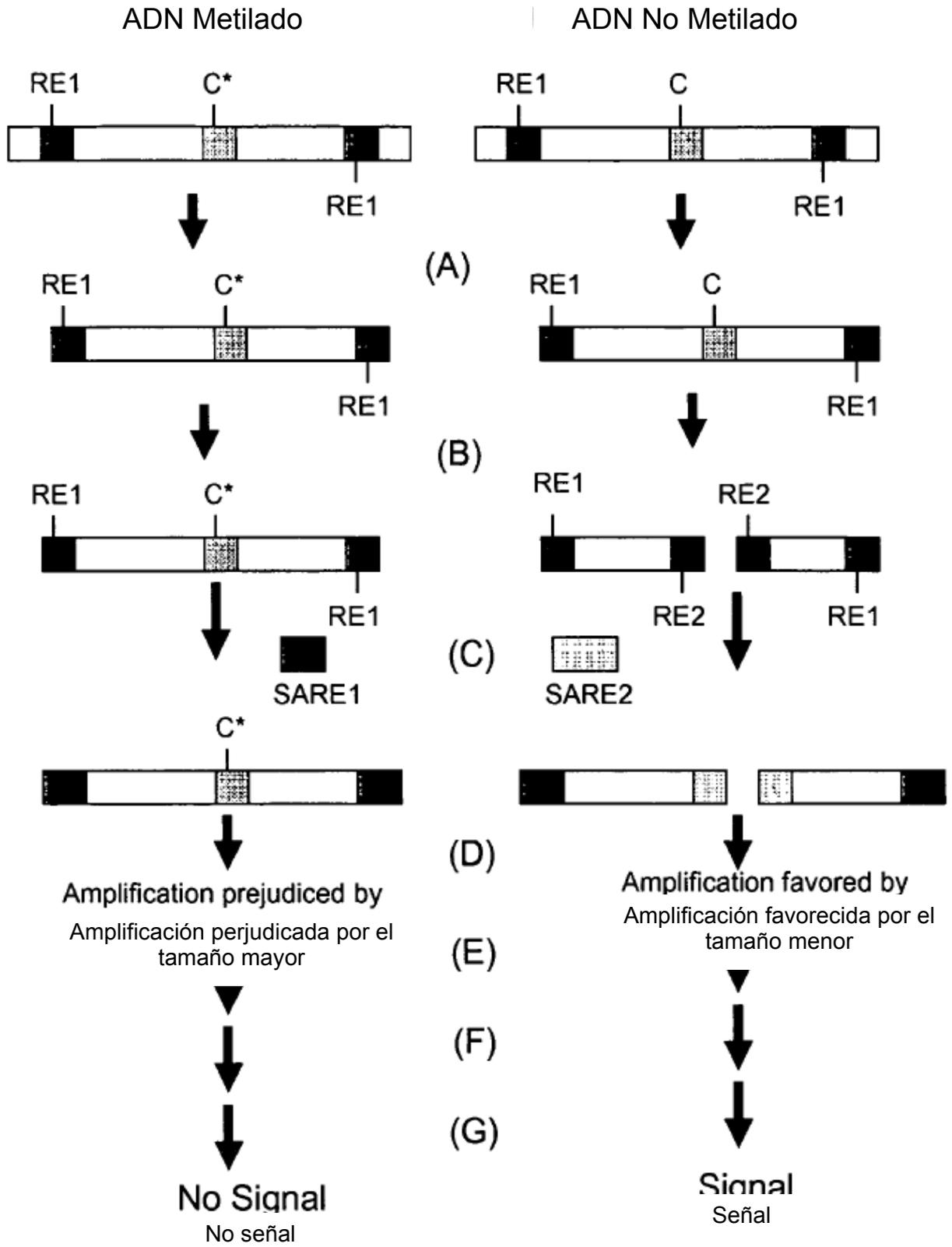


FIG.1

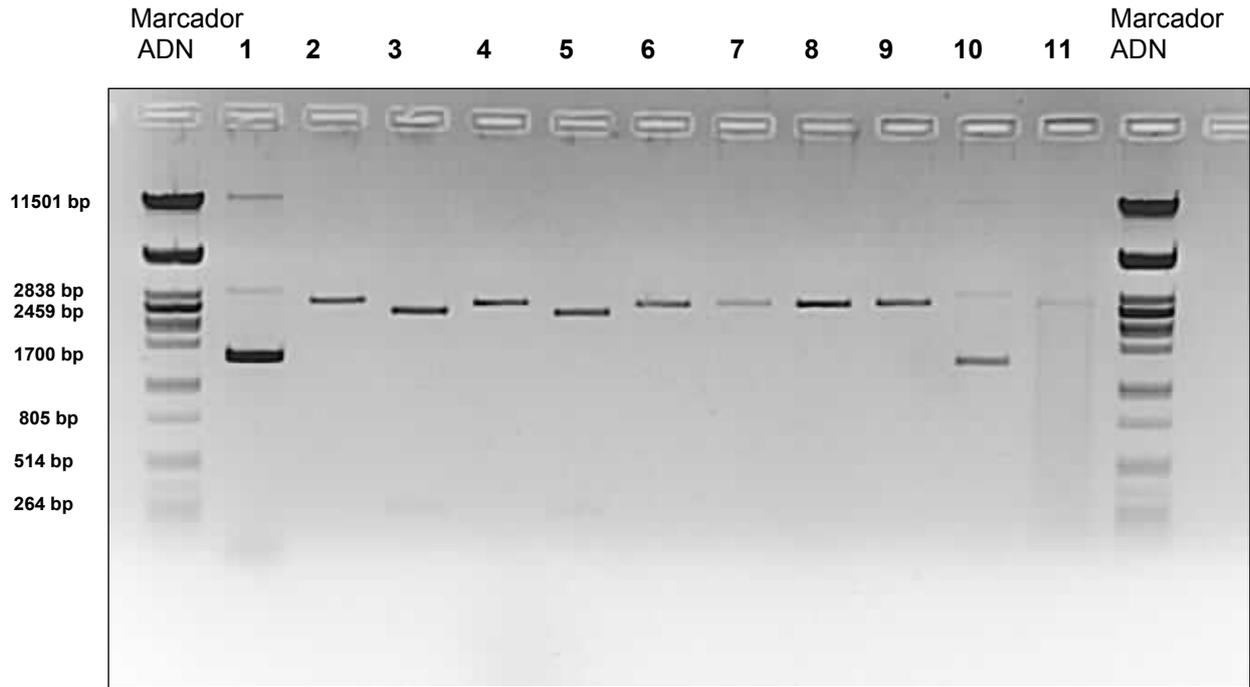


FIG. 2

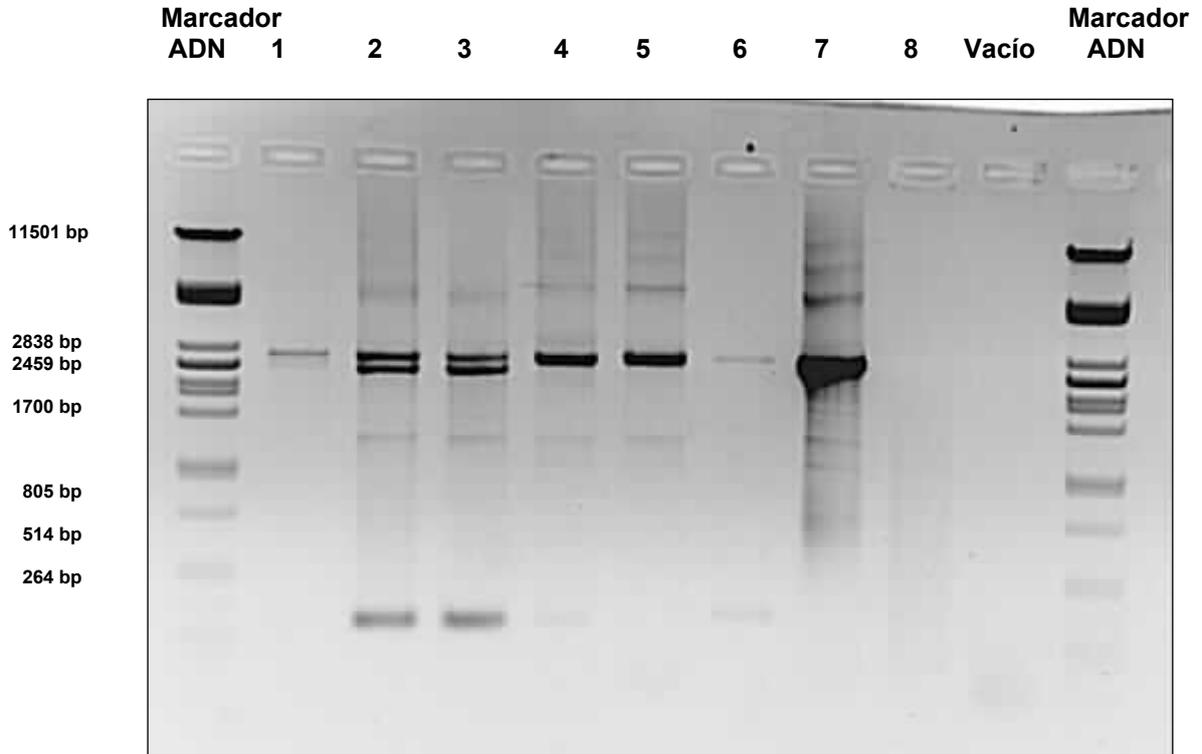


FIG. 3

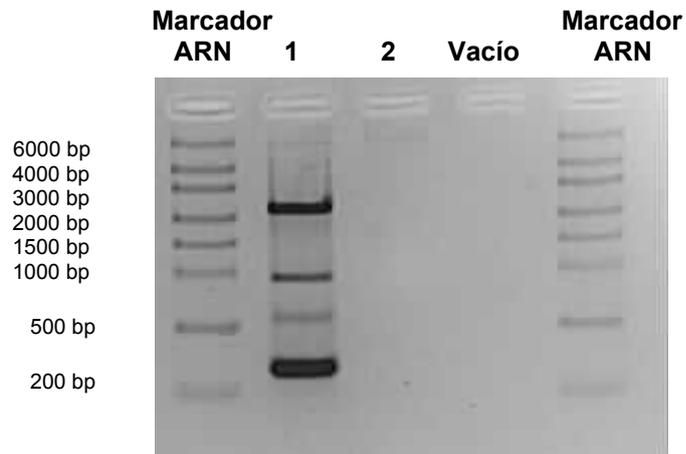


FIG. 4

REFERENCIAS CITADAS EN LA DESCRIPCIÓN

Esta lista de referencias citadas por el solicitante es únicamente para la comodidad del lector. No forma parte del documento de la patente europea. A pesar del cuidado tenido en la recopilación de las referencias, no se pueden excluir errores u omisiones y la EPO niega toda responsabilidad en este sentido.

Documentos de patentes citados en la descripción

- WO 2006088978 A [0047]

Literatura diferente de patentes citadas en la descripción

- **Singal R ; Ginder GD.** DNA methylation. *Blood*, 15 June 1999, vol. 93 (12), 4059-70 [0003]
- **Paluszczak J ; Baer-Dubowska W.** Epigenetic diagnostics of cancer - the application of DNA methylation markers. *J Appl Genet*, 2006, vol. 47 (4), 365-75 [0003]
- **Esteller M.** Aberrant DNA methylation as a cancer-inducing mechanism. *Annu Rev Pharmacol Toxicol.*, 2005, vol. 45, 629-56 [0005]
- **Hatada et al.** A microarray-based method for detecting methylated loci. *Journal of Human Genetics*, 2002, vol. 47, 448-451 [0009]
- **Sambrook et al.** Molecular Cloning. A Laboratory Manual. Cold Spring Harbor Laboratory Press, 1989 [0051]
- **Maniatis, T. et al.** Molecular Cloning: A Laboratory Manual. Cold Spring Harbor Laboratory, 1982 [0070]
- **Sambrook, J. et al.** Molecular Cloning: A Laboratory Manual. Cold Spring Harbor Laboratory, 1989 [0070]
- **Ausubel, F. M. et al.** Current Protocols in Molecular Biology. J. Wiley and Sons, 1992 [0070]
- **Glover, D.** DNA Cloning, I and II. Oxford Press, 1985 [0070]
- **Anand, R.** Techniques for the Analysis of Complex Genomes. Academic Press, 1992 [0070]
- **Guthrie, G. ; Fink, G. R.** Guide to Yeast Genetics and Molecular Biology. Academic Press, 1991 [0070]
- **Harlow ; Lane.** Antibodies: A Laboratory Manual. Cold Spring Harbor Laboratory, 1988 [0070]
- Cell Culture. Methods in Enzymology. Academic Press, Inc, 1979, vol. 58 [0070]
- Nucleic Acid Hybridization. 1984 [0070]
- Transcription And Translation. 1984 [0070]
- **R. I. Freshney.** Culture Of Animal Cells. Alan R. Liss, Inc, 1987 [0070]
- Immobilized Cells And Enzymes. IRL Press, 1986 [0070]
- **B. Perbal.** A Practical Guide To Molecular Cloning. 1984 [0070]
- Methods In Enzymology. Academic Press, Inc, [0070]
- Gene Transfer Vectors For Mammalian Cells. Cold Spring Harbor Laboratory, 1987 [0070]
- Methods In Enzymology. vol. 154, 155 [0070]
- Immunochemical Methods In Cell And Molecular Biology. Academic Press, 1987 [0070]