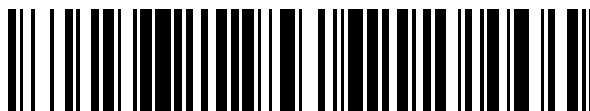


19



OFICINA ESPAÑOLA DE
PATENTES Y MARCAS

ESPAÑA



11 Número de publicación: **2 382 746**

51 Int. Cl.:
C12Q 1/68

(2006.01)

12

TRADUCCIÓN DE PATENTE EUROPEA

T3

- 96 Número de solicitud europea: **06750657 .6**
96 Fecha de presentación: **17.04.2006**
97 Número de publicación de la solicitud: **1871912**
97 Fecha de publicación de la solicitud: **02.01.2008**

54 Título: **Método para determinar la metilación de ADN en muestras de sangre u orina**

30 Prioridad:
15.04.2005 US 672242 P
02.05.2005 US 676997 P
08.07.2005 US 697521 P
04.10.2005 US 723602 P
08.03.2006 US 780248 P

45 Fecha de publicación de la mención BOPI:
13.06.2012

45 Fecha de la publicación del folleto de la patente:
13.06.2012

73 Titular/es:
**EPIGENOMICS AG
KLEINE PRÄSIDENTENSTRASSE 1
10178 BERLIN, DE**

72 Inventor/es:
**BALLHAUSE, Matthias; BERLIN, Kurt ;
DEVOS, Theo; DIETRICH, Dimo;
LIEBENBERG, Volker; LOFTON-DAY, Cathy;
LOGRASSO, Joe; MAAS, Jennifer;
MODEL, Fabian; SCHUSTER, Matthias;
SLEDZIEWSKI, Andrew y
TETZNER, Reimo**

74 Agente/Representante:
Curell Aguilá, Mireia

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).

ES 2 382 746 T3

DESCRIPCIÓN

Método para determinar la metilación de ADN en muestras de sangre u orina.

- 5 La presente invención se refiere de forma general a composiciones y métodos nuevos o sustancialmente mejorados para proporcionar fragmentos de ADN derivados de una muestra remota y para los análisis de los mismos.

Referencias cruzadas a las solicitudes relacionadas

- 10 La presente solicitud reivindica el beneficio de prioridad a las solicitudes de patente provisional US: 60/672.242, presentada el 15 abril 2005; 60/676.997, presentada el 02 mayo 2005; 60/697.521, presentada el 08 julio 2005; 60/723.602, presentada el 04 octubre 2005; y 60/780.248, presentada el 08 marzo 2006.

Listado de secuencias

- 15 Un listado de secuencias, que comprende las SEC ID N.º 1-15, se incluye y adjunta en formato de papel formando parte de la presente solicitud.

Antecedentes de aspectos de la invención

- 20 *Desarrollo de una prueba médica.* La probabilidad de curar una enfermedad (por ejemplo un cáncer) depende muchas veces principalmente de la temprana detección de la misma. Con frecuencia también resulta ventajoso detectar una predisposición para la enfermedad o, por ejemplo, si ésta se halla en un estado avanzado, realizar una estimación del tratamiento más adecuado. La detección, prevención o estimación precoz reduce los costes del tratamiento médico directo y asociado. Asimismo, garantiza una mejor calidad de vida para el paciente afectado.

- 25 Esto hace necesario analizar un gran número de muestras procedentes de individuos en los que se sospecha la enfermedad, la mayoría de los cuales posiblemente no estará afectado por la misma. O, en el caso de los pacientes con una enfermedad diagnosticada, es preciso analizar muchas muestras y sólo un pequeño porcentaje responderá a un cierto tratamiento.

- 30 En general, es deseable que una prueba posea la mayor sensibilidad, especificidad y exactitud posibles. La sensibilidad es una medida de la capacidad de una prueba para detectar correctamente la enfermedad de interés en un individuo analizado. Una prueba dotada de una mala sensibilidad produce una alta tasa de falsos negativos, es decir, de individuos realmente afectados por la enfermedad que la prueba no detecta como tales. El riesgo que entraña el falso negativo es que el individuo enfermo permanezca sin diagnosticar y sin tratamiento durante un tiempo, periodo durante el cual la enfermedad puede avanzar hasta un estadio posterior en el que los tratamientos, si los hay, pueden ser menos eficaces. Matemáticamente se puede describir como: $\text{Sensibilidad} = \text{TP}/(\text{TP} + \text{FN})$, donde TP representa un resultado positivo verdadero y FN un resultado falso negativo. Un resultado positivo verdadero significa que la prueba es positiva y que la enfermedad está presente, mientras que un resultado falso negativo supone que la prueba es negativa pero la enfermedad no está presente.

- 35 Un ejemplo de una prueba dotada de una baja sensibilidad es un análisis de sangre de proteínas para detectar el VIH. Este tipo de pruebas adolece de una mala sensibilidad porque es incapaz de detectar la presencia del virus hasta que la enfermedad está arraigada y el virus ha invadido el torrente sanguíneo en número sustancial. En cambio, un ejemplo de prueba dotada de una alta sensibilidad es la detección de la carga viral mediante la reacción en cadena de la polimerasa (PCR). Esa alta sensibilidad es posible porque este tipo de prueba puede detectar cantidades muy pequeñas del virus. La elevada sensibilidad es particularmente importante cuando las consecuencias de pasar por alto el diagnóstico son importantes.

- 40 La especificidad, por su parte, es una medida de la capacidad de una prueba para identificar con precisión a los pacientes que no están afectados por la enfermedad. Una prueba que posea una mala especificidad producirá una alta tasa de falsos positivos, es decir, individuos que son identificados como enfermos sin estarlo. Uno de los inconvenientes de los falsos positivos es que obligan a los pacientes a someterse a procedimientos o tratamientos médicos innecesarios y a afrontar los riesgos y el estrés emocional y económico que comportan, aparte de los efectos adversos que pueden tener en su salud. Una característica de las enfermedades que dificulta el desarrollo de pruebas diagnósticas dotadas de una alta especificidad es que los mecanismos de la enfermedad, particularmente del cáncer, implican a menudo una pluralidad de genes y proteínas. Además, ciertas proteínas

pueden estar elevadas por motivos ajenos a la enfermedad. Matemáticamente, la especificidad se puede definir como: $\text{Especificidad} = \text{TN}/(\text{FP}+\text{TN})$, donde TN representa un resultado negativo verdadero y FP un resultado falso positivo. Un resultado negativo verdadero es aquel en que la prueba es negativa y la enfermedad no está presente. Un resultado falso positivo se da cuando la prueba es positiva pero la enfermedad no está presente.

5 Un ejemplo de una prueba dotada de una alta especificidad es la prueba génica que puede detectar una mutación en p53. La especificidad es importante cuando el coste o el riesgo asociados con los procedimientos diagnósticos o las intervenciones médicas ulteriores son muy altos.

10 La exactitud es una medida de la capacidad de la prueba de detectar correctamente la enfermedad de interés en un individuo analizado y, al mismo tiempo, de identificar con precisión a los pacientes que no la padecen. Así pues, la exactitud describe simultáneamente la sensibilidad y la especificidad de una prueba. Matemáticamente se define como: $\text{exactitud} = (\text{TP}+\text{TN})/\text{N}$, donde TP representa los resultados positivos verdaderos, TN los resultados negativos verdaderos y N el número de pacientes analizados.

15 En general, por razones evidentes, una prueba de elección debería poseer además por lo menos uno de los siguientes criterios, si no todos: (i) alto grado de estandarización, (ii) gran capacidad de automatización, (iii) evitar la contaminación cruzada de muestras, (iv) bajo esfuerzo de manejo, (v) bajo coste, (vi) facilidad de manejo, (vii) alta reproducibilidad, (viii) alta fiabilidad.

20 Por supuesto, todas las especificaciones descritas anteriormente no sólo son aplicables a la prueba en sí misma. También son aplicables al flujo de trabajo que comprende desde la recogida de una muestra hasta el inicio real de la prueba. En otras palabras, un flujo de trabajo adecuado debe permitir una prueba con dichas especificaciones.

25 *Material de partida para una prueba.* Que una prueba se pueda realizar de manera no invasiva resulta ventajoso en términos de reducción de costes y de calidad de vida para el paciente. Si ello no es posible, es deseable que se realice por medios invasivos que afecten lo mínimo posible al paciente, que sean de fácil ejecución, tengan un bajo coste, o combinaciones de esto mismo. Por esa razón, las muestras remotas como son por ejemplo sangre, esputo, heces o líquidos corporales constituyen el material de partida de elección para una prueba.

30 Sin embargo, la utilización de muestras remotas resulta bastante limitada por la escasa cantidad de ADN, en particular por la escasa cantidad de ADN originado por la célula o el tejido enfermos. Por consiguiente, el flujo de trabajo desde la recogida de la muestra hasta el inicio de la prueba debe estar caracterizado por un alto rendimiento en la obtención del ADN.

35 En la mayoría de casos el ADN de interés se encuentra en la muestra muy diluido. Normalmente menos del 1% es relevante para la prueba en cuestión. Esto pone de manifiesto todavía más que el flujo de trabajo para la recogida, preparación y procesamiento del ADN antes de la prueba debe estar caracterizado por el alto rendimiento en la obtención del ADN.

40 Otra dificultad de la utilización de muestras remotas deriva del riesgo de contaminación por una gran cantidad de células y, por ende, de ADN. Así pues, la contaminación no guarda ninguna relación con la cuestión de en qué se basa la prueba. Por ejemplo, tales contaminaciones son bacterias como *E. coli* en las muestras fecales o eritrocitos en las muestras de plasma o suero. Estas contaminaciones son especialmente críticas si interfieren con la detección del ADN de interés o si están presentes en grandes cantidades. En este último caso, el porcentaje de ADN de interés resulta tan pequeño que no puede ser detectado. Por esa razón el flujo de trabajo para recoger, suministrar y procesar el ADN antes de someterlo a una prueba debe ser suficientemente seguro para eliminar con eficacia tales contaminaciones.

50 Asimismo, el ADN de interés contenido en la muestra remota puede estar parcialmente degradado. Esto depende del tipo de muestra remota y del proceso de recogida y manipulación de dicha muestra. En una muestra remota es posible que se produzca una fragmentación del ADN hasta un tamaño de 100 pb o inferior. Por tanto, el flujo de trabajo desde la obtención de la muestra hasta el inicio de la prueba debe asegurar que tanto los fragmentos de ADN pequeños como grandes resulten disponibles para la prueba y que el ADN no se fragmente más.

55 Son muchos los documentos que abordan estos problemas. A título de ejemplo se citan los siguientes: Diehl F., et al. (2005) PNAS 102(45), 163 68-16373; y Li J., et al. (2006) Journal of Molecular Diagnostics, 8(1), 22-30.

Análisis de la metilación. Como se ha revelado en los últimos años, una de las estrategias más potentes y prometedoras para detectar una enfermedad, la predisposición a una enfermedad o para estimar una probable respuesta frente a un determinado tratamiento consiste en el análisis de la metilación del ADN genómico del paciente.

Muchas enfermedades, en particular el cáncer, comportan una modificación de la expresión génica. Ésta puede consistir en una mutación de los genes, que puede ocasionar la expresión de proteínas modificadas o una inhibición o sobreexpresión de proteínas o enzimas, pero también en una modulación de la expresión a través de modificaciones epigenéticas, en particular a través de cambios en el patrón de metilación del ADN. Tales modificaciones epigenéticas no afectan a la secuencia codificante del ADN. Se ha comprobado que los procesos de metilación del ADN tienen implicaciones sustanciales para la salud, y parece claro que el conocimiento acerca de los procesos de metilación y las modificaciones del metabolismo de los grupos metilo y la metilación del ADN son esenciales para entender las enfermedades, así como para la profilaxis, el diagnóstico y el tratamiento de las mismas.

El control preciso de los genes, los cuales solo representan una pequeña parte del genoma de los mamíferos, debe considerar que la mayor parte del ADN del genoma no codifica ningún gen. La presencia de este ADN truncado que contiene intrones, elementos repetitivos y elementos transponibles potencialmente activos, requiere mecanismos eficaces de supresión duradera (silenciamiento). Al parecer, la metilación de la citosina por la acción de las metiltransferasas del ADN dependientes de S-adenosilmetionina (SAM), que da lugar a la 5-metilcitosina, supone uno de tales mecanismos para la modificación de las interacciones ADN-proteína. Los genes se pueden transcribir mediante promotores sin metilar, incluso aunque las regiones adyacentes transcritas o no transcritas estén muy metiladas. Esto permite la utilización y la regulación de promotores de genes funcionales, mientras que el ADN truncado que incluye los elementos transponibles es suprimido. La metilación también aparece en la supresión a largo plazo de los genes ligados al X y puede propiciar una reducción o un aumento del grado de transcripción, dependiendo de en qué lugares de las unidades de transcripción se produzca.

La práctica totalidad de la metilación natural del ADN que se produce en los mamíferos está circunscrita a las secuencias palindrómicas de dinucleótidos citosina-guanosina (CpG), que son controladas por las ADN-metiltransferasas. Los dinucleótidos CpG constituyen aproximadamente 1% al 2% de los dinucleótidos y están concentrados en islas CpG. Según una definición aceptada entre los expertos en la materia, una región se considera una isla CpG cuando el contenido de C+G en 200 pb es como mínimo del 50% y el porcentaje de dinucleótidos CG observados en comparación con los dinucleótidos CG esperados es superior a 0,6 (Gardiner-Garden, M., Frommer, M. (1987) J. Mol. Biol. 196, 261-282). Normalmente, las islas CpG contienen por lo menos 4 dinucleótidos CpG en una secuencia de una longitud de 100 pb.

Las islas CpG ubicadas en las regiones promotoras ejercen a menudo una función reguladora de la expresión del gen correspondiente. Por ejemplo, cuando la isla CpG está hipometilada, el gen se puede expresar. En cambio, la hipermetilación propicia a menudo una supresión de la expresión. Normalmente los genes supresores de tumores están hipometilados, pero si son hipermetilados, su expresión resulta suprimida. Esta situación se observa muchas veces en los tejidos tumorales. Por el contrario, los oncogenes están hipermetilados en el tejido sano, mientras que en los tejidos tumorales muchas veces se hallan hipometilados.

La metilación de la citosina tiene normalmente el efecto de impedir la unión de proteínas que regulan la transcripción de los genes. Esto desemboca en una alteración de la expresión del gen. En relación con el cáncer, la expresión de los genes que regulan la división celular resulta alterada: por ejemplo, la expresión de un gen apoptótico está regulada a la baja, mientras que la expresión de un oncogen lo está al alza. Además, la hipermetilación puede tener una influencia prolongada en la regulación. Ciertas proteínas que desacetilan las histonas son capaces de unirse al ADN a través de su dominio de unión a 5-metilcitosina cuando las citosinas resultan metiladas. Esto resulta en una desacetilación de las histonas, lo que a su vez aumenta el empaquetamiento del ADN. Debido a ello, las proteínas reguladoras no encuentran obstáculo para unirse al ADN.

La detección eficiente de los patrones de metilación del ADN es por consiguiente una herramienta importante para desarrollar nuevas estrategias para entender las enfermedades, así como para su prevención, diagnóstico y tratamiento, y para la detección sistemática de dianas asociadas a enfermedades. Pero, por otro lado, los métodos

para una detección eficiente de la metilación del ADN requieren estándares de alta calidad en lo que concierne al material de partida del ADN genómico. Preferiblemente, los estándares son:

I) Que la muestra de ADN utilizada comprenda una cantidad suficiente de ADN caracterizado por un patrón de metilación específico para una enfermedad concreta. Dicha cantidad suficiente de ADN depende del método empleado para detectar el patrón de metilación así como del propio patrón. Los valores típicos oscilan aproximadamente entre 20 pg y 10 ng. Pero es preciso tener en cuenta que la cantidad real de este ADN presente en una muestra tomada de un paciente debe ser mucho mayor, como mínimo en un factor de 4-8 veces. Esto responde a la pérdida de ADN que tiene lugar durante la preparación y el procesamiento de la muestra para aislar el ADN de interés;

II) La muestra de ADN utilizada no debe contener ADN que pueda interferir con el método escogido para detectar un patrón de metilación dado;

III) Resulta preferido que la muestra de ADN empleada tampoco esté muy contaminada por ADN que no esté relacionado con el problema subyacente. Por ejemplo, el ADN de *E. coli* en muestras fecales o el ADN de eritrocitos en muestras de plasma o suero; y

IV) El ADN utilizado debería carecer de proteínas, péptidos, aminoácidos, ARN así como nucleótidos o bases que no formen parte del esqueleto de ADN, ya que éstos pueden entorpecer la detección de la metilación a través de mecanismos estéricos.

Necesidad destacada en la técnica. A día de hoy el solicitante no conoce ningún método relevante en la técnica. Por relevante se entiende que cumple los criterios especificados anteriormente para proporcionar ADN procedente de muestras remotas, para facilitar ADN adecuado para el análisis de la metilación, y para las pruebas médicas en general.

Como técnica más próxima se pueden considerar los siguientes documentos: Utting M., et al. (2002) Clinical Cancer Research 8, 35-40. Este estudio indica que el análisis de los marcadores de microsatélites con ADN flotante de sangre u orina podría ser relevante para el diagnóstico y el cribado del cáncer de vejiga. La preparación de la muestra así como del ADN extraído de las muestras se lleva a cabo mediante procedimientos estándares.

Wong I.H.N., et al. (2003) Clinical Cancer Research 9, 0471052 describe un nuevo método llamado RTQ-MSP que es una combinación de MSP (PCR sensible a la metilación) y PCR en tiempo real. Los autores demuestran que es posible la detección de una secuencia particular de ADN tumoral en el plasma, suero y células de pacientes a los que se ha diagnosticado un carcinoma hepatocelular.

La patente US nº 6.927.028 enseña un método para diferenciar moléculas de ADN procedentes de células de distintos individuos en muestras biológicas mediante una PCR específica de la metilación. La preparación de la muestra así como del ADN extraído de las muestras se lleva a cabo mediante procedimientos estándares.

Lecomte T., et al. (2002) Int. J. Cancer 100, 542-548 analizaron ADN circulante libre derivado del plasma de pacientes con cáncer colorrectal para detectar la presencia de mutaciones KRAS2, la metilación del promotor del gen p16, o ambos. Los autores sugieren que los pacientes que presentan ADN tumoral circulando libremente por la sangre tienen una probabilidad menor de una supervivencia sin recurrencia a 2 años que los pacientes en cuya sangre no se detecta ADN tumoral circulando libremente.

Sumario de los aspectos de la invención

Los aspectos de la presente invención están relacionados con las composiciones y los métodos para determinar el estado de metilación de por lo menos una citosina, un patrón de metilación, o de ambos en el ADN de una muestra de sangre, suero u orina.

Preferiblemente estos aspectos comprenden una etapa de subdivisión, una etapa de concentración, o combinaciones de las mismas.

Breve descripción de las figuras

La figura 1 representa una visión general de una forma de realización de la invención.

- 5 La figura 2 representa una visión general de una estrategia de agrupamiento y concentración ejemplificativa.

Descripción detallada de los aspectos de la invención

- 10 Para lograr diversos objetivos técnicos, los aspectos de la invención enseñan composiciones y métodos para preparar fragmentos de ADN derivados de una muestra remota. Dichas composiciones y métodos comprenden la preparación de una muestra remota que comprende ADN, el aislamiento del ADN de dicha muestra y, por último, el tratamiento del ADN aislado con un reactivo o una enzima que permita la diferenciación de la citosina metilada y sin metilar.

- 15 Ventajas de los aspectos de la invención.

En aspectos concretos, el método inventivo ejemplificativo tiene las siguientes ventajas:

- 20 - Se caracteriza por altos rendimientos en el ADN preparado. Esto se consigue a pesar de que las muestras remotas se caracterizan por comprender sólo pequeñas cantidades de ADN, en especial del ADN de interés. Por otro lado, en muchos casos la cantidad de muestra remota no está limitada. Por consiguiente, según la invención, preferentemente se procesan un gran volumen de muestras remotas. En particular, se seleccionó un método de aislamiento del ADN entre el enorme número de posibles métodos de aislamiento que permite la utilización de grandes volúmenes de muestras iniciales. El uso de volúmenes aún mayores es posible según la invención
25 dividiendo la muestra remota en submuestras, realizando el aislamiento del ADN en paralelo, agrupando el ADN aislado y concentrándolo en un volumen adecuado para seguir el procesamiento.

- Los altos rendimientos de ADN obtenidos dependen además de la elección de un método entre el gran número de métodos de discriminación disponibles que permita diferenciar entre la citosina metilada y sin metilar de forma
30 completa y fiable y, simultáneamente, minimice la fragmentación del ADN.

- Además, según la invención los altos rendimientos de ADN después de las etapas de aislamiento y de tratamiento con bisulfito del mismo se pueden mejorar más aplicando una etapa opcional de amplificación genómica completa al
35 ADN tratado con bisulfito.

- El método inventivo ejemplificativo se caracteriza además por la gran reducción del riesgo de contaminaciones. Ello es posible gracias a formas de realización de recogida de muestras que eliminan con eficacia componentes de la muestra obtenidos del individuo que no son de interés. Un ejemplo es la eliminación de los eritrocitos de la sangre para disponer de una muestra de plasma. En este caso resulta especialmente importante eliminar eficazmente todos
40 los eritrocitos pero sin dañarlos, porque esto ocasiona una liberación de su ADN, que es precisamente el motivo por el que se eliminan.

- El método se caracteriza además porque el ADN facilitado comprende tanto fragmentos pequeños como grandes de ADN que están presentes en la muestra remota inicial. En primer lugar, según la invención esto es posible porque
45 entre el gran número de métodos de aislamiento del ADN disponible se elige uno que aísla fragmentos de por lo menos 100 pb con una alta eficiencia. Y en segundo lugar, gracias a la elección de ciertos métodos de la invención entre el enorme número de métodos posibles para la concentración del ADN, el tratamiento con bisulfito (en particular para la purificación y/o desulfonación del ADN tratado con bisulfito) y la amplificación genómica completa.

- 50 Asimismo, el método se caracteriza porque el ADN preparado contiene tanto los fragmentos pequeños como grandes del mismo que están presentes en la muestra remota inicial. Según la invención, esta ventaja particular se consigue: i) seleccionando entre el enorme número de métodos de aislamiento de ADN disponibles un método que aísla tanto fragmentos pequeños de ADN de tan sólo 100 pb como fragmentos grandes; ii) seleccionando entre el gran número de dispositivos disponibles para la concentración y la purificación del ADN tratado con bisulfito un
55 dispositivo que retiene tanto los fragmentos pequeños de ADN como los fragmentos grandes; y iii) amplificando con eficacia los fragmentos de ADN tratados con bisulfito, grandes y pequeños, mediante una etapa opcional de amplificación genómica completa del ADN tratado con bisulfito.

El método se caracteriza además por facilitar un ADN exento de proteínas, péptidos, aminoácidos, ARN, nucleótidos o bases asociados o ligados, así como de reactivos químicos que puedan interferir. Esto se basa en: i) un método de aislamiento del ADN seleccionado entre el gran número disponible que se caracteriza por una eliminación eficaz de proteínas, péptidos, aminoácidos, ARN, nucleótidos o bases asociados o ligados; ii) dispositivos para la concentración y la purificación del ADN tratado con bisulfito seleccionados entre el enorme número de opciones disponibles que eliminan eficazmente los nucleótidos o bases asociados; y iii) selección de un método para la discriminación entre la citosina metilada y sin metilar entre el gran número de métodos disponible que minimiza la fragmentación del ADN. La eliminación de estos componentes reviste una particular importancia porque pueden obstaculizar el análisis de la metilación por un mecanismo estérico.

Considerado en conjunto y a partir de las ventajas explicadas, el método permite someter muestras remotas a un análisis de la metilación. En particular, este método se caracteriza por su fiabilidad y reproducibilidad, ambas requisitos necesarios para toda prueba médica.

Pero, por supuesto, el método también se caracteriza por otros criterios preferidos para una prueba médica. Según el método inventivo ejemplificativo, se puede procesar una gran cantidad de muestras. Por ejemplo, es posible llevar a cabo el método inventivo ejemplificativo en una escala de placas. Es más, las diferentes etapas se pueden automatizar y estandarizar y, por tanto, también pueden utilizarse técnicas robotizadas. Las diferentes etapas también se caracterizan por un bajo esfuerzo de manipulación. La ejecución en placas, la idoneidad del método para la automatización y estandarización, y el escaso esfuerzo de manipulación también se traducen en una reducción de costes. Pero los costes se reducen todavía más por la utilización de dispositivos y soluciones que ya están disponibles a un bajo coste. Otra ventaja del método de la invención consiste en la fácil ejecución de cada etapa porque sólo requiere equipo de laboratorio ordinario. Gracias a su simplicidad, su adecuación para la automatización, su bajo esfuerzo de manipulación y su fácil manipulación, el método de la invención demuestra también una gran fiabilidad y reproducibilidad.

Por tanto, el método permite realizar una prueba médica basada en la metilación mediante métodos no invasivos o métodos invasivos que afectan lo mínimo posible al paciente, son fáciles de realizar y acarrean un bajo coste.

El método hace accesible las muestras remotas al descubrimiento de marcadores a partir de la metilación. En particular, permite la identificación de marcadores, caracterizada por una alta sensibilidad, una alta especificidad o ambas.

Método de aspectos de la invención.

En resumen, el método de la invención es un método para determinar el estado de metilación de por lo menos una citosina, un patrón de metilación, o ambos en el ADN de una muestra de sangre, plasma u orina procedentes de un individuo, que comprende:

preparar dicha muestra con ADN,
aislar el ADN de la muestra, y
determinar el estado de metilación de por lo menos una citosina

en el ADN de dicha muestra, estando cada citosina localizada en una posición definida y/o formando parte de un patrón de metilación definido en el ADN de dicha muestra mediante una reacción de amplificación con polimerasa y/o un ensayo de amplificación en el que el dicho ADN tratado con bisulfito es sometido directamente a la etapa de determinación de la metilación sin desulfonación previa porque la desulfonación se produce durante el aumento inicial de la temperatura de la reacción de amplificación.

En determinados aspectos, el método de la invención es un método que comprende la recogida y el preprocesamiento de una muestra remota. La muestra remota se caracteriza porque comprende ADN genómico. El método de la invención comprende además la extracción de ADN de la muestra remota extraída y preprocesada. Según la invención, el ADN extraído es sometido a un tratamiento que permite diferenciar si el ADN está metilado o no en una cierta posición. Este tratamiento puede ser de cualquier tipo, pero preferentemente comprende la utilización de un reactivo bisulfito. La enzima puede ser cualquier tipo de enzima, pero preferentemente es una

proteína o una molécula de ARN. Dicho reactivo también puede ser cualquier tipo de reactivo, por ejemplo, aunque no exclusivamente, un reactivo químico, un reactivo farmacéutico, un reactivo biológico o un reactivo médico.

En una forma de realización, el método de la invención es un método en el cual el ADN de la muestra remota se caracteriza porque aproximadamente menos del 5%, aproximadamente menos del 3%, aproximadamente menos del 1%, o aproximadamente menos del 0,1% del ADN procede de una célula, grupo de células, tejido u órgano determinados. En una forma de realización preferida, el método de la invención es un método en el que el ADN de la muestra remota se caracteriza porque aproximadamente menos del 1% del ADN procede de una célula, grupo de células tejido u órgano definidos.

De acuerdo con una forma de realización, la muestra remota facilitada comprende aproximadamente menos del 5%, aproximadamente menos del 3%, aproximadamente menos del 1%, o aproximadamente menos del 0,1% de ADN procedente de la misma célula, grupo de células, tejido u órgano determinados. Preferiblemente, aproximadamente menos del 1% del ADN procede de la misma célula, grupo de células, tejido u órgano definido. Por ello, dicho ADN se caracteriza por tener el mismo patrón de metilación en un alelo o locus genómico definido.

En una forma de realización de la invención, la presencia o la ausencia de dicho ADN se puede detectar, aproximadamente, con un intervalo de confianza superior al 99%, un intervalo de confianza superior al 95%, un intervalo de confianza superior al 90%, un intervalo de confianza superior al 80%, un intervalo de confianza superior al 70%, un intervalo de confianza superior al 60%. En particular, resulta preferido un intervalo de confianza superior al 95% aproximadamente.

De acuerdo con una forma de realización, el porcentaje de dicho ADN se puede determinar aproximadamente dentro de un intervalo de confianza superior al 99%, superior al 95%, superior al 90%, superior al 80%, superior al 70%, o superior al 60%. Preferiblemente se aplica a un intervalo de confianza superior al 95%, aproximadamente.

En una forma de realización, el método de la invención es un método en el cual la muestra remota se caracteriza porque comprende aproximadamente menos de 100 ng de ADN en 1 ml, aproximadamente menos de 60 ng de ADN en 1 ml o aproximadamente menos de 10 ng de ADN en 1 ml. En una forma de realización preferida, la muestra remota comprende aproximadamente menos de 10 ng de ADN en 1 ml de muestra remota.

De acuerdo con una forma de realización, una muestra remota se considera que comprende aproximadamente menos de 1.000 ng, aproximadamente menos de 500 ng, aproximadamente menos de 100 ng, aproximadamente menos de 80 ng, aproximadamente menos de 60 ng de ADN, aproximadamente menos de 40 ng, aproximadamente menos de 20 ng, aproximadamente menos de 10 ng, aproximadamente menos de 1 ng, o aproximadamente menos de 0,1 ng por mililitro de muestra remota. Preferiblemente, la concentración de ADN de la muestra remota es inferior a 10 ng/ml.

En una forma de realización el método de la invención es un método en el cual la pérdida de ADN se minimiza mediante la selección de por lo menos uno de los procesos del grupo siguiente: elección de un método de aislamiento del ADN caracterizado por altos rendimientos de ADN, elección de un método para la diferenciación de la citosina metilada y sin metilar caracterizado por una alta exactitud y fiabilidad, alta exactitud en el pipeteo, reutilización del dispositivo de pipeteo, reutilización del dispositivo en contacto con el ADN.

De acuerdo con una forma de realización, es muy importante disponer de tanto ADN de interés como sea posible para el análisis de la metilación. Esta importancia se explica porque el ADN de la muestra remota sólo comprende un pequeño porcentaje de ADN que es relevante para la cuestión subyacente. Esto ya se ha especificado anteriormente. Por tanto, preferentemente, es posible minimizar la pérdida de ADN mediante por lo menos una de las siguientes provisiones: a) elección de un método adecuado de extracción del ADN; b) elección de un método adecuado para diferenciar si un locus genómico o alelo está metilado o no; c) garantizar una alta exactitud en el pipeteo; d) reutilización de los dispositivos de pipeteo; y e) reutilización de los dispositivos que entran en contacto con el ADN de la muestra remota.

Un método adecuado de extracción del ADN es aquel método que permite y asegura un alto rendimiento de ADN. Se caracteriza además por la posibilidad de estandarización, la posibilidad de automatización, una alta fiabilidad y reproducibilidad, y la exclusión de contaminación con, por ejemplo, el ADN de otras muestras remotas. Por supuesto, un método adecuado también debe cumplir cuanto sea posible los criterios expuestos anteriormente para

toda prueba médica, para el procesamiento de muestras remotas y para el análisis de metilación. Por consiguiente, en una forma de realización preferida determinada, el ADN se extrae mediante por lo menos un componente del kit para aislamiento de ácido nucleico MagNA Pure Compact Nucleic Acid Isolation Kit (I) Large Volume (Roche Diagnostics GmbH) o por lo menos un dispositivo relacionado con el mismo.

5

Un método adecuado para diferenciar entre un locus genómico o un alelo metilado y sin metilar se caracteriza porque permite o asegura una tasa de diferenciación tan alta como sea posible al tiempo que una alta fiabilidad y alta exactitud. Preferiblemente, la diferenciación debe ser posible para cada sitio único que pueda ser metilado. Asimismo, un método adecuado no debe provocar la fragmentación del ADN. Por supuesto, un método adecuado también debe cumplir cuanto sea posible los criterios mencionados anteriormente para una prueba médica, para el procesamiento de muestras remotas y para el análisis de metilación. Por consiguiente, el ADN es tratado con bisulfito de un modo básicamente similar al descrito en el documento WO05/038051.

10

La alta precisión en el pipeteo se caracteriza porque se transfiere a las etapas posteriores únicamente la cantidad necesaria de ADN, lo que permite aprovechar al máximo el ADN de la muestra remota. Además, asegura la utilización de la cantidad óptima de ADN y de otros reactivos. Esto ofrece las relaciones óptimas y con ello un ADN de alta calidad. La pérdida de ADN debida entre otros procesos a la degradación resulta minimizada.

15

La reutilización de los dispositivos de pipeteo también resulta ventajosa. Como resulta conocido por los expertos en la materia, el ADN se une a las superficies de plástico, como por ejemplo las puntas de pipeta. Pero a una superficie que ya ha estado en contacto con ADN se une siempre menos ADN. Por supuesto, lo mismo es cierto para los contenedores de ADN como, por ejemplo, placas de microtitulación, tubos o columnas. No obstante, la reutilización también está limitada por el riesgo de contaminaciones. Por tanto, los dispositivos que entran en contacto con el ADN de una muestra remota sólo se reutilizan con las muestras o el ADN procedentes del mismo paciente o de la misma muestra recogida del paciente. En otra forma de realización preferida, la utilización de dispositivos que entran en contacto con el ADN de la muestra remota se reduce al mínimo.

20

25

En una forma de realización el método de la invención es un método en el cual el volumen de la muestra remota es como mínimo aproximadamente 1,5 ml, aproximadamente 2 ml, aproximadamente 3 ml, aproximadamente 4 ml, aproximadamente 5 ml, aproximadamente 6 ml, aproximadamente 7 ml, aproximadamente 8 ml, aproximadamente 9 ml, aproximadamente 10 ml, aproximadamente 11 ml, aproximadamente 12 ml, aproximadamente 15 ml, aproximadamente 20 ml, aproximadamente 25 ml, aproximadamente 30 ml, aproximadamente 40 ml, o aproximadamente 50 ml. En una forma de realización preferida, el volumen de la muestra remota es por lo menos aproximadamente de 36 ml, aproximadamente 38 ml, aproximadamente 40 ml, aproximadamente 42 ml, o aproximadamente 45 ml. En una forma de realización particularmente preferida, el volumen de la muestra remota es de por lo menos aproximadamente 40 ml. En otra forma de realización preferida, el volumen de la muestra remota es de por lo menos aproximadamente 15 ml, aproximadamente 18 ml, aproximadamente 20 ml, aproximadamente 23 ml, o aproximadamente 25 ml. En una forma de realización particularmente preferida, el volumen de la muestra remota es como mínimo aproximadamente 20 ml. En otra forma de realización preferida, el volumen de la muestra remota es de por lo menos aproximadamente 4 ml, aproximadamente 5 ml, aproximadamente 6 ml, aproximadamente 7 ml, aproximadamente 8 ml, o aproximadamente 9 ml. En una forma de realización particularmente preferida, el volumen de la muestra remota es de por lo menos aproximadamente 6 ml o aproximadamente 8 ml.

30

35

40

De acuerdo con una forma de realización, una muestra remota se toma o se recoge de un individuo. Dicha muestra remota tiene un volumen de como mínimo aproximadamente 1,5 ml, aproximadamente 2 ml, aproximadamente 3 ml, aproximadamente 4 ml, aproximadamente 5 ml, aproximadamente 6 ml, aproximadamente 7 ml, aproximadamente 8 ml, aproximadamente 9 ml, aproximadamente 10 ml, aproximadamente 11 ml, aproximadamente 12 ml, aproximadamente 15 ml, aproximadamente 20 ml, aproximadamente 25 ml, aproximadamente 30 ml, aproximadamente 40 ml, o aproximadamente 50 ml. Preferiblemente, el volumen es como mínimo de aproximadamente 36 ml, aproximadamente 38 ml, aproximadamente 40 ml, aproximadamente 42 ml, o aproximadamente 45 ml. Más preferentemente, el volumen es de por lo menos aproximadamente 40 ml. También preferentemente, el volumen es de por lo menos aproximadamente 15 ml, aproximadamente 18 ml, aproximadamente 20 ml, aproximadamente 23 ml, o aproximadamente 25 ml, y más preferentemente el volumen es de por lo menos aproximadamente 20 ml. También preferentemente, el volumen es de por lo menos aproximadamente 4 ml, aproximadamente 5 ml, aproximadamente 6 ml, aproximadamente 7 ml, aproximadamente 8

45

50

55

ml, o aproximadamente 9 ml. Más preferentemente, el volumen es de por lo menos aproximadamente 6 ml o aproximadamente 8 ml.

5 En el método de la invención se selecciona una muestra remota de un grupo que comprende: muestra de sangre, muestra de plasma, muestra de suero y muestra de orina.

10 La muestra remota es una muestra que se caracteriza porque comprende por lo menos un componente que está localizado principalmente a distancia de otros componentes de dicha muestra. Por ejemplo, la sangre no es una muestra remota respecto a los eritrocitos, pero sí es una muestra remota con respecto a un fragmento de ADN que procede de un tumor localizado en el pulmón. Una muestra remota es una muestra de sangre, plasma, suero u orina.

15 En una forma de realización el método de la invención es un método en el cual la muestra remota es plasma y su preparación comprende una o más de las siguientes etapas:

obtención de por lo menos aproximadamente 5 ml, aproximadamente 10 ml, aproximadamente 15 ml, aproximadamente 20 ml, aproximadamente 25 ml, aproximadamente 30 ml, aproximadamente 35 ml, aproximadamente 40 ml, aproximadamente 45 ml, aproximadamente 50 ml de sangre de un individuo;

20 adición de EDTA (ácido etilendiaminotetraacético) a la sangre con una agitación suave;

ajuste de la sangre hasta obtener una concentración final de EDTA dipotásico (sal dipotásica de ácido etilendiaminotetraacético) de aproximadamente 2,2 $\mu\text{mol/l}$, aproximadamente 3,2 $\mu\text{mol/l}$, aproximadamente 3,7 $\mu\text{mol/l}$, aproximadamente 4,0 $\mu\text{mol/l}$, aproximadamente 4,5 $\mu\text{mol/l}$, aproximadamente 4,9 $\mu\text{mol/l}$, aproximadamente 5,4 $\mu\text{mol/l}$, aproximadamente 5,9 $\mu\text{mol/l}$, o aproximadamente 6,9 $\mu\text{mol/l}$, por medio de una agitación suave;

30 centrifugación de la mezcla de sangre-EDTA a aproximadamente 750 x g, aproximadamente 1000 x g, aproximadamente 1500 x g, o aproximadamente 2000 x g durante aproximadamente 4 min, aproximadamente 8 min, aproximadamente 10 min, aproximadamente 12 min, o aproximadamente 20 min a aproximadamente 1°C, aproximadamente 4°C, aproximadamente 7°C, aproximadamente 10°C, aproximadamente 15°C, aproximadamente 21°C, o aproximadamente 27°C ;

35 transferencia del plasma a un nuevo envase;

centrifugación del plasma a aproximadamente 750 x g, aproximadamente 1000 x g, aproximadamente 1500 x g, o aproximadamente 2000 x g durante aproximadamente 4 min, aproximadamente 8 min, aproximadamente 10 min, aproximadamente 12 min, o aproximadamente 20 min a aproximadamente 1°C, aproximadamente 4°C, aproximadamente 7°C, o aproximadamente 10°C ;

40 transferencia del plasma nuevamente centrifugado a un nuevo envase;

enfriamiento de la muestra de plasma a aproximadamente 0°C, aproximadamente 2°C, aproximadamente 4°C, aproximadamente 6°C, o aproximadamente 10°C;

45 congelación, almacenamiento o transporte de la muestra por lo menos a aproximadamente -10°C, aproximadamente -20°C, aproximadamente -50°C, aproximadamente -60°C, aproximadamente -70°C, aproximadamente -80°C, aproximadamente -90°C, o aproximadamente -196°C; y

50 proporcionar la muestra remota desde la obtención de la sangre de un individuo hasta la congelación del correspondiente plasma centrifugado dos veces debe realizarse en el plazo de aproximadamente 1, aproximadamente 2, aproximadamente 3, aproximadamente 4, aproximadamente 5, aproximadamente 6, o aproximadamente 8 horas.

55 De acuerdo con una forma de realización, una muestra remota es plasma. De acuerdo con una forma de realización preferida la preparación del plasma comprende una o más de las siguientes etapas:

obtención de por lo menos aproximadamente 5 ml, aproximadamente 10 ml, aproximadamente 15 ml, aproximadamente 20 ml, aproximadamente 25 ml, aproximadamente 30 ml, aproximadamente 35 ml, aproximadamente 40 ml, aproximadamente 45 ml, aproximadamente 50 ml de sangre de un individuo;

5 adición de EDTA (ácido etilendiaminotetraacético) a la sangre con una agitación suave;

ajuste de la sangre hasta obtener una concentración final de EDTA dipotásico (sal dipotásica de ácido etilendiaminotetraacético) de aproximadamente 2,2 $\mu\text{mol/l}$, aproximadamente 3,2 $\mu\text{mol/l}$, aproximadamente 3,7 $\mu\text{mol/l}$, aproximadamente 4,0 $\mu\text{mol/l}$, aproximadamente 4,5 $\mu\text{mol/l}$, aproximadamente 4,9 $\mu\text{mol/l}$,
10 aproximadamente 5,4 $\mu\text{mol/l}$, aproximadamente 5,9 $\mu\text{mol/l}$, o aproximadamente 6,9 $\mu\text{mol/l}$, mediante la mezcla suave por inversión inmediata por lo menos aproximadamente 2 veces, aproximadamente 4 veces, aproximadamente 6 veces, aproximadamente 8 veces, aproximadamente 10 veces, aproximadamente 12 veces, aproximadamente 14 veces, o aproximadamente 18 veces;

15 centrifugación de la mezcla de sangre-EDTA a aproximadamente 750 x g, aproximadamente 1.000 x g, aproximadamente 1.500 x g, o aproximadamente 2.000 x g durante aproximadamente 4 min, aproximadamente 8 min, aproximadamente 10 min, aproximadamente 12 min, o aproximadamente 20 min a aproximadamente 1°C, aproximadamente 4°C, aproximadamente 7°C, aproximadamente 10°C, aproximadamente 15°C, aproximadamente 21°C, o aproximadamente 27°C ;

20 transferencia de la fase superior transparente a un nuevo envase: el recipiente centrifugado se mantiene derecho y la pipeta se inclina hasta tocar el borde del recipiente y la superficie de la fase superior transparente, transfiriendo sólo la fase superior transparente hasta que su superficie quede más de aproximadamente 20 mm, aproximadamente 10 mm, aproximadamente 7 mm, aproximadamente 5 mm, o aproximadamente 4 mm por encima
25 de la superficie de la siguiente capa, la capa leucocítica;

centrifugación de la muestra de plasma a aproximadamente 750 x g, aproximadamente 1.000 x g, aproximadamente 1.500 x g, o aproximadamente 2.000 x g durante aproximadamente 4 min, aproximadamente 8 min, aproximadamente 10 min, aproximadamente 12 min, o aproximadamente 20 min a aproximadamente 1°C,
30 aproximadamente 4°C, aproximadamente 7°C, o aproximadamente 10°C ;

transferencia de la muestra de plasma centrifugada por segunda vez a uno nuevo recipiente, de modo que más de aproximadamente 20 ml, aproximadamente 12 ml, aproximadamente 8 ml, aproximadamente 5 ml, o aproximadamente 4 ml de la muestra de plasma centrifugada dos veces más baja permanezcan en el recipiente de
35 centrifugación;

enfriamiento de la muestra de sangre, la muestra de plasma o la muestra intermedia a aproximadamente 0°C, aproximadamente 2°C, aproximadamente 4°C, aproximadamente 6°C, o aproximadamente 10°C;

40 congelación, almacenamiento o transporte de una muestra de plasma o una muestra intermedia por lo menos a aproximadamente -10°C, aproximadamente -20°C, aproximadamente -50°C, aproximadamente -60°C, aproximadamente -70°C, aproximadamente -80°C, aproximadamente -90°C, o aproximadamente -196°C; y

45 proporcionar la muestra remota desde la obtención de la sangre de un individuo hasta la congelación de la correspondiente muestra de plasma centrifugada dos veces debe realizarse en el plazo de aproximadamente 1, aproximadamente 2, aproximadamente 3, aproximadamente 4, aproximadamente 5, aproximadamente 6, o aproximadamente 8 horas.

En una forma de realización preferida, el método de la invención es un método en el cual la muestra remota es una
50 muestra de plasma y su preparación comprende una o varias de las siguientes etapas:

obtención de por lo menos aproximadamente 35 ml, aproximadamente 40 ml, aproximadamente 45 ml, o aproximadamente 50 ml de sangre de un individuo;

55 ajuste de la sangre hasta obtener una concentración final de EDTA dipotásico (sal dipotásica de ácido etilendiaminotetraacético) de aproximadamente 3,7 $\mu\text{mol/l}$, aproximadamente 4,0 $\mu\text{mol/l}$, aproximadamente 4,5 $\mu\text{mol/l}$, aproximadamente 4,9 $\mu\text{mol/l}$, o aproximadamente 5,4 $\mu\text{mol/l}$ mediante agitación suave;

- centrifugación de la mezcla de sangre-EDTA a aproximadamente 1500 x g durante aproximadamente 10 min a aproximadamente 4°C, preferentemente sin accionar los frenos para detener la centrifuga;
- 5 transferencia del plasma a un nuevo recipiente;
- centrifugación del plasma a aproximadamente 1500 x g durante aproximadamente 10 min a aproximadamente 4°C, preferentemente sin accionar los frenos para detener la centrifuga;
- 10 transferencia del plasma centrifugado por segunda vez a un nuevo recipiente;
- enfriamiento de la muestra de plasma aproximadamente a 0°C, aproximadamente a 2°C, o aproximadamente a 4°C;
- 15 congelación, almacenamiento o transporte de la muestra de plasma por lo menos aproximadamente a -70°C, aproximadamente a -80°C, o aproximadamente a -90°C; y
- proporcionar la muestra remota desde la obtención de la sangre de un individuo hasta la congelación del correspondiente plasma centrifugado dos veces debe realizarse en el plazo aproximado de 4 horas.
- 20 De acuerdo con una forma de realización preferida, la muestra remota es una muestra de plasma y la preparación de dicha muestra comprende una o varias de las siguientes etapas:
- obtención de por lo menos aproximadamente 35 ml, aproximadamente 40 ml, aproximadamente 45 ml, o aproximadamente 50 ml de sangre de un individuo;
- 25 ajuste de la sangre hasta obtener una concentración final de EDTA dipotásico (sal dipotásica de ácido etilendiaminotetraacético) de aproximadamente de 3,7 µmol/l, aproximadamente 4,0 µmol/l, aproximadamente 4,5 µmol/l, aproximadamente 4,9 µmol/l, o aproximadamente 5,4 µmol/l mediante la mezcla suave por inversión inmediata aproximadamente unas 10 veces;
- 30 centrifugación de la mezcla de sangre-EDTA a aproximadamente 1.500 x g durante aproximadamente 10 min a aproximadamente 4°C, preferentemente sin accionar los frenos para detener la centrifuga;
- 35 transferencia de la fase superior transparente a un nuevo recipiente: el recipiente centrifugado se mantiene derecho y la pipeta se inclina hasta tocar el borde del recipiente y la superficie de la fase superior transparente, transfiriendo la fase superior transparente hasta que su superficie permanezca más de aproximadamente 5 mm por encima de la superficie de la siguiente capa, la capa leucocítica;
- 40 centrifugación de la muestra de plasma a aproximadamente 1500 x g durante aproximadamente 10 min a aproximadamente 4°C, preferentemente sin accionar los frenos para detener la centrifuga;
- transferencia de la muestra de plasma centrifugada por segunda vez a un nuevo recipiente, de modo que más de aproximadamente 5 ml de la muestra de plasma centrifugada dos veces más baja permanezcan en el envase de centrifugación;
- 45 enfriamiento de una muestra de sangre, muestra de plasma o muestra intermedia aproximadamente a 0°C, aproximadamente a 2°C, o aproximadamente a 4°C;
- 50 congelación, almacenamiento o transporte de una muestra de plasma o una muestra intermedia por lo menos aproximadamente a -70°C, aproximadamente -80°C, o aproximadamente -90°C; y
- proporcionar la muestra remota desde la obtención de la sangre de un individuo hasta la congelación de la correspondiente muestra de plasma centrifugada dos veces debe realizarse en el plazo aproximado de 4 horas.
- 55 En una forma de realización el método de la invención es un método en el cual la muestra remota es orina y la preparación de dicha muestra comprende una o varias de las siguientes etapas:

realización de una palpación de la próstata, un masaje prostático o ambos desde la mitad de la próstata hasta el lado izquierdo de la misma, hasta el lado derecho de la misma o a ambos lados durante aproximadamente 10 s, aproximadamente 30 s, aproximadamente 50 s, aproximadamente 60 s, aproximadamente 75 s, o aproximadamente 120 s;

5 recogida de aproximadamente los primeros 5 ml, 10 ml, 15 ml, 20 ml, 25 ml, 30 ml, 40 ml de orina evacuada (volúmenes aproximados);

adición de EDTA a la orina;

10 ajuste de la orina hasta obtener una concentración final de EDTA (ácido etilendiaminotetraacético) de 3 mmol/l, aproximadamente 6 mmol/l, aproximadamente 7 mmol/l, aproximadamente 8 mmol/l, aproximadamente 9 mmol/l, aproximadamente 9,80 mmol/l, aproximadamente 10 mmol/l, aproximadamente 11 mmol/l, aproximadamente 12 mmol/l, aproximadamente 13 mmol/l, aproximadamente 14 mmol/l, aproximadamente 18 mmol/l, o aproximadamente 25 mmol/l (ácido etilendiaminotetraacético) con un pH de aproximadamente 5,0, aproximadamente 6,0, aproximadamente 7,0, aproximadamente 7,5, aproximadamente 8,0, aproximadamente 8,5, aproximadamente 9,0, aproximadamente 10;

20 enfriamiento de la muestra de orina aproximadamente a 0°C, aproximadamente a 2°C, aproximadamente a 4°C, aproximadamente a 6°C, o aproximadamente a 10°C;

congelación, almacenamiento o transporte de la muestra de orina por lo menos aproximadamente a -20°C, aproximadamente a -50°C, aproximadamente a -60°C, aproximadamente a -70°C, aproximadamente a -80°C, aproximadamente a -90°C, o aproximadamente a -196°C; y

25 La preparación de la muestra de orina desde la recogida del primer mililitro de orina evacuada hasta la congelación de la mezcla correspondiente de orina-EDTA debe realizarse en el plazo de aproximadamente 15, aproximadamente 30, aproximadamente 45, aproximadamente 60, aproximadamente 75, aproximadamente 90, o aproximadamente 120 min,

30 De acuerdo con una forma de realización, la muestra remota es orina.

De acuerdo con una forma de realización, la preparación de una muestra de orina comprende por lo menos una de las siguientes etapas:

35 realización de una palpación de la próstata, un masaje prostático o ambos desde la mitad de la próstata hasta el lado izquierdo de la misma, hasta el lado derecho de la misma o a ambos lados durante aproximadamente 10 s, aproximadamente 30 s, aproximadamente 50 s, aproximadamente 60 s, aproximadamente 75 s, o aproximadamente 120 s;

40 recogida de aproximadamente los primeros 5 ml, 10 ml, 15 ml, 20 ml, 25 ml, 30 ml, 40 ml (volúmenes aproximados) de orina evacuada inmediatamente después de la palpación prostática, del masaje prostático o de ambos;

adición inmediata de EDTA dipotásico a la orina;

45 ajustar la orina hasta obtener una concentración final de EDTA (ácido etilendiaminotetraacético) de aproximadamente 3 mmol/l, aproximadamente 6 mmol/l, aproximadamente 7 mmol/l, aproximadamente 8 mmol/l, aproximadamente 9 mmol/l, aproximadamente 9,80 mmol/l, aproximadamente 10 mmol/l, aproximadamente 11 mmol/l, aproximadamente 12 mmol/l, aproximadamente 13 mmol/l, aproximadamente 14 mmol/l, aproximadamente 18 mmol/l, o aproximadamente 25 mmol/l con un pH de aproximadamente 5,0, aproximadamente 6,0, aproximadamente 7,0, aproximadamente 7,5, aproximadamente 8,0, aproximadamente 8,5, aproximadamente 9,0, aproximadamente 10 mediante la mezcla suave por inversión inmediatamente después de la recogida;

55 enfriamiento de la muestra de orina aproximadamente a 0°C, aproximadamente a 2°C, aproximadamente a 4°C, aproximadamente a 6°C, o aproximadamente a 10°C;

congelación, almacenamiento o transporte de la muestra de orina por lo menos aproximadamente a -20°C, aproximadamente -50°C, aproximadamente -60°C, aproximadamente -70°C, aproximadamente -80°C, aproximadamente -90°C, o aproximadamente -196°C; y

5 La preparación de la muestra de orina desde la recogida del primer mililitro de orina evacuada hasta la congelación de la mezcla correspondiente de orina debe realizarse en el plazo de aproximadamente 15, aproximadamente 30, aproximadamente 45, aproximadamente 60, aproximadamente 75, aproximadamente 90, o aproximadamente 120 min.

10 En una forma de realización preferida, el método de la invención es un método en el cual la preparación de la muestra remota de orina comprende una o varias de las siguientes etapas:

realización de una palpación de la próstata, un masaje prostático o de ambos desde la mitad de la próstata hasta el lado izquierdo de la misma, hasta el lado derecho de la misma o a ambos lados durante aproximadamente 60 s;

15 recogida de aproximadamente los primeros 20 ml de orina evacuada;

ajuste de la orina hasta obtener una concentración final de EDTA (ácido etilendiaminotetraacético) de aproximadamente 9 mmol/l, aproximadamente 9,80 mmol/l, aproximadamente 10 mmol/l, o aproximadamente 11 mmol/l, con un pH de aproximadamente 7,5, aproximadamente 8,0, o aproximadamente 8,5;

enfriamiento de la muestra de orina aproximadamente a 0°C, aproximadamente a 2°C, o aproximadamente a 4°C;

25 congelación, almacenamiento o transporte de la muestra de orina por lo menos aproximadamente a -70°C, aproximadamente -80°C, o aproximadamente -90°C; y

proporcionar la muestra de orina desde la recogida del primer mililitro de orina evacuada hasta la congelación de la correspondiente mezcla de orina-EDTA debe realizarse en el plazo de aproximadamente 60 min.

30 De acuerdo con una forma de realización preferida, la muestra remota es una muestra de orina y la preparación de dicha muestra comprende por lo menos una de las siguientes etapas:

realización de una palpación de la próstata, un masaje prostático o de ambos desde la mitad de la próstata hasta el lado izquierdo de la misma, hasta el lado derecho de la misma o a ambos lados durante aproximadamente 60 s;

35 recogida de aproximadamente los primeros 20 ml de orina evacuada inmediatamente después de la palpación prostática, del masaje prostático o de ambos;

ajuste de la orina hasta obtener una concentración final de EDTA (ácido etilendiaminotetraacético) de aproximadamente 9 mmol/l, aproximadamente 9,80 mmol/l, aproximadamente 10 mmol/l, o aproximadamente 11 mmol/l, con un pH de aproximadamente 7,5, aproximadamente 8,0, o aproximadamente 8,5 inmediatamente después de la recogida que comprende una mezcla suave por inversión inmediatamente después de la recogida;

enfriamiento de la muestra de orina aproximadamente a 0°C, aproximadamente a 2°C, o aproximadamente a 4°C

45 congelación, almacenamiento o transporte de la muestra de orina por lo menos aproximadamente a -70°C, aproximadamente -80°C, o aproximadamente -90°C; y

proporcionar la muestra de orina desde la recogida del primer mililitro de orina evacuada hasta la congelación de la correspondiente mezcla de orina debe realizarse en el plazo de aproximadamente 60 min.

En una forma de realización, la preparación de una muestra remota comprende la ejecución de una lista de comprobación, un protocolo estandarizado, o ambos.

55 De acuerdo con una forma de realización, la preparación de una muestra remota comprende la utilización de una lista de comprobación, un protocolo o ambos. De acuerdo con una forma de realización preferida, la lista de comprobación utilizada para preparar una muestra remota comprende una descripción paso a paso de las acciones

necesarias, que sólo deben presentarse o ambas. Puede contener además una nota de precaución. De acuerdo con una forma de realización, un protocolo utilizado para preparar una muestra remota comprende: i) la disposición y la utilización de por lo menos un número de identificación de muestra remota, preferentemente una combinación de cifras y letras o preferentemente un código legible por ordenador como un código de barras, ii) el registro de los datos característicos sobre la muestra, iii) el registro de los datos enmascarados característicos del individuo del que procede la muestra, iv) o combinaciones de los mismos.

En una forma de realización el método de la invención es un método en el cual la muestra remota se divide en distintas submuestras después de preparar la muestra remota.

De acuerdo con una forma de realización, una muestra remota se divide en diferentes submuestras. La finalidad primordial es obtener así altos rendimientos de ADN de la muestra obtenida del paciente. De acuerdo con una forma de realización, el volumen de una muestra remota obtenida de un solo paciente puede ser mayor que el volumen adecuado para el procesamiento. Por tanto, la muestra remota recogida se divide en submuestras. Estas submuestras se consideran también como muestras remotas. Preferiblemente estas muestras remotas se procesan en paralelo. El fraccionamiento de las muestras remotas se realiza sobre todo durante la etapa de extracción del ADN.

En una forma de realización, el método de la invención es un método en el cual la muestra remota o por lo menos un componente de la misma se concentra tras su preparación.

De acuerdo con una forma de realización, la muestra remota se concentra. De acuerdo con una forma de realización, por lo menos un componente de la muestra remota se concentra. Preferiblemente este componente es un componente que contiene ADN. La concentración de la muestra remota o de por lo menos un componente de ella se realiza sobre todo con el fin de obtener altos rendimientos de ADN de la muestra obtenida del paciente. De acuerdo con una forma de realización, el volumen de la muestra remota obtenida de un solo paciente puede ser mayor que el volumen adecuado para el procesamiento. Por tanto, la muestra remota recogida o por lo menos un componente de la misma se concentra. En una forma de realización preferida se utiliza el High Pure Viral Nucleic Acid Kit o por lo menos un componente del mismo para: i) preparar la muestra remota, ii) aislar el ADN, iii) tratar el ADN con un reactivo o una enzima que permita distinguir entre la citosina metilada y sin metilar, iv) o combinaciones de los mismos.

En una forma de realización preferida, el método de la invención es un método en el cual la concentración comprende ultrafiltración, reducción de volumen, o ambos. En una forma de realización preferida, el método de la invención es un método en el cual la concentración comprende la digestión de proteínas. Dichas formas de realización preferidas se llevan a cabo independientemente del aislamiento del ADN o como una subetapa del mismo.

De acuerdo con una forma de realización, la concentración de la muestra remota o de por lo menos un componente de la misma comprende ultrafiltración, reducción del volumen, o ambos. Preferiblemente la concentración comprende la digestión de proteínas. Dichas formas de realización forman parte de la preparación de la muestra remota o forman parte del aislamiento del ADN. De acuerdo con una forma de realización preferida, la concentración de la muestra remota o de por lo menos un componente de ella comprende como mínimo la elección de uno de los elementos del grupo siguiente: proteasa, serinproteasa, tiolproteasa, carboxiproteasa, metaloproteasa, proteinasa K, dispositivo de ultrafiltración, dispositivo con filtro Microcon como por ejemplo la columna Microcon Y-30, dispositivo de filtro, superficie de sílice, membrana de sílice, partícula magnética, partícula de poliestirol, superficie de poliestirol, superficie cargada positivamente, y membrana cargada positivamente, membrana cargada, superficie cargada, membrana de intercambio cargada, superficie de intercambio cargada, columna del ZR DNA Clean & Concentrator-5 Kit, columna del Wizard Genomic DNA Purification Kit, columna del QIAamp DNA Micro Kit, un componente del MagNA Pure Compact Nucleic Acid Isolation Kit (I) Large Volume, un componente del QIAamp UltraSens Virus Kit, un componente del RTP DNA/RNA Virus Supersense Kit, un componente del chemagic Viral DNA/RNA Kit special, un componente del chemagic DNA Blood Kit special, un componente del High Pure Viral Nucleic Acid Kit, un componente del Puregene DNA Isolation Kit, un componente del MasterPure™ Complete DNA and RNA Purification Kit, o un componente del NucliSens Isolation Kit, precipitación con etanol, precipitación con propanol, o concentración en vacío entre otros mediante una centrifuga. Un experto en la materia sabe escoger los dispositivos o kits adecuados teniendo en cuenta las especificaciones indicadas anteriormente y dichos kits. Dichos dispositivos o kits son conocidos en la técnica; véase a continuación una lista de los fabricantes.

En una forma de realización, el método de la invención es un método en el cual el aislamiento del ADN comprende una o varias de las siguientes etapas:

- 5 tratamiento de la muestra remota con una proteasa, tratamiento de la muestra remota con por lo menos un reactivo o solución degradadora de proteínas, colocación del ADN de la muestra remota en contacto con el dispositivo de purificación de ADN, lavado del ADN en el dispositivo de purificación de ADN, y recuperación del ADN a partir del dispositivo de purificación de ADN.
- 10 De acuerdo con una forma de realización, la muestra remota es sometida por lo menos a una de las siguientes etapas: i) tratamiento de la muestra remota con una proteasa o un reactivo degradador de proteínas; ii) tratamiento de la muestra remota con por lo menos un reactivo o solución degradadora de proteínas; purificación del ADN poniéndolo en contacto con un dispositivo purificador de ADN; lavado del ADN; y elución del ADN del dispositivo purificador de ADN.
- 15 De acuerdo con una forma de realización, el aislamiento del ADN de una muestra remota comprende el tratamiento con un reactivo degradador de proteínas. Este reactivo puede ser cualquier tipo de reactivo conocido por un experto en la materia. Entre otros ejemplos no excluyentes, el reactivo degradador de proteína puede ser el bromuro de cianógeno.
- 20 De acuerdo con una forma de realización, el aislamiento del ADN de una muestra remota comprende el tratamiento con un reactivo degradador de proteínas. El reactivo de este tipo puede ser cualquier tipo de reactivo conocido por un experto en la materia. Entre otros ejemplos, el reactivo degradador de proteína puede ser una sal caotrópica como el clorhidrato de guanidina o urea, o un detergente como el dodecilsulfato sódico (SDS).
- 25 De acuerdo con una forma de realización, el aislamiento del ADN de una muestra remota comprende el lavado del ADN, en particular si éste está en contacto con el dispositivo purificador de ADN. Las soluciones y reactivos adecuados son conocidos en la técnica. Entre otros ejemplos no limitativos, la solución de lavado puede ser cualquier mezcla de un alcohol de cadena corta con agua, como etanol al 70% con agua.
- 30 De acuerdo con una forma de realización, el aislamiento del ADN de una muestra remota comprende la elución del ADN del dispositivo purificador de ADN. Tal reactivo puede ser cualquier tipo de reactivo conocido por un experto en la materia. Entre otros ejemplos no limitativos, la solución de elución es agua o cualquier tampón de elución suministrado con el dispositivo purificador de ADN.
- 35 En una forma de realización, el método de la invención es un método que comprende el aislamiento del ADN mediante el tratamiento de la muestra remota con una proteasa, donde la proteasa es como mínimo una seleccionada del grupo siguiente: serinproteasa, tiolproteasa, carboxiproteasa, metaloproteasa y proteinasa K.
- 40 De acuerdo con una forma de realización, la extracción del ADN de una muestra remota comprende la utilización de por lo menos una proteasa del grupo siguiente: serinproteasa, tiolproteasa, carboxiproteasa, metaloproteasa y proteinasa K.
- 45 En una forma de realización, el método de la invención es un método que comprende el aislamiento del ADN mediante la puesta en contacto del ADN de la muestra remota con un dispositivo purificador de ADN, en el que dicho dispositivo purificador es por lo menos uno del grupo siguiente: ultrafiltración, dispositivo con filtro Microcon a título de ejemplo no limitativo, la columna Microcon Y-30, dispositivo de filtro, superficie de sílice, membrana de sílice, partícula magnética, partícula de poliestirol, superficie de poliestirol, superficie cargada positivamente, y membrana cargada positivamente, membrana cargada, superficie cargada, membrana de intercambio cargada, superficie de intercambio cargada, columna del ZR DNA Clean & Concentrator-5 Kit, columna del Wizard Genomic DNA Purification Kit, columna del QIAamp DNA Micro Kit, un componente del MagNA Pure Compact Nucleic Acid Isolation Kit (I) Large Volume, un componente del QIAamp UltraSens Virus Kit, un componente del RTP DNA/RNA Virus Supersense Kit, un componente del chemagic Viral DNA/RNA Kit special, un componente del chemagic DNA Blood Kit special, un componente del High Pure Viral Nucleic Acid Kit, un componente del Puregene DNA Isolation Kit, un componente del MasterPure™ Complete DNA and RNA Purification Kit, o un componente del NucliSens® Isolation Kit. Un experto en la materia también puede pensar en otras posibilidades; algunos ejemplos no limitativos son la precipitación con etanol, la precipitación con propanol, la concentración en vacío entre otros mediante una
- 55

centrífuga. Un experto en la materia sabe escoger los dispositivos o kits teniendo en cuenta las especificaciones mencionadas anteriormente y dichos kits. dichos dispositivos o kits son bien conocidos en la técnica. Los fabricantes actuales son: Roche Diagnostics GmbH en el caso de MagNA Pure Compact Nucleic Acid Isolation Kit (I) Large Volume y del High Pure Viral Nucleic Acid Kit; Quiagen, Inc. en el caso de QIAamp UltraSens Virus Kit, QIAamp DNA Micro Kit o del QIAamp DNA Blood Maxi Kit; Invitex Gesellschaft für Biotechnik & Biodesign mbH en el caso del RTP DNA/RNA Virus Supersense Kit; chemagen AG en el caso de chemagic Viral DNA/RNA Kit special o del chemagic DNA Blood Kit special; Gentra Systems, Inc. en el caso de Puregene DNA Isolation Kit; Epicentre Technologies en el caso de MasterPure™ Complete DNA and RNA Purification Kit, Millipore Inc. en el caso del filtro Microcon, Zymo Research Corporation en el caso de ZR DNA Clean & Concentrator-5 Kit, Promega U.S. en el caso de Wizard Genomic DNA Purification Kit, y bioMérieux SA en el caso de NucliSens® Isolation Kit. Por supuesto, se pueden usar otros dispositivos o kits siempre que estén basados en estos dispositivos o kits, tanto si están disponibles en el momento de realización de la invención como en el futuro.

De acuerdo con una forma de realización, el dispositivo purificador de ADN que se usa para el aislamiento o la extracción del ADN se caracteriza por por lo menos un criterio de los siguientes: ultrafiltración, dispositivo de filtro Microcon como por ejemplo la columna Microcon Y-30, dispositivo de filtro, superficie de sílice, membrana de sílice, partícula magnética, partícula de poliestirol, superficie de poliestirol, superficie cargada positivamente, y membrana cargada positivamente, membrana cargada, superficie cargada, membrana de intercambio cargada, superficie de intercambio cargada, columna del ZR DNA Clean & Concentrator-5 Kit, columna del Wizard Genomic DNA Purification Kit, columna del QIAamp DNA Micro Kit, un componente del MagNA Pure Compact Nucleic Acid Isolation Kit (I) Large Volume, un componente del QIAamp UltraSens Virus Kit, un componente del RTP DNA/RNA Virus Supersense Kit, un componente del chemagic Viral DNA/RNA Kit special, un componente del chemagic DNA Blood Kit special, un componente del High Pure Viral Nucleic Acid Kit, un componente del Puregene DNA Isolation Kit, un componente del MasterPure™ Complete DNA and RNA Purification Kit, un componente del NucliSens® Isolation Kit, precipitación con etanol, precipitación con propanol, o concentración en vacío entre otros mediante una centrífuga. Por supuesto, se pueden usar otros dispositivos o kits adecuados según la invención en la medida en que su uso resulta evidente para el experto en la materia siempre teniendo en cuenta las especificaciones mencionadas anteriormente y dichos kits.

En una forma de realización, el método de la invención es un método en el cual el aislamiento del ADN se lleva a cabo mediante la utilización de por lo menos un kit seleccionado entre los siguientes: MagNA Pure Compact Nucleic Acid Isolation Kit (I) Large Volume, QIAamp UltraSens Virus Kit, QIAamp DNA Blood Maxi Kit, RTP DNA/RNA Virus Supersense Kit, chemagic Viral DNA/RNA Kit special, chemagic DNA Blood Kit special, High Pure Viral Nucleic Acid Kit, Puregene DNA Isolation Kit, MasterPure™ Complete DNA and RNA Purification Kit, o NucliSens® Isolation Kit. Un experto en la materia sabe escoger otros kits adecuados considerando los kits mencionados anteriormente. Dichos kits son bien conocidos en la técnica. Para saber el nombre de los diferentes fabricantes, ver anteriormente. Por supuesto, se pueden usar otros kits siempre que estén basados en tales kits, estén disponibles en el momento de la invención o en el futuro.

De acuerdo con una forma de realización, para la extracción del ADN se usa por lo menos de los siguientes kits: MagNA Pure Compact Nucleic Acid Isolation Kit (I) Large Volume, QIAamp UltraSens Virus Kit, QIAamp DNA Blood Maxi Kit, RTP DNA/RNA Virus Supersense Kit, chemagic Viral DNA/RNA Kit special, chemagic DNA Blood Kit special, High Pure Viral Nucleic Acid Kit, Puregene DNA Isolation Kit, MasterPure™ Complete DNA and RNA Purification Kit, o NucliSens® Isolation Kit. Un experto en la materia puede considerar en otros kits cuando lea los kits mencionados anteriormente. Por supuesto, estos kits se pueden usar de acuerdo con la invención. Esto incluye en particular los kits que están basados en la misma tecnología de los kits mencionados anteriormente, pero que tienen un nombre diferente o similar o son producidos por un fabricante distinto.

Se prefiere la utilización de dichos kits para el aislamiento del ADN porque cumplen los siguientes criterios: i) alto rendimiento de ADN; ii) evitan la contaminación cruzada; iii) alto grado de estandarización; iv) alto grado de automatización; v) bajo esfuerzo de manipulación; vi) bajo coste; vii) facilidad de manipulación; viii) permiten purificar tanto fragmentos pequeños como grandes presentes en la muestra; ix) alta reproducibilidad; x) alta fiabilidad; xi) eliminación eficiente de proteínas, péptidos, aminoácidos, ARN, nucleótidos o bases.

De acuerdo con una forma de realización preferida, los kits MagNA Pure Compact Nucleic Acid Isolation Kit (I) Large Volume o QIAamp UltraSens Virus Kit se usan para el aislamiento del ADN. Esto se debe a que cumplen mejor los criterios especificados anteriormente.

De acuerdo con una forma de realización particularmente preferida, el kit MagNA Pure Compact Nucleic Acid Isolation Kit (I) Large Volume se usa para el aislamiento del ADN porque tiene la reproducibilidad y la fiabilidad más elevadas.

5 En una forma de realización, el método de la invención es un método en el cual el ADN aislado procedente de diferentes muestras se agrupa, se concentra o se agrupa y se concentra.

10 De acuerdo con una forma de realización, el ADN extraído procedente del mismo individuo se agrupa. De acuerdo con una forma de realización, el ADN extraído procedente del mismo individuo se enriquece. De acuerdo con una forma de realización, el ADN extraído procedente del mismo individuo se agrupa y se enriquece simultáneamente.

15 En una forma de realización, el método de la invención es un método en el cual el ADN aislado se concentra y esta concentración comprende por lo menos uno de los siguientes elementos: ultrafiltración, dispositivo con filtro Microcon como por ejemplo la columna Microcon Y-30, dispositivo con filtro, precipitación con etanol, precipitación con propanol, superficie de sílice, membrana de sílice, partícula magnética, partícula de poliestirol, superficie cargada positivamente, y membrana cargada positivamente, membrana cargada, superficie cargada, membrana de intercambio cargada, superficie de intercambio cargada, concentración en vacío, concentración en vacío mediante una centrífuga, columna del ZR DNA Clean & Concentrator-5 Kit, columna del Wizard Genomic DNA Purification Kit, columna del QIAamp DNA Micro Kit, un componente del MagNA Pure Compact Nucleic Acid Isolation Kit (I) Large Volume, un componente del QIAamp UltraSens Virus Kit, un componente del RTP DNA/RNA Virus Supersense Kit, un componente del chemagic Viral DNA/RNA Kit special, un componente del chemagic DNA Blood Kit special, un componente del High Pure Viral Nucleic Acid Kit, un componente del Puregene DNA Isolation Kit, un componente del MasterPure™ Complete DNA and RNA Purification Kit, o un componente del NucliSens® Isolation Kit. Un experto en la materia sabe escoger otros dispositivos o kits teniendo en cuenta las especificaciones mencionadas anteriormente y dichos kits. dichos kits son bien conocidos en la técnica. Respecto a los fabricantes actuales, consultar los mencionados anteriormente. Por supuesto, se pueden usar otros dispositivos o kits siempre que estén basados en dichos dispositivos o kits, estén disponibles en el momento de la realización de la invención o en el futuro.

30 De acuerdo con una forma de realización, el enriquecimiento del ADN se lleva a cabo mediante por lo menos uno de los siguientes métodos o combinaciones de los mismos: ultrafiltración, dispositivo de filtro Microcon como por ejemplo la columna Microcon Y-30, dispositivo de filtro, precipitación con etanol, precipitación con propanol, superficie de sílice, membrana de sílice, partícula magnética, partícula de poliestirol, superficie cargada positivamente, y membrana cargada positivamente, membrana cargada, superficie cargada, membrana de intercambio cargada, superficie de intercambio cargada, concentración en vacío, concentración en vacío mediante una centrífuga, columna del ZR DNA Clean & Concentrator-5 Kit, columna del Wizard Genomic DNA Purification Kit, columna del QIAamp DNA Micro Kit, un componente del MagNA Pure Compact Nucleic Acid Isolation Kit (I) Large Volume, un componente del QIAamp UltraSens Virus Kit, un componente del RTP DNA/RNA Virus Supersense Kit, un componente del chemagic Viral DNA/RNA Kit special, un componente del chemagic DNA Blood Kit special, un componente del High Pure Viral Nucleic Acid Kit, un componente del Puregene DNA Isolation Kit, un componente del MasterPure™ Complete DNA and RNA Purification Kit, o un componente del NucliSens® Isolation Kit.

45 Se prefiere particularmente la utilización de dichos dispositivos porque cumplen mejor los siguientes criterios para una prueba médica basada en una muestra remota: i) alto rendimiento de ADN; ii) evitan la contaminación cruzada; iii) alto grado de estandarización; iv) alto grado de automatización; v) bajo esfuerzo de manipulación; vi) bajo coste; vii) facilidad de manipulación; viii) permiten purificar tanto fragmentos pequeños como grandes presentes en la muestra; ix) alta reproducibilidad; x) alta fiabilidad; xi) eliminación eficiente de proteínas, péptidos, aminoácidos, ARN, nucleótidos o bases.

50 De acuerdo con una forma de realización particularmente preferida, los dispositivos de ultrafiltración, en particular los dispositivos de filtro Microcon se usan para el enriquecimiento o la concentración porque ofrecen el rendimiento más alto de ADN y permiten la recuperación de los fragmentos tanto pequeños como grandes presentes en la muestra.

55 El método de la invención es un método en el cual el reactivo bisulfito que permite la diferenciación de la citosina metilada y sin metilar convierte la citosina sin metilar en uracilo y deja inalterada la citosina metilada.

El tratamiento que permite diferenciar si el ADN está metilado o no en una posición determinada es un tratamiento que convierte la citosina sin metilar en uracilo, mientras que las citosinas metiladas permanecen inalteradas. El tratamiento comprende la utilización de un reactivo bisulfito.

El método de la invención es un método que comprende un reactivo de conversión como reactivo que permite la diferenciación: el reactivo que convierte la citosina sin metilar en uracilo y deja inalterada la citosina metilada es un reactivo bisulfito. Un experto en la materia sabe cómo aplicar un reactivo bisulfito. Se encuentran disponibles kits adecuados para la aplicación del reactivo bisulfito al ADN, como por ejemplo, entre otros: EZ DNA Methylation-Gold Kit (Zymo Research Corporation), Methylamp DNA Modification Kit (Epigentek Inc.), MethylEasy DNA Bisulphite Modification Kit (Human Genetic Signatures Pty Ltd).

El tratamiento que provoca la conversión de la citosina sin metilar en uracilo y que deja las citosinas metiladas inalteradas comprende la utilización de un reactivo bisulfito. Un experto en la materia conoce los métodos o kits aplicables para el tratamiento con bisulfito. Por ejemplo, entre otros, los kits pueden ser: EZ DNA Methylation-Gold Kit (Zymo Research Corporation), Methylamp DNA Modification Kit (Epigentek Inc.), MethylEasy DNA Bisulphite Modification Kit (Human Genetic Signatures Pty Ltd).

El tratamiento con bisulfito se lleva a cabo básicamente del modo descrito en el documento WO05/038051. Según esta referencia, en una forma de realización el ADN se hace reaccionar con un reactivo bisulfito, caracterizado porque dicha reacción se lleva a cabo en presencia de un compuesto del grupo del dioxano, uno de sus derivados y un éter alifático cíclico similar.

En una forma de realización el ADN se hace reaccionar con un reactivo bisulfito, caracterizado porque dicha reacción se lleva a cabo en presencia de un compuesto con la siguiente fórmula:



n = 1-35000

m = 1-3

R1 = H, Me, Et, Pr, Bu

R2 = H, Me, Et, Pr, Bu

Por tanto, se prefieren los compuestos n-alquilenglicoles, en particular sus dialquiléteres, y especialmente el dietilenglicoldimetiléter (DME).

La conversión con bisulfito puede tener lugar tanto en solución como con el ADN unido a una fase sólida. Es preferible usar disulfito sódico (= bisulfito sódico/metabisulfito sódico), puesto que es más soluble en agua que el sulfito sódico. La sal de disulfito se disocia en solución acuosa y genera los aniones hidrogenosulfito necesarios para la conversión de la citosina. Cuando la concentración de bisulfito se mencione a continuación, se referirá a la concentración de aniones hidrogenosulfito y sulfito presentes en la solución de reacción. Para el método acorde con la invención son posibles concentraciones comprendidas entre 0,1 y 6 mol/l. En particular se prefiere un intervalo de concentración de 1 a 6 mol/l, y en particular se prefiere sobre todo 2-4 mol/l. No obstante, si se utiliza dioxano, la concentración máxima de bisulfito que se puede utilizar es más pequeña (véase abajo). A la hora de seleccionar la concentración de bisulfito se debe considerar que una concentración alta de bisulfito produce una alta conversión, pero también una elevada tasa de descomposición debido al pH inferior.

El dioxano se puede utilizar en distintas concentraciones. Preferiblemente, la concentración de dioxano debe estar comprendida entre el 10% y el 35% (vol/vol), pero en particular se prefiere del 20% al 30%, y sobre todo entre el 22% y el 28%, especialmente el 25%. Una concentración de dioxano superior al 35% es problemática porque provoca la formación de dos fases dentro de la solución de reacción. En las formas de realización particularmente preferidas con una concentración de dioxano de 22-28%, la concentración final preferida de bisulfito oscila entre 3,3 y 3,6 mol/l, y la forma de realización más preferida, con una concentración de dioxano del 25%, es de 3,5 mol/l (véanse Ejemplos).

Según la invención los compuestos n-alquilenglicoles se pueden utilizar en un intervalo de concentración distinto. El DME se utiliza preferentemente en concentraciones comprendidas entre 1-35% (vol/vol). Éstas preferentemente deberían oscilar entre 5% y 25%, y todavía más preferentemente del 10% de DME.

- 5 Los captadores de radicales libres preferidos para la invención son los derivados del cromano, p. ej., ácido 6-hidroxi-2,5,7,8,-tetrametilcromano 2-carboxílico (también conocido como: Trolox-C™). Otros captadores de radicales libres se citan en la solicitud de patente WO 01/98528 (= DE 100 29 915; = solicitud US 10/311.661).

10 La conversión con bisulfito se puede realizar en un amplio intervalo de temperatura comprendido entre 0 y 95°C. No obstante, dado que a temperaturas altas las tasas de conversión y descomposición del ADN aumentan, en una forma de realización preferida la temperatura de reacción oscila entre 0-80°C, preferentemente entre 30-80°C. Particularmente se prefiere un intervalo entre 50-70°C; y sobre todo se prefiere entre 57-65°C. El tiempo de reacción óptimo del tratamiento con bisulfito depende de la temperatura de reacción. El tiempo de reacción oscila normalmente entre 1 y 18 horas (véase: Grunau et al. 2001, Nucleic Acids Res. 2001, 29 (13): E65-5).

15 El tiempo de reacción es normalmente de 4-6 horas para una temperatura de reacción de 60°C.

20 En una forma de realización particularmente preferida del método según la invención, la conversión con bisulfito se lleva a cabo con temperaturas de reacción bajas, en las que la temperatura de reacción se aumenta claramente durante un breve período por lo menos una vez durante el curso de la conversión. De esta forma se puede aumentar claramente la eficacia de la conversión con bisulfito. Los aumentos de temperatura de corta duración se denominan "picos térmicos" a continuación. La temperatura de reacción "estándar" fuera de los picos térmicos se denomina temperatura de reacción básica. La temperatura de reacción básica oscila entre 0 y 80°C, preferentemente entre 30-80°C, más preferentemente entre 50-70°C, y sobre todo preferentemente entre 57-65°C, como se describe anteriormente.

30 La temperatura de reacción durante un pico térmico aumenta por encima de 85°C por lo menos durante un pico. El número óptimo de picos térmicos es una función de la temperatura de reacción básica. Cuanto mayor es el número óptimo de picos térmicos, menor es la temperatura de reacción básica. En todo caso es necesario como mínimo un pico térmico. Y, por otra parte, en principio, es concebible cualquier número de picos térmicos. Por supuesto, se debe tener en cuenta que con un gran número de aumentos de la temperatura, la descomposición del ADN también aumenta, y no se puede asegurar una conversión óptima. El número preferido de picos térmicos oscila, pues, entre 1 y 10 picos cada vez, dependiendo de la temperatura de reacción básica. Se prefiere particularmente entre dos y 5 picos térmicos. Los picos térmicos aumentan la temperatura de reacción preferentemente hasta el intervalo de 85 a 100°C, particularmente hasta 90-100°C, y más preferentemente hasta 94°C-100°C.

40 La duración de los picos térmicos también depende del volumen del lote de reacción. Es preciso asegurarse de que la temperatura aumente uniformemente en toda la solución de reacción. Para un lote de reacción de 20 µl, cuando se utilice un termociclador la duración debe oscilar entre 15 segundos y 1,5 minutos, aunque se prefiere especialmente una duración entre 20 y 50 segundos; en una forma de realización particularmente preferida la duración es de 30 segundos. Operando con un volumen de 100 µl el intervalo preferido oscila entre 30 segundos y 5 minutos, especialmente entre 1 y 3 minutos; particularmente se prefiere 1,5-3 minutos. Para un volumen de 600 µl, se prefiere una duración de 1 a 6 minutos, pero especialmente entre 2 y 4 minutos; particularmente se prefiere una duración de 3 minutos. Un experto en la materia podrá determinar fácilmente las duraciones adecuadas de los picos térmicos para los diversos volúmenes de reacción. El uso descrito de los picos térmicos propicia unas tasas de conversión significativamente mejores en la reacción de conversión con bisulfito, aunque no se utilicen los solventes desnaturalizantes descritos.

50 Según la invención, el tratamiento del ADN con bisulfito posee varias ventajas importantes en comparación con otros métodos o kits conocidos en la técnica. Estas ventajas son: i) rendimiento superior de ADN convertido; ii) una conversión casi completa de la citosina sin metilar, mientras que la citosina metilada permanece inalterada; y iii) casi no se produce más fragmentación del ADN. Estas ventajas se basan en unas condiciones de reacción más suaves gracias a: i) la desnaturalización térmica del ADN; ii) una concentración de bisulfito comparativamente baja; iii) un pH ligeramente más alcalino; y iv) la utilización de un captador de radicales libres más eficiente y eficaz.

55 En una forma de realización preferida, el método de la invención es un método en el cual el ADN tratado con un reactivo bisulfito comprende:

- mezcla de aproximadamente 10 a 250 μ l de una solución que contiene ADN con aproximadamente 45 a 750 μ l de solución de bisulfito, teniendo esta solución de bisulfito un pH comprendido aproximadamente entre 5,45 y 5,50 y conteniendo aproximadamente de 4,83 a 4,93 mol/l de hidrogenosulfito;
- 5 adición de aproximadamente 5 a 500 μ l de una solución con captadores de radicales orgánicos, conteniendo dicha solución de captación de radicales un solvente orgánico y aproximadamente 10 a 750 mmol/l de ácido 6-hidroxi-2,5,7,8-tetrametil-croman-2-carboxílico; y
- 10 aplicación de un protocolo de temperatura durante aproximadamente 2 a 18 h, en que la reacción se produce en un intervalo de temperatura de aproximadamente 0 a 80°C con aproximadamente entre 2 y 5 aumentos adicionales de la temperatura, en cada caso durante aproximadamente 0,5 a 10 min, hasta alcanzar una temperatura de aproximadamente 85 a 100°C, incluido un aumento inicial de la temperatura hasta un intervalo aproximado de 85 a 100°C.
- 15 De acuerdo con una forma de realización preferida, el tratamiento que comprende la utilización de un reactivo de bisulfito consta además de:
- 20 mezcla de aproximadamente 10 hasta aproximadamente 250 μ l de una solución que contiene ADN con aproximadamente 45 hasta aproximadamente 750 μ l de solución bisulfito, teniendo esta solución bisulfito un intervalo de pH de aproximadamente 5,45 a 5,50 y conteniendo aproximadamente entre 4,83 y aproximadamente 4,93 mol/l de hidrogenosulfito;
- 25 adición de aproximadamente 5 a aproximadamente 500 μ l de una solución de captadores de radicales orgánicos; dicha solución contiene un solvente orgánico y aproximadamente entre 10 y 750 mmol/l de ácido 6-hidroxi-2,5,7,8-tetrametil-croman-2-carboxílico; y
- 30 aplicación de un protocolo de temperatura entre aproximadamente 2 y 18 h, en el que la reacción se realiza en un intervalo de temperatura de aproximadamente 0 a 80°C con aproximadamente 2 a 5 aumentos adicionales de la temperatura, en cada caso durante aproximadamente 0,5 a 10 min, hasta una temperatura de aproximadamente 85 a 100°C incluido un aumento inicial de la temperatura hasta alcanzar aproximadamente una temperatura de 85 a 100°C.
- 35 En una forma de realización particularmente preferida, el método de la invención es un método en el cual el tratamiento del ADN con un reactivo bisulfito comprende:
- mezcla de aproximadamente 50 a 150 μ l de una solución que contiene ADN con aproximadamente 177 a 531 μ l de solución bisulfito;
- 40 adición de aproximadamente 73 a 219 μ l de solución de dioxano, conteniendo dicha solución de dioxano aproximadamente 157 mmol/l de ácido 6-hidroxi-2,5,7,8-tetrametil-croman-2-carboxílico disuelto en 1,4-dioxano; y
- 45 aplicación de un protocolo de temperatura durante aproximadamente 3 a 16 h, en que la reacción se lleva a cabo en un intervalo de temperatura de aproximadamente 57 a 65°C con aproximadamente 2 a 5 aumentos adicionales de la temperatura, en cada caso durante aproximadamente 3 a 5 min, hasta alcanzar una temperatura comprendida aproximadamente entre 94 y 100°C e incluyendo un aumento inicial de la temperatura hasta alcanzar una temperatura de aproximadamente 94 a 100°C.
- 50 De acuerdo con una forma de realización preferida determinada, el tratamiento con bisulfito del ADN comprende:
- la mezcla de aproximadamente 50 a 150 μ l de la solución que contiene ADN con aproximadamente 177 a 531 μ l de la solución de bisulfito;
- 55 la adición de aproximadamente 73 a 219 μ l de la solución de dioxano, solución de dioxano que contiene aproximadamente 157 mmol/l de ácido 6-hidroxi-2,5,7,8-tetrametil-croman-2-carboxílico disuelto en 1,4-dioxano; y

aplicación de un protocolo de temperatura durante aproximadamente 3 a 16 h, en el que la reacción se lleva a cabo en un intervalo de temperatura de aproximadamente 57 a 65°C con aproximadamente 2 a 5 aumentos adicionales de temperatura, en cada caso durante aproximadamente 3 a 5 min, hasta alcanzar una temperatura de aproximadamente 94 a 100°C incluido un aumento inicial de la temperatura hasta alcanzar aproximadamente entre 94 y 100°C.

En una forma de realización preferida, el método de la invención es un método en el cual el tratamiento del ADN con un reactivo bisulfito comprende:

la mezcla de aproximadamente 50 a 150 µl de una solución que contiene el ADN con aproximadamente 95 a 285 µl de la solución de bisulfito;

la adición de aproximadamente 15 a 45 µl de solución de DME, solución que contiene aproximadamente 500 mmol/l de ácido 6-hidroxi-2,5,7,8-tetrametil-croman-2-carboxílico disuelto en dietilenglicoldimetiléter; y

aplicación de un protocolo de temperatura durante aproximadamente 3 a 16 h, en que la reacción se lleva a cabo en un intervalo de temperatura de aproximadamente 57 a 65°C con aproximadamente 2 a 5 aumentos adicionales de temperatura, en cada caso de aproximadamente 3 a 5 min, hasta alcanzar una temperatura de aproximadamente 94 a 100°C incluido un aumento inicial de la temperatura hasta alcanzar aproximadamente entre 94 y 100°C.

De acuerdo con una forma de realización preferida determinada, el tratamiento con bisulfito del ADN comprende:

la mezcla de aproximadamente 50 a 150 µl de una solución que contiene el ADN con aproximadamente 95 a 285 µl de solución bisulfito;

adición de aproximadamente 15 a 45 µl de solución de DME, conteniendo dicha solución aproximadamente 500 mmol/l de ácido 6-hidroxi-2,5,7,8-tetrametil-croman-2-carboxílico disuelto en dietilenglicoldimetiléter; y

aplicación de un protocolo de temperatura durante aproximadamente 3 a 16 h, en que la reacción se lleva a cabo en un intervalo de temperatura de aproximadamente 57 a 65°C con aproximadamente 2 a 5 aumentos adicionales de temperatura, en cada caso durante aproximadamente 3 a 5 min, hasta alcanzar una temperatura de aproximadamente 94 a 100°C incluyendo un aumento inicial de la temperatura hasta alcanzar aproximadamente 94 a 100°C.

De acuerdo con una forma de realización, el método de la invención es un método en el cual el ADN tratado con bisulfito es sometido directamente a métodos de análisis de la metilación. Esto es especialmente preferido para evitar las contaminaciones cruzadas en los métodos basados en la PCR. Esta forma de realización se lleva a cabo básicamente del modo descrito en el documento US 11/248.721. Según esto, se prepara ADN descontaminado que es adecuado para el análisis de la metilación del ADN. Esta forma de realización se caracteriza porque el ADN se incuba con una solución que contiene un reactivo bisulfito como se describe anteriormente. Esto produce una sulfonación, una desaminación, o ambas de la citosina sin metilar. La desaminación es un proceso espontáneo que tiene lugar en una solución acuosa y que da como resultado un ADN que contiene uracilo sulfonado. Todavía no se ha producido la desulfonación.

En una etapa dintinta, el ADN con uracilo sulfonado se pone en contacto y se incuba con una enzima que degrada específicamente los ácidos nucleicos que contienen uracilo no sulfonado. Esta enzima es, por ejemplo, la uracilo-ADN-glucosilasa (UNG).

En una forma de realización preferida para preparar un ADN molde descontaminado para las reacciones de amplificación con polimerasa, el ADN molde sulfonado y/o desaminado se mezcla con una actividad UNG y con los componentes necesarios para una reacción de amplificación con polimerasa o un ensayo de detección basado en la amplificación. Tras la degradación de los ácidos nucleicos portadores de uracilo no sulfonado por la acción de la UNG, la actividad UNG se termina y el ADN molde se desulfona aumentando la temperatura. Después, el ADN molde está preparado para ser amplificado.

En una forma de realización preferida, la degradación, terminación, desulfonación y la amplificación se producen en un mismo tubo durante una reacción de amplificación con polimerasa y/o un ensayo basado en amplificación. Preferiblemente esta amplificación debe realizarse en presencia de dUTP en lugar de dTTP.

- 5 El ADN sulfonado y parcialmente o totalmente desaminado tras el tratamiento con bisulfito es sometido directamente a una reacción de amplificación con polimerasa y/o un ensayo de amplificación sin desulfonación previa. La desulfonación se produce durante el aumento inicial de temperatura de la reacción de amplificación.

- 10 Estas formas de realización particulares tienen la ventaja en comparación con los métodos conocidos de tratamiento con bisulfito de que la etapa de purificación que sigue al tratamiento con bisulfito es prescindible. Se trata de una simplificación que reduce los costes y el esfuerzo de manipulación, minimiza la pérdida de ADN tratado con bisulfito y también ahorra tiempo.

- 15 En una forma de realización, el método de la invención es un método en el cual el ADN tratado con un reactivo bisulfito para permitir la diferenciación del estado de metilación comprende la purificación del ADN tratado.

De acuerdo con una forma de realización, el tratamiento que propicia la conversión de la citosina sin metilar en uracilo y deja inalteradas las citosinas metiladas comprende la purificación del ADN tratado con bisulfito.

- 20 En una forma de realización preferida, el método de la invención es un método en el cual la purificación del ADN tratado comprende la utilización de por lo menos uno de los siguientes elementos:

- 25 ultrafiltración, dispositivo de filtro Microcon, dispositivo de filtro, etanol, propanol, superficie de sílice, membrana de sílice, partícula magnética, partícula de poliestirol, superficie cargada positivamente, y membrana cargada positivamente, membrana cargada, superficie cargada, membrana de intercambio cargada, superficie de intercambio cargada, columna del ZR DNA Clean & Concentrator-5 Kit, columna del Wizard Genomic DNA Purification Kit, columna del QIAamp ADN Micro Kit, un componente del MagNA Pure Compact Nucleic Acid Isolation Kit (I) Large Volume, un componente del QIAamp UltraSens Virus Kit, un componente del RTP DNA/RNA Virus Supersense Kit, un componente del chemagic Viral DNA/RNA Kit special, un componente del chemagic DNA Blood Kit special, un
30 componente del High Pure Viral Nucleic Acid Kit, un componente del Puregene DNA Isolation Kit, un componente del MasterPure™ Complete DNA and RNA Purification Kit, o un componente del NucliSens® Isolation Kit. Un experto en la materia sabe seleccionar otros dispositivos o kits adecuados teniendo en cuenta las especificaciones mencionadas anteriormente y dichos kits. Dichos kits son bien conocidos en la técnica. Respecto a los fabricantes actuales ver lo expuesto anteriormente. Por supuesto, se pueden usar otros dispositivos o kits siempre que estén basados en dichos dispositivos o kits, ya estén disponibles en el momento de la fabricación de la invención o en el futuro.

- De acuerdo con una forma de realización, la purificación del ADN tratado con bisulfito comprende la utilización de por lo menos uno de los siguientes métodos o combinaciones de los mismos: ultrafiltración, dispositivo de filtro
40 Microcon, dispositivo de filtro, etanol, propanol, superficie de sílice, membrana de sílice, partícula magnética, partícula de poliestirol, superficie cargada positivamente, y membrana cargada positivamente, membrana cargada, superficie cargada, membrana de intercambio cargada, superficie de intercambio cargada, columna del ZR DNA Clean & Concentrator-5 Kit, columna del Wizard Genomic DNA Purification Kit, columna del QIAamp DNA Micro Kit, un componente del MagNA Pure Compact Nucleic Acid Isolation Kit (I) Large Volume, un componente del QIAamp
45 UltraSens Virus Kit, un componente del RTP DNA/RNA Virus Supersense Kit, un componente del chemagic Viral DNA/RNA Kit special, un componente del chemagic DNA Blood Kit special, un componente del High Pure Viral Nucleic Acid Kit, un componente del Puregene DNA Isolation Kit, un componente del MasterPure™ Complete DNA and RNA Purification Kit, o un componente del NucliSens® Isolation Kit.

- 50 De acuerdo con una forma de realización preferida, los dispositivos de ultrafiltración, en particular los dispositivos de filtro Microcon se utilizan para la purificación, desulfonación, o purificación y desulfonación del ADN tratado con bisulfito porque ofrecen el rendimiento más alto de ADN tratado con bisulfito y permiten la recuperación de los fragmentos tratados con bisulfito pequeños y grandes presentes en la muestra después del tratamiento con bisulfito.

- 55 En una forma de realización preferida determinada, el método de la invención es un método, en que la purificación del ADN tratado comprende:

- la adición de aproximadamente 50 a 1.000 μ l de agua a la muestra después de la reacción con bisulfito;
- la colocación de la mezcla en un dispositivo de filtro Microcon y su posterior centrifugación aproximadamente entre 10.000 y 18.000 x g durante aproximadamente 10 a 30 min;
- 5 lavado con aproximadamente 100 a 800 μ l de hidróxido sódico aproximadamente 0,2 mol/l, y posterior centrifugación a aproximadamente entre 10.000 y 18.000 x g durante aproximadamente 6 a 25 min;
- 10 aplicación de aproximadamente 100 a 800 μ l de hidróxido sódico aproximadamente 0,1 mol/l, y posterior centrifugación a aproximadamente entre 10.000 y 18.000 x g durante aproximadamente 6 a 25 min;
- aplicación, en 1 a aproximadamente 8 repeticiones, de lo siguiente: aplicación de aproximadamente 100 a 400 μ l de agua o tampón TE y después centrifugación aproximadamente entre 10.000 y 18.000 x g durante aproximadamente 6 a 25 min; y
- 15 elución mediante la aplicación de aproximadamente 25 a 200 μ l de tampón TE precalentado hasta aproximadamente 15 a 65°C, incubación durante aproximadamente 1 a 30 min a una temperatura de aproximadamente 15 a 65°C, y la inversión posterior del dispositivo de filtro Microcon y centrifugación a entre aproximadamente 500 y 5.000 x g durante aproximadamente 0,5 a 30 min.
- 20 De acuerdo con una forma de realización preferida, la purificación y la desulfonación del ADN tratado con bisulfito comprende:
- la adición de aproximadamente 50 a 1.000 μ l de agua a la muestra después de la reacción con bisulfito;
- 25 la colocación de la mezcla en un dispositivo de filtro Microcon y posterior centrifugación a aproximadamente 10.000 a 18.000 x g durante aproximadamente 10 a 30 min;
- lavado con aproximadamente 100 a 800 μ l de hidróxido sódico aproximadamente 0,2 mol/l, y posterior centrifugación a aproximadamente entre 10.000 y 18.000 x g durante aproximadamente 6 a 25 min;
- 30 aplicación de aproximadamente 100 a 800 μ l de hidróxido sódico aproximadamente 0,1 mol/l, y posterior centrifugación a aproximadamente entre 10.000 y 18.000 x g durante aproximadamente 6 a 25 min;
- 35 aplicación, en entre 1 y aproximadamente 8 repeticiones, de lo siguiente: aplicación de aproximadamente 100 a 400 μ l de agua o tampón TE y posterior centrifugación a aproximadamente entre 10.000 y 18.000 x g durante aproximadamente 6 a 25 min; y
- 40 elución mediante la aplicación de aproximadamente 25 a 200 μ l de tampón TE precalentado entre aproximadamente 15 y 65°C, incubación durante aproximadamente 1 a 30 min a una temperatura de aproximadamente 15 a 65°C, y posterior inversión del dispositivo de filtro Microcon y centrifugación de aproximadamente 500 a 5.000 x g durante aproximadamente 0,5 a 30 min.
- En una forma de realización preferida determinada, el método de la invención es un método en el cual la purificación del ADN tratado comprende:
- 45 a) adición de 200 μ l de agua a la muestra después de la reacción con bisulfito,
- b) colocación de la mezcla en un dispositivo de filtro Microcon y posterior centrifugación aproximadamente a 14.000 x g durante aproximadamente 20 min,
- 50 c) lavado con aproximadamente 400 μ l de hidróxido sódico aproximadamente 0,2 mol/l, y posterior centrifugación aproximadamente a 14.000 x g durante aproximadamente 10 a 14 min.
- 55 d) aplicación de aproximadamente 400 μ l de hidróxido sódico aproximadamente 0,1 mol/l, y posterior centrifugación aproximadamente a 14.000 x g durante aproximadamente 10 a 14 min,

e) aplicación, en entre 1 y aproximadamente 4 repeticiones, de lo siguiente: aplicación de aproximadamente 400 µl de agua o tampón TE y posterior centrifugación aproximadamente a 14.000 x g durante aproximadamente 12 min; y

5 f) elución mediante la aplicación de aproximadamente 45 a 70 µl de tampón TE precalentado a aproximadamente 50°C, incubación durante aproximadamente 10 min a una temperatura de aproximadamente 50°C, y posterior inversión del dispositivo de filtro Microcon y centrifugación aproximadamente a 1.000 x g durante aproximadamente 7 min.

10 De acuerdo con una forma de realización preferida determinada, la purificación y desulfonación del ADN tratado con bisulfito comprende:

a) adición de 200 µl de agua a la muestra después de la reacción con bisulfito,

15 b) colocación de la mezcla en un dispositivo de filtro Microcon y posterior centrifugación aproximadamente a 14.000 x g durante aproximadamente 20 min,

c) lavado con aproximadamente 400 µl de hidróxido sódico aproximadamente 0,2 mol/l, y posterior centrifugación aproximadamente a 14.000 x g durante aproximadamente 10 a 14 min,

20 d) aplicación de aproximadamente 400 µl de hidróxido sódico aproximadamente 0,1 mol/l, y posterior centrifugación aproximadamente a 14.000 x g durante aproximadamente 10 a 14 min,

25 e) aplicación, en entre 1 y aproximadamente 4 repeticiones, de lo siguiente: aplicación aproximadamente de 400 µl de agua o tampón TE y posterior centrifugación aproximadamente a 14.000 x g durante aproximadamente 12 min; y

f) elución mediante la aplicación de aproximadamente 45 a 70 µl de tampón TE precalentado aproximadamente 50°C, incubación durante aproximadamente 10 min a una temperatura de aproximadamente 50°C, y posterior inversión del dispositivo de filtro Microcon y centrifugación aproximadamente a 1.000 x g durante aproximadamente 7 min.

30 En una forma de realización preferida determinada, el método de la invención es un método en el cual la purificación del ADN tratado comprende además por lo menos uno de los siguientes:

En la etapa b, aplicación de la mezcla en fracciones en el dispositivo de filtro Microcon en la etapa b,

35 Después de la etapa b, aplicación de aproximadamente 400 µl de tampón TE, teniendo este tampón un pH 8 y conteniendo tris-hidroximetil-amino-metano aproximadamente 10 mmol/l y EDTA aproximadamente 0,1 mmol/l, posterior centrifugación aproximadamente a 14.000 x g durante aproximadamente 12 min,

40 En la etapa c, incubación con hidróxido sódico aproximadamente 0,2 mol/l durante aproximadamente 10 min a temperatura ambiente,

En la etapa d, incubación con hidróxido sódico aproximadamente 0,1 mol/l durante aproximadamente 10 min a temperatura ambiente.

45 De acuerdo con una forma de realización preferida, el ADN tratado con bisulfito o el ADN tratado con bisulfito y purificado es sometido a una amplificación genómica completa antes de cualquier otro análisis.

50 En una forma de realización preferida, el método de la invención es un método para la amplificación de por lo menos un ácido nucleico, que comprende:

Preparación de una muestra de ácido nucleico que comprende por lo menos una molécula de ácido nucleico,

55 tratamiento de por lo menos una molécula de ácido nucleico derivada de dicha muestra con un reactivo bisulfito que diferencia entre las bases metiladas de dicha molécula de ácido nucleico y las bases sin metilar de esa misma molécula,

elongación de por lo menos una hebra de por lo menos una molécula de ácido nucleico derivada de dicha muestra en por lo menos un nucleótido o un monómero-PNA, y

5 amplificación de por lo menos una molécula de ácido nucleico alargada. Por tanto, las etapas de tratamiento de por lo menos una molécula de ácido nucleico derivada de dicha muestra y la etapa de elongación de por lo menos una hebra de por lo menos una molécula de ácido nucleico derivada de dicha muestra se pueden llevar a cabo en un orden arbitrario.

10 De acuerdo con una forma de realización preferida, se amplifica por lo menos un ácido nucleico. La amplificación por tanto comprende las siguientes etapas que pueden llevarse a cabo en un orden arbitrario: preparación de por lo menos una molécula de ácido nucleico a partir de una muestra de ácido nucleico. Alargamiento de por lo menos una hebra de por lo menos una molécula de ácido nucleico mediante por lo menos un nucleótido o un monómero-PNA. Tratamiento de por lo menos una molécula de ácido nucleico con un reactivo bisulfito que diferencia entre las bases metiladas y las bases sin metilar que forman parte de dicha molécula de ácido nucleico. Amplificación de por lo
15 menos una molécula de ácido nucleico. Por tanto, preferentemente, las fracciones alargadas o las fracciones tratadas y alargadas de por lo menos una molécula de ácido nucleico son utilizadas para la amplificación de por lo menos una de dichas moléculas de ácido nucleico.

20 En una forma de realización preferida, la elongación se caracteriza porque por lo menos una hebra de por lo menos un ácido nucleico es alargada

25 En uno o más nucleótidos o monómeros PNA,
En uno o más oligonucleótidos u oligómeros de PNA,
En un segundo ácido nucleico derivado de la muestra de ácido nucleico facilitada, o
por combinaciones de los mismos.

30 De acuerdo con una forma de realización preferida, por lo menos la hebra mencionada se alarga uno o más nucleótidos o monómeros PNA, o uno o más oligonucleótidos u oligómeros de PNA, por un segundo ácido nucleico preferentemente derivado de la misma muestra de ácido nucleico preparada como se especifica anteriormente, o por combinaciones de los mismos. Los nucleótidos, oligonucleótidos o el segundo ácido nucleico pueden ser de cualquier tipo de nucleótidos o análogos de nucleótidos adecuados para la elongación conocidos por los expertos en la materia. Preferiblemente, pero no exclusivamente, los nucleótidos son desoxirribonucleótidos, ribonucleótidos, ribonucleótidos cerrados o monómeros de PNA. Preferiblemente, pero no exclusivamente, los oligonucleótidos son oligodesoxirribonucleótidos, oligorribonucleótidos, u oligómeros de PNA, más preferentemente los oligómeros de
35 PNA son oligómeros quiméricos arbitrarios de nucleótidos y monómeros de PNA, en los que por lo menos un nucleótido está localizado en el extremo 5' o 3' del oligómero quimérico. Dicho segundo ácido nucleico puede ser cualquier ácido nucleico, ya sea contenido en la muestra proporcionada o añadido durante el método de la invención. Este segundo ácido nucleico puede ser de secuencia conocida o desconocida, y puede ser endógeno o artificial. Preferiblemente, el segundo ácido nucleico es un ácido nucleico endógeno tratado con bisulfito facilitado con la
40 muestra de ácido nucleico.

En una forma de realización preferida, la elongación es catalizada por un molde independientemente.

45 De acuerdo con una forma de realización preferida, no se usa un molde para la elongación. Esto significa que la elongación se produce al azar o del modo determinado por la o las enzimas utilizadas o las condiciones de reacción (por ejemplo entre otras, por los nucleótidos facilitados).

50 En una forma de realización preferida, la elongación es catalizada mediante por lo menos una enzima seleccionada del grupo siguiente: una transferasa, una transferasa que transfiera grupos fosforilados, una nucleotidiltransferasa, una ADN-nucleotidilxotransferasa, una desoxinucleotidiltransferasa terminal (TdT), una enzima con actividad ribonucleótido transferasa, una polirribonucleótido nucleotidiltransferasa, una ARNt-nucleotidiltransferasa, ARN-uridililtransferasa, una ligasa, una ligasa que forme enlaces de éster fosfórico, una ADN ligasa, una ADN-ligasa dependiente de ATP, una ligasa de ADN monocatenario, una ligasa de ADN monocatenario dependiente de ATP que catalice la circularización intramolecular, ligasa de ADNmc CircLigasa.

55 De acuerdo con una forma de realización preferida, la reacción de elongación es catalizada mediante por lo menos una enzima. Dicha(s) enzima(s) posee(n) por lo menos una actividad seleccionada del grupo siguiente: una actividad

transferasa, una actividad de transferasa que transfiera grupos fosforilados, una actividad nucleotidiltransferasa, una actividad ADN-nucleotidiltransferasa, una actividad desoxinucleotidiltransferasa terminal (TdT), una enzima con actividad ribonucleótido transferasa, una actividad polirribonucleótido nucleotidiltransferasa, una actividad ARNt-nucleotidiltransferasa, actividad ARN-uridililtransferasa, una actividad ligasa, una actividad de ligasa que forme enlaces de éster fosfórico, una actividad ADN-ligasa, una actividad ADN-ligasa dependiente de ATP, una actividad de ligasa de ADN monocatenario, una actividad de ligasa de ADN monocatenario dependiente de ATP que catalice la circularización intramolecular, una actividad ligasa de ADNmc CircLigasa. Las enzimas adecuadas son conocidas por los expertos en la materia. De acuerdo con una forma de realización preferida determinada, la enzima catalizadora es la transferasa terminal TdT (New England Biolabs n.º cat. M0252S/L). Según otra forma de realización preferida determinada, la enzima catalizadora es la ligasa de ADNmc CircLigase™ (Epicentre Biotechnologies n.º cat. CL4111K / CL4115K).

Los reactivos adecuados y los métodos idóneos para la diferenciación se describen anteriormente. Un experto en la materia sabe cómo ajustar la utilización de dichos reactivos o cómo ajustar los referidos métodos para la amplificación del ADN tratado con bisulfito en caso necesario.

En una forma de realización preferida, el ácido nucleico facilitado está por lo menos fraccionado en partes: ADN, ARN o PNA.

De acuerdo con una forma de realización preferida, el ácido nucleico facilitado con la muestra de ácido nucleico es un ácido desoxirribonucleico (ADN), un ácido ribonucleico (ARN), un ácido nucleico-péptido (PNA) o modificaciones de los mismos, como por ejemplo, entre otros, un ácido ribonucleico cerrado (LNA). Por supuesto, el ácido nucleico facilitado también puede ser una combinación de dichos tipos de ácidos nucleicos.

En una forma de realización preferida, la preparación de la muestra de ácido nucleico comprende por lo menos uno de los siguientes procesos: fragmentación, fragmentación al azar, fragmentación por estrés mecánico, fragmentación mediante un reactivo, fragmentación mediante una enzima, fragmentación mediante una nucleasa, fragmentación mediante una endonucleasa de restricción.

De acuerdo con una forma de realización preferida, la preparación de una muestra de ácido nucleico comprende también la fragmentación de los ácidos nucleicos contenidos en la misma. Los métodos adecuados para la fragmentación son conocidos por las personas versadas en la técnica. Preferiblemente, los métodos de fragmentación se caracterizan por uno más de los siguientes procesos:

fragmentación al azar, fragmentación por estrés mecánico, fragmentación mediante un reactivo, fragmentación mediante una enzima, fragmentación mediante una nucleasa, fragmentación mediante una enzima de restricción.

En una forma de realización preferida, la amplificación de por lo menos una molécula de ácido nucleico extendida comprende por lo menos uno de los siguientes: una polimerasa, una polimerasa termoestable, un nucleótido, oligonucleótido, una ligasa, una transcriptasa inversa, una ARN polimerasa, una ARNasa.

De acuerdo con una forma de realización preferida, el ácido nucleico elongado se amplifica mediante una o más enzimas o reactivos seleccionados del grupo siguiente: una polimerasa, una polimerasa termoestable, un nucleótido, un oligonucleótido, una ligasa, una transcriptasa inversa, una ARN polimerasa, una ARNasa.

En una forma de realización preferida, la amplificación de por lo menos una molécula de ácido nucleico elongada comprende la utilización de por lo menos un método seleccionado del grupo siguiente: método de amplificación, método PCR, método LCR o combinaciones de los mismos.

De acuerdo con una forma de realización preferida, el ácido nucleico elongado se amplifica de acuerdo con un método de amplificación, un método PCR, un método PCR RACE, un método LCR o combinaciones de los mismos. Los métodos de amplificación adecuados ya se describen en la presente memoria con la excepción del método de PCR RACE. Un experto en la materia sabe cómo ajustar dichos métodos adecuados para la amplificación del ADN tratado con bisulfito en caso necesario.

En una forma de realización preferida, la metilación de la molécula de ácido nucleico proporcionada es analizada mediante por lo menos un método seleccionado de entre los siguientes: método de amplificación, método PCR,

método LCR, método de amplificación específica de metilación, método MSP (PCR específica de metilación), método MSP anidada, método HeavyMethyl™, método de detección, método de detección específico de metilación, método de secuenciación con bisulfito, detección mediante matrices de ADN, detección mediante micromatrices de oligonucleótido, detección mediante micromatrices de islas CpG, detección mediante enzimas de restricción, método
5 simultáneo de amplificación y detección específicas de metilación, método COBRA, PCR en tiempo real, método de PCR en tiempo real HeavyMethyl™, método MSP MethyLight™, método MethyLight™, método MethyLight™ Algo™, método QM, método Headloop MethyLight™, método HeavyMethyl™ MethyLight™, método HeavyMethyl™ Scorpion™, método MSP Scorpion™, método Headloop Scorpion™, elongación del cebador sensible a metilación, y método Ms-SNuPE (elongación monocleotídica de cebador sensible a metilación) o combinaciones de los mismos.

De acuerdo con una forma de realización preferida, la molécula de ácido nucleico proporcionada es analizada con respecto a su metilación. Preferiblemente con respecto a la metilación de sus citosinas. Los métodos adecuados son, entre otros: método de amplificación, método PCR, método LCR, método de amplificación específica de metilación, método MSP (PCR específica de metilación), método MSP anidada, método HeavyMethyl™, método de
15 detección, método de detección específico de metilación, método de secuenciación con bisulfito, detección mediante matrices de ADN, detección mediante micromatrices de oligonucleótido, detección mediante micromatrices de islas CpG, detección mediante enzimas de restricción, método simultáneo de amplificación y detección específicas de metilación, método COBRA, PCR en tiempo real, método de PCR en tiempo real HeavyMethyl™, método MSP MethyLight™, método MethyLight™, método MethyLight™ Algo™, método QM, método Headloop MethyLight™,
20 método HeavyMethyl™ MethyLight™, método HeavyMethyl™ Scorpion™, método MSP Scorpion™, método Headloop Scorpion™, elongación del cebador sensible a metilación, y método Ms-SNuPE (elongación mononucleotídica de cebador sensible a metilación) o combinaciones de los mismos. Dichos métodos se describen con mayor detalle a continuación.

Una forma de realización particularmente preferida comprende

proporcionar una muestra de ADN que contenga por lo menos una molécula de ADN,

elongación de por lo menos una hebra de por lo menos dicha molécula de ADN en por lo menos un solo
30 nucleótido o monómero de PNA,

tratamiento de por lo menos una hebra de ADN elongada con un reactivo bisulfito que diferencia entre las citosinas metiladas y las citosinas sin metilar que forman parte de dicha molécula de ADN, y

amplificación de por lo menos una molécula de ADN tratada que comprenda por lo menos una hebra
35 extendida.

De acuerdo con una forma de realización preferida determinada, dichas etapas de amplificación del ADN tratado con bisulfito se llevan a cabo por el orden siguiente: i) preparación de una muestra de ADN que contenga por lo menos
40 una molécula de ADN; ii) elongación de por lo menos una hebra de por lo menos una molécula de ADN en por lo menos un solo nucleótido o un monómero de PNA; iii) tratamiento de por lo menos una hebra de ADN elongada con un reactivo bisulfito que diferencia entre las citosinas metiladas y las citosinas sin metilar que forman parte de dicha molécula de ADN; y iv) amplificación de por lo menos una molécula de ADN tratada que contenga por lo menos una hebra extendida. Por supuesto, también se pueden incluir etapas adicionales antes, durante o después de dichas
45 etapas.

En una forma de realización preferida determinada, la elongación de por lo menos una hebra de por lo menos una molécula de ADN proporcionada comprende a la desoxinucleotidiltransferasa terminal y uno o más nucleótidos.

De acuerdo con una forma de realización preferida determinada, por lo menos una hebra de una molécula de ADN proporcionada se elonga mediante una desoxinucleotidiltransferasa terminal, preferentemente mediante la desoxinucleotidiltransferasa terminal TdT (New England Biolabs n.º cat. M0252S/L). Además, la elongación se lleva a cabo en presencia de ribonucleótidos, preferentemente en presencia de adenosintrifosfato sólo; en presencia de
50 timidintrifosfato sólo; en presencia de guanosintrifosfato sólo; en presencia de citidintrifosfato sólo; o en presencia de uraciltrifosfato sólo. Más preferentemente la elongación se lleva a cabo en presencia de desoxinucleótidos, preferentemente en presencia de desoxiadenosintrifosfato sólo; en presencia de sólo desoxitimidintrifosfato; en presencia de sólo desoxiguanosintrifosfato; en presencia de desoxicitidintrifosfato sólo; o en presencia de
55

desoxiuraciltrifosfato sólo. La TdT cataliza la elongación de por lo menos una sola hebra mediante la polimerización de los respectivos nucleótidos en el grupo hidroxilo 3' del nucleósido terminal de la hebra. La TdT añade 300-400 nucleótidos en 30 min si se trata de una cola de dA o de dT, y de aproximadamente 10-100 nucleótidos si se trata de una cola de dG o de dC.

5 En una forma de realización preferida determinada, la amplificación de la molécula de ADN tratada se caracteriza porque un oligonucleótido u oligómero es hibridado por lo menos en partes con la porción elongada de dicha molécula de ADN.

10 De acuerdo con una forma de realización preferida determinada, una molécula de ADN monocatenario tratada con bisulfito y elongada es amplificada mediante por lo menos un oligonucleótido u oligómero de PNA. Por tanto, dicho oligonucleótido u oligómero se hibrida completamente o en partes con la porción extendida de la molécula de ADN monocatenario tratada con bisulfito y elongada. De acuerdo con una forma de realización preferida determinada, el oligonucleótido u oligómero se hibrida completamente con la porción extendida. Por tanto, se consigue una
15 amplificación del genoma completo proporcionado con la muestra de ácido nucleico. Además, esta forma de realización se caracteriza por una amplificación representativa del genoma completo proporcionado en la muestra de ácido nucleico, el cual es amplificado en grandes cantidades. Según otra forma de realización preferida determinada, el oligonucleótido u oligómero se hibrida sólo en partes con la porción extendida. De esa forma, se consigue una amplificación específica de regiones de interés.

20 De acuerdo con una forma de realización preferida, por lo menos un oligonucleótido u oligómero de la amplificación se hibrida completamente con la hebra de ADN tratado. Esta forma de realización preferida ya forma parte de otra forma de realización en la que la etapa de elongación es prescindible. Según esta forma de realización, por lo menos un ácido nucleico es proporcionado en forma de una muestra de ácido nucleico, y dicha muestra de ácido nucleico
25 se trata con un reactivo bisulfito que diferencia entre las bases metiladas y sin metilar que forman parte de dicho ácido nucleico, y el ácido nucleico tratado es amplificado mediante por lo menos un oligonucleótido u oligómero de PNA que se hibrida con dicho ácido nucleico tratado. En una forma de realización preferida, por lo menos uno de dichos oligonucleótido u oligómero de PNA es pobre en guanina y rico en adenina, timina y citosina.

30 Otra forma de realización particularmente preferida comprende

proporcionar una muestra de ADN que contenga por lo menos una molécula de ADN bicatenaria o por lo menos dos moléculas de ADN monocatenarias,

35 tratamiento del ADN facilitado con un reactivo bisulfito que diferencia entre la citosina metilada y la citosina sin metilar dentro del citado ADN, en el cual se facilitan moléculas de ADN monocatenarias,

40 elongación de por lo menos una de dichas moléculas de ADN monocatenario tratadas en por lo menos un oligonucleótido u oligómero de PNA o en por lo menos una molécula de ADN monocatenario tratada adicional, y

amplificación de por lo menos una molécula de ADN monocatenario después del tratamiento y la elongación.

45 De acuerdo con una forma de realización preferida determinada, dichas etapas para la amplificación del ADN tratado con bisulfito se llevan a cabo en el orden siguiente: i) proporcionar una muestra de ADN que comprende por lo menos una molécula de ADN; ii) tratamiento del ADN facilitado con un reactivo bisulfito que diferencia entre la citosina metilada y la citosina sin metilar dentro de dicha molécula de ADN; iii) elongación de por lo menos una hebra del ADN facilitado y tratado en por lo menos un solo nucleótido o monómero de PNA; y iv) amplificación de por lo
50 menos una molécula de ADN tratada que comprenda por lo menos una hebra extendida. Por supuesto, también se pueden incluir etapas adicionales antes, entre o después de dichas etapas.

De acuerdo con una forma de realización preferida determinada, por lo menos una hebra del ADN tratado se extiende por la unión de un oligonucleótido o un oligómero quimérico. El oligómero quimérico se caracteriza porque
55 comprende nucleótidos y monómeros de PNA, en el que por lo menos un nucleótido se localiza en el extremo 5' o 3' del oligómero quimérico.

De acuerdo con una forma de realización preferida determinada, por lo menos una hebra del ADN tratado se extiende por la unión de una segunda hebra de ADN. Esta segunda hebra de ADN puede derivar también de la muestra facilitada o puede ser añadida durante el método de la invención. Esta segunda hebra de ADN puede tener una secuencia conocida o desconocida. Puede ser además endógena (secuencia de un genoma, por ejemplo entre otros, del genoma humano) o puede ser artificial. Preferiblemente, dicha segunda hebra de ADN es una monohebra de ADN tratado con bisulfito derivada de la primera monohebra de ADN tratada con bisulfito procedente de la muestra de ácido nucleico facilitada.

En una forma de realización preferida, la elongación de por lo menos una molécula de ADN monocatenaria tratada comprende una ligasa de ADN monocatenario.

De acuerdo con una forma de realización preferida, la reacción de elongación se lleva a cabo mediante la utilización de una ligasa de ADN monocatenario. Esto se prefiere en particular cuando la reacción de elongación consista en una reacción de unión del extremo de una monohebra tratada con bisulfito con otro extremo. Preferiblemente, la ligasa de ADN monocatenario es la ligasa de ADNmc CircLigase™ (Epicentre Biotechnologies). Pero, por supuesto, se podrían usar otras ligasas de acuerdo con la invención siempre que sean capaces de ligar ADN tratado con bisulfito.

En una forma de realización preferida, la amplificación de dicha molécula de ADN se caracteriza porque por lo menos un oligonucleótido u oligómero es por lo menos hibridado con algunas partes de la porción elongada de la molécula de ADN monocatenaria tratada.

De acuerdo con una forma de realización preferida determinada, una molécula de ADN monocatenaria tratada con bisulfito y elongada se amplifica mediante por lo menos un oligonucleótido o un oligómero de PNA. Por tanto, dicho oligonucleótido u oligómero se hibrida completamente o en parte con la porción extendida de la molécula de ADN monocatenario tratada con bisulfito y extendida. De acuerdo con una forma de realización preferida determinada, el oligonucleótido u oligómero se hibrida completamente con la porción extendida. Por tanto, se consigue una amplificación completa del genoma proporcionado con la muestra de ácido nucleico. Según otra forma de realización preferida determinada, el oligonucleótido u oligómero solo hibrida con algunas partes de la porción extendida. Por tanto, se consigue una amplificación específica de regiones de interés. La especificidad se determina después mediante la secuencia de los oligonucleótidos u oligómeros utilizados y las condiciones de amplificación.

De acuerdo con una forma de realización preferida, por lo menos un oligonucleótido u oligómero para la amplificación se hibrida completamente con la monohebra de ADN tratada con bisulfito. Esto es preferido particularmente para una forma de realización en que el extremo 5' de la monohebra de ADN tratada con bisulfito se une a su extremo 3' dando como resultado una circularización intramolecular. La hibridación del oligonucleótido u oligómero puede por tanto producirse en cualquier lugar de de la monohebra de ADN tratada con bisulfito y circularizada.

En una forma de realización preferida, la molécula de ADN monocatenario tratada se une intramolecularmente durante la etapa de elongación, y la amplificación se caracteriza porque por lo menos un oligonucleótido u oligómero se hibrida en un punto arbitrario de la molécula de ADN monocatenario tratada y circularizada. Esta forma de realización se caracteriza porque se produce una amplificación genómica completa representativa del genoma facilitado en la muestra de ácido nucleico que da lugar a un gran número de copias.

Se puede obtener un estudio sobre la amplificación genómica completa en Hawkins et al.: Whole genome amplification - applications and advances. *Curr Opin Biotechnol.* 2002 Feb; 13(1):65-7. Según tales métodos, los fragmentos son amplificados mediante una ADN-polimerasa y cebadores. Los cebadores pueden ser cebadores específicos de conector (*linker*), cebadores aleatorios o cebadores degenerados. Hasta ahora se han descrito diferentes métodos de amplificación genómica completa (WGA). En la denominada preamplificación con elongación por cebador (PEP), la amplificación se lleva a cabo mediante una mezcla aleatoria de cebadores oligonucleótidos de una longitud de aproximadamente 15 nucleótidos (Zhang et al.: Whole genome amplification from a single cell: implications for genetic analysis. *Proc Natl Acad Sci USA* 89:5847-51, 1992. En la DOP-PCR (reacción en cadena de la polimerasa cebada con un oligonucleótido degenerado), sin embargo, sólo se utilizó un cebador degenerado (véase: Telenius et al.: Degenerate oligonucleotide-primed PCR: general amplification of target ADN by a single degenerate primer; *Genomics* 13: 718-25, 1992. Otro método de WGA es la llamada PCR-conector/adaptador. En él, los conectores están ligados a fragmentos, y en la amplificación subsiguiente se utilizan cebadores que se unen

específicamente a los conectores (estudio en: Cheung y Nelson: Whole genome amplification using a degenerate oligonucleotide primer allows hundreds of genotypes to be performed on less than one nanogram of genomic ADN. *Proc Natl Acad Sci USA*. 93:14676-9, 1996. Sin embargo, dichos métodos de WGA basados en la PCR adolecen de varias desventajas. Por ejemplo, se pueden generar artefactos de amplificación inespecífica. Además, a menudo se produce una cobertura incompleta de todas las regiones del genoma. Es más, en parte sólo se generan fragmentos cortos de ADN con longitudes inferiores a 1 kB, (véase Dean et al.: Comprehensive human genome amplification using multiple displacement amplification. *Proc Natl Acad Sci USA*. 99:5261-6, 2002). El método más potente para una amplificación genómica completa es por tanto en estos momentos la "Amplificación por desplazamiento múltiple" isotérmica (MDA, véase: Dean et al. 2002 como anteriormente; patente US nº 6.124.120). El ADN se hace reaccionar con cebadores aleatorios y una ADN-polimerasa. Las polimerasas que se utilizan son capaces de desplazar la hembra no codificante de la doble cadena de ADN durante la amplificación (por ejemplo una polimerasa $\phi 29$). Las hebras desplazadas a su vez sirven como matriz para la elongación de nuevos cebadores. Por medio de este método es posible una amplificación superior a 5.000. La longitud media del producto es superior a 10 kB, y la amplificación se distribuye con bastante uniformidad a lo largo del conjunto completo de fragmentos. Los kits comerciales para MDA están disponibles en estos momentos a través de dos proveedores ("GenomiPhi" de Amersham Biosciences, www4.amershambiosciences.com; "Repli-g" de Molecular Staging, www.molecularstaging.com).

De acuerdo con una forma de realización preferida determinada, la amplificación genómica completa se logra mediante una PCR con conector/adaptador. De acuerdo con otra forma de realización preferida determinada, la amplificación genómica completa se consigue mediante una amplificación por desplazamiento múltiple.

Las formas de realización especificadas en la presente memoria tienen la ventaja de que se permite una amplificación genómica completa del ADN tras el tratamiento con bisulfito. El problema subyacente es que un tratamiento con bisulfito, aunque sea leve, tiene un efecto negativo sobre la integridad del ADN tratado. En otras palabras, la molécula de ADN tratada con bisulfito se fragmenta. Estos fragmentos más pequeños resultan difíciles de amplificar debido a su pequeño tamaño y a la propiedad de los cebadores aleatorios (oligonucleótidos u oligómeros) utilizados normalmente en la amplificación genómica completa para unir el ADN genómico sólo a grandes distancias. Dos formas de realización preferidas particulares consiguen una mejor amplificación genómica completa, que se caracteriza por ser más representativa y generar mayores cantidades de ADN amplificado. Según la primera de estas formas de realización preferidas, se añaden nucleótidos a una o ambas hebras de la molécula de ADN bicatenaria antes del tratamiento con bisulfito, preferentemente mediante una desoxinucleotidiltransferasa terminal (TdT). Después del tratamiento con bisulfito, el ADN se amplifica mediante cebadores que son específicos de los nucleótidos añadidos. Por ejemplo, si se añade una cola de poli-dA, se usarán cebadores de poli-dT. Según la segunda forma de realización particular, una molécula de ADN monocatenaria tratada con bisulfito es proporcionada para el tratamiento con bisulfito de una molécula de ADN bicatenaria. A continuación, esta monohebra de ADN es: a) ligada intermolecularmente a otra (por lo menos una) de la misma manera que las monohebras de ADN tratadas con bisulfito, lo que da como resultado una monohebra de ADN elongada; b) es ligada intramolecularmente por unión de su extremo 5' con su extremo 3', dando lugar a una molécula de ADN monocatenaria circularizada; o c) combinaciones de a) y b) en las que una monohebra elongada de ADN es circularizada. Después del ligamiento la monohebra de ADN es amplificada mediante cebadores aleatorios. Gracias a la elongación de las moléculas monocatenarias de ADN la polimerasa puede seguir alargando y amplificar el ADN tratado con bisulfito. En otras palabras, la polimerasa tiene una mayor procesividad que el ADN sin elongar tratado con bisulfito. Además, la unión de cadenas intermoleculares también tiene la ventaja de que los fragmentos son amplificados con eficacia sin que se hibriden, o sean pocos, los cebadores aleatorios hibridados.

De acuerdo con una forma de realización, por lo menos una de las formas de realización mencionadas anteriormente se utiliza para determinar el estado de metilación de por lo menos una posición CpG en el ADN de la muestra remota, un patrón de metilación dentro del ADN de la muestra remota, o ambos, comprendiendo además por lo menos uno de los siguientes:

determinación del estado de metilación de por lo menos una posición CpG en el ADN de la muestra remota, estando cada posición CpG localizada en una posición definida,

determinación de un patrón en metilación dentro del ADN de la muestra remota.

En una forma de realización, el método de la invención es un método para la determinación del estado de metilación, del patrón de metilación, o de ambos, en el que la determinación del estado de metilación, el patrón de metilación o ambos comprenden la utilización de por lo menos un método de los siguientes: método de amplificación, método PCR, método LCR, método de amplificación específica de metilación, método MSP (PCR específica de metilación), método MSP anidada, método HeavyMethyl™, método de detección, gel de agarosa, tinción de un gel de agarosa, método de detección específico de metilación, método de secuenciación con bisulfito, detección mediante matrices de ADN, detección mediante micromatrices de oligonucleótidos, detección mediante micromatrices de islas CpG, detección mediante enzimas de restricción, método simultáneo de amplificación y detección específicas de metilación, método COBRA, PCR en tiempo real, método de PCR en tiempo real HeavyMethyl™, método MSP MethyLight™, método MethyLight™, método MethyLight™ Algo™, método QM, método Headloop MethyLight™, método HeavyMethyl™ MethyLight™, método HeavyMethyl™ Scorpion™, método MSP Scorpion™, método Headloop Scorpion™, elongación con cebador sensible a la metilación, y método Ms-SNuPE (elongación mononucleotídica con cebador sensible a la metilación).

De acuerdo con una forma de realización, la determinación del estado de metilación de por lo menos una posición CpG, la determinación por lo menos un patrón de metilación, o ambos comprende la utilización de por lo menos uno de los siguientes métodos o combinaciones de los mismos: método de amplificación, método PCR, método LCR, método de amplificación específico de metilación, método MSP (PCR específica de metilación), método MSP anidada, método HeavyMethyl™, método de detección, gel de agarosa, tinción del gel de agarosa, método de detección específico de medicación, método de secuenciación con bisulfito, detección mediante matrices de ADN, detección mediante micromatrices de oligonucleótidos, detección mediante micromatrices de islas CpG, detección mediante enzimas de restricción, método simultáneo de amplificación y detección específicas de metilación, método COBRA, PCR en tiempo real, método de PCR en tiempo real HeavyMethyl™, método MSP MethyLight™, método MethyLight™, método MethyLight™ Algo™, método QM, método Headloop MethyLight™, método HeavyMethyl™ MethyLight™, método HeavyMethyl™ Scorpion™, método MSP Scorpion™, método Headloop Scorpion™, elongación con cebador sensible a la metilación, y método Ms-SNuPE (elongación mononucleotídica con cebador sensible a la metilación).

Un experto en la materia conoce los métodos de amplificación adecuados. De acuerdo con una forma de realización preferida, el método de amplificación es un método de PCR. Un experto en la materia conoce los métodos de PCR adecuados que pueden ser utilizados según la invención. Los métodos de amplificación adecuados para la utilización según la invención son bien conocidos en la técnica.

De acuerdo con una forma de realización preferida, el método de amplificación es un método de reacción en cadena con ligasa (LCR). En general, se trata de métodos de amplificación que están basados en la utilización de una ligasa. Un experto en la materia conoce la LCR adecuada que puede ser utilizada según la invención.

De acuerdo con una forma de realización, el método de amplificación es una amplificación específica de metilación. Los métodos adecuados de amplificación específica de metilación son conocidos por los expertos en la materia. De acuerdo con una forma de realización preferida, el método de amplificación específica de metilación es la PCR específica de metilación (MSP). El método MSP permite la evaluación del estado de metilación de virtualmente cualquier grupo de lugares CpG dentro de una isla CpG, independientemente de la utilización de enzimas de restricción sensibles a la metilación (Herman et al. Proc. Natl. Acad. Sci. USA 93:9821-9826, 1996; patente US nº 5.786.146). En resumen, el ADN es modificado por el bisulfito sódico que convierte en uracilo todas las citosinas sin metilar (pero no las citosinas metiladas), y después es amplificado con cebadores específicos para el ADN metilado respecto al ADN sin metilar. Los pares de cebadores MSP contienen por lo menos un cebador que se hibrida con un dinucleótido CpG tratado con bisulfito. Por tanto, la secuencia de dichos cebadores comprende por lo menos un dinucleótido CpG. Los cebadores MSP específicos del ADN sin metilar contienen una "T" en la posición 3' de la posición C en el CpG. Preferiblemente, por tanto, es necesario que la secuencia de bases de dichos cebadores contenga una secuencia con una longitud mínima de 9 nucleótidos que se hibrida con la secuencia del ácido nucleico convertido con bisulfito, en la que la secuencia de bases de dichos oligómeros contiene por lo menos un dinucleótido CpG. La MSP sólo requiere pequeñas cantidades de ADN y es sensible a alelos metilados un 0,1% de un locus de isla CpG dado. Los tratamientos con bisulfito y el método de amplificación descritos en la presente memoria se pueden utilizar en combinación con este método de detección.

De acuerdo con una forma de realización preferida, la amplificación es un método de MSP anidada. El método de MSP anidada se lleva a cabo esencialmente del modo descrito en los documentos WO 02/18649 y US

20040038245. Este método de MSP tiene en cuenta la aparente contradicción de precisar un cebador MSP con una alta especificidad para discriminar suficientemente entre las posiciones CG y TG y de permitir cierto desapareamiento a fin de crear un sitio de restricción único.

5 Éste comprende la expansión del número de copias de la región genética de interés. Por tanto, se utiliza una reacción en cadena de la polimerasa para amplificar una porción de dicha región que contiene la metilación de interés. De esta forma se genera un producto de amplificación. A continuación se somete una alícuota de dicho producto a una segunda reacción en cadena de la polimerasa específica de metilación para detectar la presencia de metilación. En otras palabras, antes de la PCR específica de metilación se lleva a cabo una PCR no específica de metilación.

De acuerdo con una forma de realización preferida, el método de amplificación es el método HeavyMethyl™. El método HeavyMethyl™ se lleva a cabo básicamente del modo descrito en el documento WO 02/072880 y en Cottrell SE et al. Nucleic Acids Res. 2004 Jan 13,-32(1): e10. Este método comprende la utilización de oligonucleótidos sonda de bloqueo que pueden ser hibridados con el ácido nucleico molde tratado con bisulfito al mismo tiempo que con los cebadores de PCR. Preferiblemente, los oligonucleótidos de bloqueo se caracterizan porque su secuencia de bases contiene una secuencia de una longitud mínima de 9 nucleótidos que se hibrida con la secuencia de ácido nucleico tratada químicamente. Por tanto, la secuencia de bases de dichos oligonucleótidos de bloqueo contiene por lo menos un dinucleótido CpG, TpG o CpA. La amplificación del ácido nucleico molde se suprime si la secuencia complementaria de la sonda de bloqueo está presente en el molde. En este caso, la amplificación termina en la posición 5' de la sonda de bloqueo. La sonda de bloqueo puede ser diseñada para hibridarse con el ácido nucleico tratado con bisulfito de un modo específico con el estado de metilación. Por ejemplo, los ácidos nucleicos metilados dentro de una población de ácidos nucleicos sin metilar pueden ser detectados mediante la supresión de la amplificación de los ácidos nucleicos que no están metilados en una posición concreta. Por tanto, una sonda de bloqueo contendría un 'CpA' o un 'TpA' en la posición en cuestión, y no un 'CpG' si se desea suprimir la amplificación de los ácidos nucleicos metilados. El uso de oligonucleótidos de bloqueo precisa para conseguir una anulación eficaz de la amplificación mediada por la polimerasa que dichos oligonucleótidos de bloqueo no puedan ser alargados por ésta. Según el método HeavyMethyl™, esto se consigue mediante la utilización de bloqueadores que son 3'-desoxioligonucleótidos, u oligonucleótidos que en su posición 3' contienen otro grupo que no sea un grupo hidroxilo "libre". Por ejemplo, entre otros, los oligonucleótidos 3'-O-acetilo son un ejemplo representativo de la clase preferida de moléculas bloqueadoras.

Además, debe evitarse la degradación mediada por la polimerasa de los oligonucleótidos de bloqueo. Preferiblemente, esta neutralización comprende: i) la utilización de una polimerasa carente de actividad exonucleasa 5'-3', o ii) la utilización de oligonucleótidos de bloqueo modificados. Estos oligonucleótidos de bloqueo modificados se caracterizan por tener, por ejemplo, puentes tioato en los extremos 5'. Esto convierte a la molécula bloqueadora en resistente a las nucleasas. Ciertas aplicaciones pueden no requerir tales modificaciones en 5' del oligonucleótido de bloqueo. Por ejemplo, la degradación del oligonucleótido de bloqueo se puede evitar sustancialmente si los sitios de unión del bloqueador y el cebador se solapan. Así se impide la unión del cebador (por ejemplo, en caso de exceso de oligonucleótido de bloqueo). En esas condiciones, la polimerasa no puede unirse al cebador y alargarlo, y como la polimerasa no está alargando el cebador, el oligonucleótido de bloqueo no será degradado. Una forma de realización particularmente preferida del método HeavyMethyl™ en el contexto de la presente invención e implementada como se indica en la presente memoria, comprende la utilización de oligómeros de péptido-ácido nucleico (PNA) como oligonucleótidos de bloqueo. Tales oligómeros PNA de bloqueo son especialmente adecuados porque no son degradados ni elongados por la polimerasa.

De acuerdo con una forma de realización, el método de detección puede ser de cualquier tipo. Un experto en la materia conoce los métodos de detección adecuados. Preferiblemente, un método de detección puede ser cualquier tipo de método de detección que comprenda la utilización de un colorante fluorescente, un colorante no fluorescente, un marcador de peso molecular, una separación por tamaño o una separación por peso. Por ejemplo, entre otros, el método de detección puede ser una separación por tamaño en gel de agarosa seguida de la tinción del ADN con un colorante fluorescente. De acuerdo con una forma de realización preferida, el método de detección es una detección específica de metilación. Un experto en la materia conoce los métodos de detección específicos de metilación adecuados. De acuerdo con una forma de realización preferida, el método de detección específico de metilación es un método de secuenciación con bisulfito. El método de secuenciación con bisulfito se lleva a cabo básicamente del modo descrito en Frommer et al. Proc. Natl. Acad. Sci. USA 89:18271831, 1992. El método de secuenciación con bisulfito es un método en el cual se lleva a cabo la secuenciación de un fragmento previamente amplificado del ADN

genómico tratado con bisulfito. Como el ADN tratado con bisulfito se amplifica antes de la secuenciación, un método de amplificación como el descrito en la presente memoria se puede utilizar en combinación con este método de detección. Además se prefiere especialmente que los resultados de la secuenciación con bisulfito sean analizados básicamente del modo descrito en EP 02090203.7. En resumen, según este método el grado de metilación de una citosina se determina mediante un electroforetograma de una o varias bases. En este se calcula el área bajo el electroforetograma de una base detectada, y el grado de metilación se deduce a continuación comparando el valor de la posición de citosina analizada con el valor obtenido de una citosina sin metilar. Para obtener mejores resultados conviene determinar y considerar la tasa de conversión de citosina en uracilo derivada del tratamiento con bisulfito y/o estandarizar las señales del electroforetograma.

De acuerdo con una forma de realización preferida, el método de detección es un método de detección mediante una matriz de ADN. Un experto en la materia conoce diversas matrices de ADN adecuadas. Preferiblemente, la matriz de ADN contiene moléculas de ADN que se unen o están asociadas de forma similar a una fase sólida. La matriz se puede caracterizar, por ejemplo pero no exclusivamente, porque las moléculas de ADN están dispuestas sobre la fase sólida en forma de una rejilla rectangular o hexagonal. La fase sólida es una fase seleccionada de entre las siguientes: silicio, vidrio, poliestireno, aluminio, acero, hierro, cobre, níquel, plata, oro, nitrocelulosa, o plásticos tales como, entre otros, el nailon. También puede pensarse en combinaciones de dichos materiales. Para la detección, el ADN hibridado sobre la matriz está marcado, preferentemente con un colorante fluorescente. Este marcaje es por ejemplo, entre otros, la simple unión de colorantes Cy3 y Cy5 al extremo 5'-OH del fragmento de ADN. La detección de la fluorescencia desprendida por el ADN hibridado se puede llevar a cabo, por ejemplo, entre otros métodos, con un microscopio confocal.

De acuerdo con una forma de realización preferida determinada, el método de detección es un método de detección mediante una micromatriz de oligonucleótido. Se puede disponer de una perspectiva general de la técnica previa para la fabricación de matrices oligoméricas en una edición especial de Nature Genetics (Nature Genetics Supplement, Volumen 21, enero 1999), y de la bibliografía citada en la misma.

De acuerdo con una forma de realización preferida determinada, el método de detección es un método de detección mediante una micromatriz de isla CpG. En él, el ADN inmovilizado o asociado de la matriz contiene secuencias derivadas de islas CpG.

De acuerdo con una forma de realización preferida determinada, el método de detección es un método de detección mediante una matriz de ADN del modo descrito básicamente en los documentos WO 99/28498, WO 01/38565, o WO 02/18632.

De acuerdo con una forma de realización preferida, el método de detección es un método de detección mediante enzimas de restricción. Un experto en la materia conoce los métodos adecuados.

De acuerdo con una forma de realización preferida, la amplificación y la detección específicas de la metilación se llevan a cabo de manera simultánea. Los métodos adecuados son conocidos por los expertos en la materia. De acuerdo con una forma de realización preferida determinada, el método para la amplificación y la detección específicas de metilación de manera simultánea es el método COBRA. El método COBRA es un método cuantitativo de metilación útil para determinar los niveles de metilación del ADN en loci específicos en pequeñas cantidades de ADN genómico (Xiong & Laird, Nucleic Acids Res. 25:2532-2534, 1997). Según el método COBRA, la digestión con enzimas de restricción se utiliza para revelar diferencias en la secuencia dependientes de la metilación en los productos de la PCR del ADN tratado con bisulfito. Las diferencias en la secuencia dependientes de la metilación son producidas primero en el ADN genómico por el tratamiento con bisulfito. La amplificación por PCR del ADN convertido con bisulfito se lleva a cabo utilizando cebadores inespecíficos de la metilación seguida por la digestión con endonucleasas de restricción, electroforesis en gel, y detección mediante sondas de hibridación marcadas específicas. Los niveles de metilación en la muestra de ADN original son representados por las cantidades relativas de producto de PCR digerido y sin digerir de un modo linealmente cuantitativo a lo largo de un amplio espectro de niveles de metilación del ADN. Además, la digestión con enzimas de restricción de los productos de PCR amplificados a partir del ADN convertido con bisulfito también se usó en el método descrito por Sadri & Hornsby (Nucl. Acids Res. 24:5058-5059, 1996). Los tratamientos con bisulfito y los métodos de amplificación descritos en la presente memoria se pueden utilizar en combinación con este método de detección.

De acuerdo con una forma de realización preferida determinada, el método de amplificación y detección específicas de metilación simultáneas es un método de PCR en tiempo real. Un experto en la materia conoce los métodos de PCR en tiempo real adecuados. De acuerdo con una forma de realización preferida determinada, el método de PCR en tiempo real es un método HeavyMethyl™. El método HeavyMethyl™ se lleva a cabo de la forma descrita anteriormente mediante un aparato de PCR en tiempo real.

De acuerdo con una forma de realización preferida determinada, el método de PCR en tiempo real es un método MethyLight™. El método MethyLight™ es un método cuantitativo de metilación de alto rendimiento que utiliza una tecnología de PCR en tiempo real con fluorescencia (TaqMan™) que no requiere manipulaciones después de la etapa de PCR (Eads et al., Cancer Res. 59:2302-2306, 1999). En resumen, el proceso MethyLight™ comienza con una muestra mezclada de ADN genómico que se convierte, a través de una reacción con bisulfito, en un conjunto mixto de diferencias en la secuencia dependientes de la metilación según procedimientos estándares. A continuación, se lleva a cabo la PCR con fluorescencia con una reacción "sin sesgo" (con cebadores que no se solapan con los lugares de metilación CpG conocidos), o de forma "sesgada" (con cebadores de PCR que se solapan con dinucleótidos CpG conocidos). La discriminación de las secuencias se puede producir durante el proceso de amplificación o durante el proceso de detección por fluorescencia, o ambos.

El método MethyLight™ se puede utilizar como prueba cuantitativa para detectar patrones de metilación en la muestra de ADN genómico, en la que la discriminación de la secuencia se produce en el momento de la hibridación de la sonda. En esta versión cuantitativa, la reacción de PCR proporciona una amplificación sin sesgo en presencia de una sonda fluorescente que se solapa con un posible sitio de metilación concreto. Está previsto un control sin sesgo para determinar la cantidad de ADN entrante mediante una reacción en que ni los cebadores ni la sonda se solapan con ningún dinucleótido CpG. Otra alternativa consiste en una prueba cualitativa de la metilación genómica exponiendo el agrupamiento de PCR sesgado a oligonucleótidos control que no "cubren" sitios de metilación conocidos (una versión con fluorescencia de la técnica "MSP", también llamada método de MSP MethyLight™), o con oligonucleótidos que cubren potenciales sitios de metilación.

El proceso MethyLight™ se puede utilizar con una sonda "TaqMan®" en el proceso de amplificación. Por ejemplo, el ADN genómico bicatenario es tratado con bisulfito y sometido a uno de los dos conjuntos de reacciones PCR que utilizan sondas TaqMan®; por ejemplo, con cebadores sesgados y sonda TaqMan®, o cebadores no sesgados y sonda TaqMan®. La sonda TaqMan® está doblemente marcada con moléculas marcadoras fluorescentes indicadoras (reporter) y extintoras (quencher), y está diseñada para resultar específica para una región con un contenido relativamente alto de GC de modo que también se separa a una temperatura unos 10°C mayor en el ciclo de PCR que los cebadores directos o inversos. Esto permite que la sonda TaqMan® permanezca completamente dividida durante la etapa de reasociación/elongación de la PCR. Dado que la polimerasa Taq sintetiza enzimáticamente una nueva hebra durante la PCR, alcanza a la sonda TaqMan® reasociada. La polimerasa Taq con actividad endonucleásica 5' a 3' desplazará entonces la sonda TaqMan® digiriéndola y liberando así la molécula fluorescente indicadora que permitirá la detección cuantitativa de su señal, ahora desinhibida, mediante un sistema de detección de fluorescencia en tiempo real.

También son adecuadas las variantes de la tecnología de detección TaqMan® que incluyen la utilización de tecnología de sonda doble (LightCycler™), cebadores de amplificación fluorescentes (tecnología Sunrise™), sondas molecular beacon (Tyagi S., and Kramer F.R., Nature Biotechnology 14, 303-308, 1996), cebadores Sorption (Whitcombe et al., Nature and Biotechnology, 17, 804-807, 1999), o sondas oligonucleotídicas con doble colorante de LNA (ácido nucleico cerrado) (Exiqon A/S). Todas estas técnicas se pueden adaptar adecuadamente para la utilización con ADN tratado con bisulfito, y además para ser sometidas al análisis de metilación con dinucleótidos CpG.

Los tratamientos con bisulfito y los métodos de amplificación descritos en la presente memoria se pueden utilizar en combinación con el método MethyLight™ o sus variantes.

De acuerdo con una forma de realización preferida determinada, el método de PCR en tiempo real es el método MethyLight™ ALGO™. El método MethyLight™ ALGO™ es una versión mejorada del método MethyLight™ que es descrita básicamente en el documento EP 04090255.3. Según este método mejorado, el grado de metilación se calcula a partir de las intensidades de la señal de las sondas mediante distintos algoritmos.

De acuerdo con una forma de realización preferida determinada, el método de PCR en tiempo real es el ensayo QM (metilación cuantitativa). Este ensayo es inespecífico de la metilación y por tanto una amplificación por PCR en tiempo real sin sesgo. Se acompaña por la utilización de dos sondas específicas de la metilación (MethyLight™), una para el amplificado metilado y la segunda para el amplificado sin metilar. De esta forma se generan dos señales que pueden ser utilizadas para: a) determinar la razón de ácidos nucleicos metilados (CG) respecto a sin metilar (TG), y al mismo tiempo b) determinar la cantidad absoluta de ácidos nucleicos metilados. En este último, es necesaria una calibración del ensayo con una cantidad conocida de ADN control.

Según la forma de realización preferida, el método para la amplificación y la detección específicas de la metilación simultáneas es un método de PCR Headloop. El método de PCR Headloop es un método de PCR de supresión. Básicamente se realiza del modo descrito en Rand K.N., et al., Nucleic Acid Research, 33(14), e127. Es un método de PCR para distinguir secuencias relacionadas en las que la selectividad de la amplificación depende de la secuencia del amplicón. En uno (o ambos) cebador(es) se incluye una elongación 5' que corresponde a secuencias dentro de uno de los amplicones relacionados. Después del copiado y de la incorporación en el amplificado, esta secuencia es capaz de replegarse hacia atrás, reasociarse a las secuencias internas y actuar de cebador formando una estructura de horquilla. Esta estructura impide cualquier nueva amplificación. De ese modo, la amplificación de las secuencias perfectamente complementarias con la extensión 5' es suprimida, mientras que la amplificación de las secuencias con desapareamientos o que carecen de la secuencia no resulta afectada.

De acuerdo con una forma de realización preferida determinada, el método para la amplificación y la detección inespecíficas de la metilación simultáneas es una combinación del método de PCR Headloop y del método MethyLight™, también llamada método Headloop MethyLight™.

De acuerdo con una forma de realización preferida, el método para la amplificación y la detección inespecíficas de la metilación simultáneas es un método Scorpion™. Este método fue descrito por primera vez por Whitcombe et al.: Detection of PCR products using self-probing amplicons and fluorescence. Nat Biotechnol. 1999; 17 (8):804-7; Thelwell et al.: Mode of action and application of Scorpion™ primers to mutation detection. Nucleic Acids Res. 2000 Oct 1;28(19):3752-61; patente US nº 6.326.145; patente US nº 6.365.729; document US 20030087240 A1. Los expertos en la materia conocen varias formas de realización de este método. Todos estos métodos comparten la utilización de sondas intramoleculares. Según la variante llamada Hairloop, los cebadores Scorpion™ poseen una secuencia sonda específica en su extremo 5'. Esta secuencia aparece con una configuración de horquilla. Un colorante fluorescente y un extintor están situados próximos al final de la secuencia sonda. Tras la desnaturalización siguiente a un ciclo de amplificación, la sonda se hibrida intramolecularmente con la secuencia del cebador elongada de la misma hebra. Así pues, la horquilla permanece abierta, el colorante y el extintor permanecen separados y de ese modo se puede detectar la señal del primero.

Otras variantes del método Scorpion™ son por ejemplo la variante Duplex (Solinas et al.: Duplex Scorpion™ primers in SNP analysis and FRET applications. Nucleic Acids Res. 2001 Oct 15;29(20):E96), o las variantes descritas en la patente US nº 6.326.145 y el documento US 20030087240.

De acuerdo con una forma de realización preferida determinada, el método Scorpion™ es un método como el descrito básicamente en el documento WO 05/024056.

De acuerdo con una forma de realización preferida determinada, el método para la amplificación y la detección específicas de la metilación simultáneas es una combinación del método HeavyMethyl™ y el método Scorpion™, también llamado método HeavyMethyl™ Scorpion™.

De acuerdo con una forma de realización preferida determinada, el método para la amplificación y la detección específicas de la metilación simultáneas es una combinación del método HeavyMethyl™ y el método MethyLight™, también llamado método HeavyMethyl™ MethyLight™.

De acuerdo con una forma de realización preferida determinada, el método para la amplificación y la detección específicas de la metilación simultáneas es una combinación del método MSP y el método Scorpion™, también llamado método MSP Scorpion™.

De acuerdo con una forma de realización preferida determinada, el método para la amplificación y la detección específicas de la metilación simultáneas es una combinación del método Headloop y el método Scorpion™, también llamado método Headloop Scorpion™.

- 5 De acuerdo con una forma de realización preferida, el método para la amplificación y la detección específicas de la metilación simultáneas es un método de elongación con cebador específico de la metilación. Un experto en la materia conoce varios métodos que pueden ser utilizados según la invención.

- 10 De acuerdo con una forma de realización preferida determinada, el método de elongación con cebador específico de la metilación es el método Ms-SNuPE (elongación monocleotídica de cebador sensible a la metilación). El método Ms-SNuPE es un método que se lleva a cabo básicamente como se describe en Gonzalzo et al., Nucleic Acids Research 25(12), 2529-2531, 1997 y patente US nº 6.251.594.

- 15 Según el método Ms-SNuPE, las regiones de interés son amplificadas por una PCR del ADN tratado con bisulfito. Tras la purificación de los productos de la PCR, los cebadores se hibridan próximalmente frente a la posición que ha de ser analizada. Después, el cebador se alarga mediante un solo nucleótido que bien está marcado con dCTP o bien con dTTP marcado distintamente. Si la citosina del ADN original estaba metilada, entonces se incorporará el dCTP, porque las citosinas metiladas permanecen inalteradas durante el tratamiento con bisulfito. De no ser así, es decir, si la citosina del ADN original se encontraba sin metilar, entonces se incorporará el dTTP, porque la citosina sin metilar se transforma en un uracilo debido al tratamiento con bisulfito y la PCR habrá sustituido dicho uracilo por timina. Mediante la detección de las distintas marcas es posible distinguir si una citosina de una posición CpG estaba metilada o sin metilar. El método MS-SNuPE también se puede realizar de forma cuantitativa.
- 20

- 25 De acuerdo con una forma de realización preferida determinada, el método de elongación con cebador específico de la metilación es un método como el básicamente descrito en los documentos WO 01/062960, WO 01/062064, o WO 01/62961. Todos estos métodos pueden ser realizados de forma cuantitativa. Según el documento WO 01/062960, el cebador que debe alargarse hibrida con su extremo 3' completamente o sólo parcialmente en las posiciones de interés. La elongación de por lo menos un nucleótido sólo se produce si el cebador se hibrida por completo. El documento WO 01/062064 muestra un método en que el cebador que se debe elongar se hibrida proximalmente
- 30 junto a o a una distancia de hasta diez bases de la posición que se debe analizar. Después, el cebador se alarga por lo menos en un nucleótido. El tercer método se describe en el documento WO 01/62961. Según este método, dos conjuntos de oligonucleótidos se hibridan con el ADN amplificado después del tratamiento con bisulfito. El primer tipo de oligonucleótido hibrida en 5' proximalmente junto a o a una distancia de hasta 10 bases de la posición que se debe analizar. El segundo tipo de oligonucleótido hibrida con el ADN amplificado de modo que su extremo 5' hibrida
- 35 con el 3' proximalmente junto a dicha posición que se debe analizar. Así pues, los dos oligonucleótidos permanecen separados entre sí por un espacio que oscila entre 1 y 10 nucleótidos. El primer tipo de oligonucleótido se alarga a continuación con una polimerasa, si bien no se añaden más nucleótidos que los que separan los dos oligonucleótidos. Los nucleótidos utilizados comprenden dCTP y/o dTTP marcados de forma diferencial. A continuación, los dos oligonucleótidos son unidos entre sí mediante una enzima ligasa. Si la citosina del ADN original estaba metilada, entonces se habrá incorporado el dCTP. Y si la citosina del ADN original no estaba metilada, se
- 40 habrá incorporado el dTTP.

- 45 Por supuesto, otros métodos similares que constituyen desarrollos de dichos métodos o combinaciones de los mismos también son utilizables de acuerdo con la invención.

- En una forma de realización, el método de la invención es un método como el especificado anteriormente para la identificación de un marcador, que comprende además:

- 50 la identificación de por lo menos un patrón de metilación que comprende el estado de metilación de por lo menos dos posiciones CpG, estando dichas posiciones CpG constituidas por un fragmento de ADN y localizadas en cis, y en la cual el patrón de metilación difiere entre el ADN derivado de una célula, grupo de células, tejido, órgano o individuo caracterizado por un estado A y el ADN derivado de una célula, grupo de células, tejido, órgano o individuo caracterizado por un estado B; y

- 55 la selección de un valor de corte para el porcentaje de fragmentos de ADN caracterizados por un patrón de metilación identificado dentro de una mezcla de fragmentos de ADN, en la cual un valor porcentual igual o mayor que el valor de corte es indicativo del estado A y un valor porcentual menor que el valor de corte es indicativo del

estado B, o en la cual un valor porcentual menor que el valor de corte es indicativo del estado A y un valor porcentual igual o mayor que el valor de corte es indicativo del estado B.

De acuerdo con una forma de realización, se identifica un marcador, y ello incluye por lo menos una de las formas de realización descritas en la presente memoria. La identificación del marcador comprende además por lo menos una de las siguientes etapas adicionales: i) identificación de por lo menos un patrón de metilación, y ii) selección de un valor umbral de la fracción de fragmentos de ADN que comprende por lo menos dicho patrón de metilación en comparación con todos los fragmentos de ADN que integran un grupo de fragmentos de ADN. Por ello, la etapa i) se caracteriza por dos aspectos. En primer lugar, el patrón de metilación comprende por lo menos el estado de metilación de dos posiciones CpG, estando comprendidas dichas posiciones CpG por un fragmento de ADN y localizadas en cis. Como es conocido por un experto en la materia, una localización en cis significa que los correspondientes dinucleótidos CG comparten la misma orientación en la misma hebra de ADN. El segundo aspecto se refiere a dicho patrón de metilación mínimo en que el ADN obtenido de una célula, grupo de células, tejido, órgano o individuo caracterizado por un estado A se puede distinguir del ADN obtenido de una célula, grupo de células, tejido, órgano o individuo caracterizado por un estado B gracias a uno de dichos patrones de metilación o una combinación de los mismos.

De acuerdo con una forma de realización preferida, la etapa i) se caracteriza porque el marcador es un patrón de metilación preidentificado. Por ello, dicho patrón podría ser conocido como por ser indicativo de una enfermedad que es similar a la enfermedad de interés.

De acuerdo con una forma de realización preferida, la etapa ii) consiste en que: a) un valor representativo de la fracción de fragmentos de ADN que contienen por lo menos dicho patrón de metilación en comparación con todos los fragmentos de ADN que integran un grupo de fragmentos de ADN que es igual o mayor que el valor umbral resulta indicativo del estado A; y b) un valor representativo de dicha fracción de fragmentos de ADN que es menor que el valor umbral resulta indicativo del estado B.

De acuerdo con una forma de realización preferida, la etapa ii) consiste en que: a) un valor representativo de la fracción de fragmentos de ADN que contienen por lo menos dicho patrón de metilación en comparación con todos los fragmentos de ADN que integran un grupo de fragmentos de ADN que es mayor que el valor umbral resulta indicativo del estado A; y b) un valor representativo de dicha fracción de fragmentos de ADN que es igual o menor que el valor umbral resulta indicativo del estado B.

De acuerdo con una forma de realización preferida, la etapa ii) consiste en que: a) un valor representativo de la fracción de fragmentos de ADN que contienen por lo menos dicho patrón de metilación en comparación con todos los fragmentos de ADN que integran un grupo de fragmentos de ADN que es menor que el valor umbral resulta indicativo del estado A; y b) un valor representativo de dicha fracción de fragmentos de ADN que es igual o mayor que el valor umbral resulta indicativo del estado B.

De acuerdo con una forma de realización preferida, la etapa ii) consiste en que: a) un valor que representa la fracción de fragmentos de ADN que contienen por lo menos dicho patrón de metilación en comparación con todos los fragmentos de ADN que integran un grupo de fragmentos de ADN que es igual o mayor que el valor umbral resulta indicativo del estado A; y b) un valor representativo de dicha fracción de fragmentos de ADN que es mayor que el valor umbral resulta indicativo del estado B.

Según estas formas de realización de la etapa ii), el estado A, el estado B, o ambos pueden ser cualquier estado descrito en la presente memoria.

De acuerdo con una forma de realización preferida, las formas de realización descritas en la presente memoria para identificar un marcador se caracterizan porque permiten la identificación de un marcador con por lo menos uno de los criterios siguientes: sensibilidad superior aproximadamente al 20%, sensibilidad superior aproximadamente al 30%, sensibilidad superior aproximadamente al 35%, sensibilidad superior aproximadamente al 40%, sensibilidad superior aproximadamente al 50%, sensibilidad superior aproximadamente al 60%, sensibilidad superior aproximadamente al 70%, sensibilidad superior aproximadamente al 80%, sensibilidad superior aproximadamente al 90%, sensibilidad superior aproximadamente al 95%, sensibilidad superior aproximadamente al 99%, especificidad superior aproximadamente al 40%, especificidad superior aproximadamente al 50%, especificidad superior aproximadamente al 60%, especificidad superior aproximadamente al 70%, especificidad superior aproximadamente

al 80%, especificidad superior aproximadamente al 85%, especificidad superior aproximadamente al 90%, especificidad superior aproximadamente al 95%, o especificidad superior aproximadamente al 99%.

5 En una forma de realización preferida, el método de la invención es un método para identificar un marcador en que la identificación del marcador está permitida con por lo menos uno de los siguientes:

una sensibilidad superior aproximadamente al 20%, aproximadamente al 30%, aproximadamente al 35%, aproximadamente al 40%, aproximadamente al 50%, aproximadamente al 60%, aproximadamente al 70%, aproximadamente al 80%, aproximadamente al 90%, aproximadamente al 95%, o aproximadamente al 99%;

10 una especificidad superior aproximadamente al 40%, aproximadamente al 50%, aproximadamente al 60%, aproximadamente al 70%, aproximadamente al 80%, aproximadamente al 85%, aproximadamente al 90%, aproximadamente al 95%, o aproximadamente al 99%.

15 Dicha forma de realización particularmente preferida fue aplicada por el solicitante en varios estudios para identificar un marcador. Uno de estos estudios condujo a la identificación de un marcador del cáncer de colon, que se convirtió en el objeto de los documentos US 60/672.242; US 60/676.997; US 60/697.521 y US 60/723.602. Dicho marcador es especificado por una sensibilidad del 57% a una especificidad del 96% en un conjunto de 233 muestras obtenidas de individuos sanos y 127 muestras obtenidas de pacientes con cáncer colorrectal o por una sensibilidad del 50% a una especificidad del 95% en un conjunto de 83 muestras obtenidas de individuos sanos y 209 muestras obtenidas de pacientes con cáncer colorrectal. Se hace referencia explícita al documento US 60/723.602. El documento US 60/723.602 demuestra que dicha particular forma de realización preferida de la invención permite la identificación de un marcador con por lo menos una sensibilidad superior aproximadamente al 20%, aproximadamente al 30%, aproximadamente al 35%, aproximadamente al 40%, aproximadamente al 50%, aproximadamente al 60%, aproximadamente al 70%, aproximadamente al 80%, aproximadamente al 90%, aproximadamente al 95%, o aproximadamente al 99%; una especificidad superior aproximadamente al 40%, aproximadamente al 50%, aproximadamente al 60%, aproximadamente al 70%, aproximadamente al 80%, aproximadamente al 85%, aproximadamente al 90%, aproximadamente al 95%, o aproximadamente al 99%; o ambas. Como es conocido por el experto en la materia, los valores de sensibilidad y especificidad son específicas de cada estudio realizado. Es más, dependen la una de la otra y es posible aumentar el valor de una disminuyendo el valor de la otra.

De acuerdo con una forma de realización preferida, el método de la invención es un método para la identificación de un marcador en que dicha identificación está permitida con:

35 una sensibilidad superior aproximadamente al 20%, aproximadamente al 30%, aproximadamente al 35%, aproximadamente al 40%, aproximadamente al 50%, aproximadamente al 60%, aproximadamente al 70%, aproximadamente al 80%, aproximadamente al 90%, aproximadamente al 95%, o aproximadamente al 99%; y

40 una especificidad superior aproximadamente al 40%, aproximadamente al 50%, aproximadamente al 60%, aproximadamente al 70%, aproximadamente al 80%, aproximadamente al 85%, aproximadamente al 90%, aproximadamente al 95%, o aproximadamente al 99%.

De acuerdo con una forma de realización preferida, las formas de realización descritas en la presente memoria para la identificación un marcador se caracterizan porque permiten la identificación de un marcador con una sensibilidad superior aproximadamente al 20%, aproximadamente al 30%, aproximadamente al 35%, aproximadamente al 40%, aproximadamente al 50%, aproximadamente al 60%, aproximadamente al 70%, aproximadamente al 80%, aproximadamente al 90%, aproximadamente al 95%, o aproximadamente al 99% a una especificidad superior aproximadamente al 40%, aproximadamente al 50%, aproximadamente al 60%, aproximadamente al 70%, aproximadamente al 80%, aproximadamente al 85%, aproximadamente al 90%, aproximadamente al 95%, o aproximadamente al 99%.

En una forma de realización particularmente preferida, el método de la invención es un método para la identificación de un marcador, en el cual un marcador del cáncer de colon se identifica caracterizado por por lo menos una de las siguientes:

55 una sensibilidad de por lo menos aproximadamente el 25%, aproximadamente el 35%, aproximadamente el 40%, aproximadamente el 50%, aproximadamente el 55%, aproximadamente el 60%, aproximadamente el 70%,

aproximadamente el 80%, aproximadamente el 85%, aproximadamente el 90%, aproximadamente el 95%, o aproximadamente el 99%; y

- 5 una especificidad de por lo menos aproximadamente el 65%, aproximadamente el 75%, aproximadamente el 80%, aproximadamente el 85%, aproximadamente el 90%, aproximadamente el 95%, o aproximadamente el 99%.

De acuerdo con una forma de realización preferida, se identifica un marcador del cáncer de colon, teniendo dicho marcador por lo menos una de las siguientes características:

- 10 una sensibilidad de por lo menos aproximadamente el 25%, aproximadamente el 35%, aproximadamente el 40%, aproximadamente el 50%, aproximadamente el 55%, aproximadamente el 60%, aproximadamente el 70%, aproximadamente el 80%, aproximadamente el 85%, aproximadamente el 90%, aproximadamente el 95%, o aproximadamente el 99%; y

- 15 una especificidad de por lo menos aproximadamente el 65%, aproximadamente el 75%, aproximadamente el 80%, aproximadamente el 85%, aproximadamente el 90%, aproximadamente el 95%, o aproximadamente el 99%.

En una forma de realización particularmente preferida, el método de la invención es un método para la identificación de un marcador, en que un marcador del cáncer de colon se identifica caracterizado por

- 20 una sensibilidad de por lo menos aproximadamente el 25%, aproximadamente el 35%, aproximadamente el 40%, aproximadamente el 50%, aproximadamente el 55%, aproximadamente el 60%, aproximadamente el 70%, aproximadamente el 80%, aproximadamente el 85%, aproximadamente el 90%, aproximadamente el 95%, o aproximadamente el 99%; y

- 25 una especificidad de por lo menos aproximadamente el 65%, aproximadamente el 75%, aproximadamente el 80%, aproximadamente el 85%, aproximadamente el 90%, aproximadamente el 95%, o aproximadamente el 99%.

- De acuerdo con una forma de realización preferida, se identifica un marcador del cáncer de colon. Este marcador
30 tiene una sensibilidad de por lo menos aproximadamente el 25%, aproximadamente el 35%, aproximadamente el 40%, aproximadamente el 50%, aproximadamente el 55%, aproximadamente el 60%, aproximadamente el 70%, aproximadamente el 80%, aproximadamente el 85%, aproximadamente el 90%, aproximadamente el 95%, o aproximadamente el 99% a una especificidad de por lo menos aproximadamente el 65%, aproximadamente el 75%, aproximadamente el 80%, aproximadamente el 85%, aproximadamente el 90%, aproximadamente el 95%, o
35 aproximadamente el 99%.

En una forma de realización preferida, el método de la invención es un método para la identificación de un marcador caracterizado por la selección de un valor de corte, en el cual el valor de corte es seleccionado siguiendo por lo menos uno de los siguientes criterios:

- 40 una sensibilidad superior aproximadamente al 15%, aproximadamente al 25%, aproximadamente al 35%, aproximadamente al 40%, aproximadamente al 50%, aproximadamente al 55%, aproximadamente al 60%, aproximadamente al 70%, aproximadamente al 80%, aproximadamente al 85%, aproximadamente al 90%, o aproximadamente al 95%; y

- 45 una especificidad superior aproximadamente al 20%, aproximadamente al 40%, aproximadamente al 50%, aproximadamente al 60%, aproximadamente al 65%, aproximadamente al 70%, aproximadamente al 75%, aproximadamente al 80%, aproximadamente al 85%, aproximadamente al 90%, aproximadamente al 95% o aproximadamente al 99%.

- 50 De acuerdo con una forma de realización preferida, un marcador es identificado mediante la selección de un valor umbral según por lo menos uno de los siguientes:

- 55 una sensibilidad superior aproximadamente al 15%, aproximadamente al 25%, aproximadamente al 35%, aproximadamente al 40%, aproximadamente al 50%, aproximadamente al 55%, aproximadamente al 60%, aproximadamente al 70%, aproximadamente al 80%, aproximadamente al 85%, aproximadamente al 90%, o aproximadamente al 95%; y

una especificidad superior aproximadamente al 20%, aproximadamente al 40%, aproximadamente al 50%, aproximadamente al 60%, aproximadamente al 65%, aproximadamente al 70%, aproximadamente al 75%, aproximadamente al 80%, aproximadamente al 85%, aproximadamente al 90%, aproximadamente al 95% o aproximadamente al 99%.

De acuerdo con una forma de realización preferida, un marcador se identifica seleccionando un valor umbral acorde con una sensibilidad superior aproximadamente al 15%, aproximadamente al 25%, aproximadamente al 35%, aproximadamente al 40%, aproximadamente al 50%, aproximadamente al 55%, aproximadamente al 60%, aproximadamente al 70%, aproximadamente al 80%, aproximadamente al 85%, aproximadamente al 90%, o aproximadamente al 95% a una especificidad superior aproximadamente al 20%, aproximadamente al 40%, aproximadamente al 50%, aproximadamente al 60%, aproximadamente al 65%, aproximadamente al 70%, aproximadamente al 75%, aproximadamente al 80%, aproximadamente al 85%, aproximadamente al 90%, aproximadamente al 95% o aproximadamente al 99%.

En una forma de realización preferida, el método de la invención es un método para la identificación de un marcador con por lo menos uno de los siguientes: diagnosticar un estado, proporcionar un pronóstico para un estado, predecir la respuesta al tratamiento de un estado, determinar la predisposición a un estado, predecir una predisposición o un estado, determinar el curso del estado, predecir una progresión del estado, graduar un estado, estadificar un estado, clasificar un estado, caracterizar un estado, o combinaciones de los mismos, en los cuales el estado es un estado benigno o un acontecimiento adverso, en el cual uno de dichos se deduce del valor porcentual de los fragmentos de ADN caracterizados por un patrón de metilación preidentificado dentro de una mezcla de fragmentos de ADN, y en el cual el correspondiente estado de metilación de las posiciones CpG se mide según una forma de realización descrita en la presente memoria, comprendiendo además por lo menos uno de los siguientes:

deducción de uno de dichos para un estado A si el valor porcentual es igual o superior al valor de corte seleccionado;

deducción de uno de dichos para un estado B si el valor porcentual es menor que el valor de corte seleccionado;

deducción de uno de dichos para un estado B si el valor porcentual es mayor que el valor de corte seleccionado; y

deducción de uno de dichos para el estado A si el valor porcentual es igual o menor que el valor de corte seleccionado.

De acuerdo con una forma de realización preferida, un marcador es identificado para por lo menos una aplicación o un uso seleccionado entre los siguientes: diagnosticar un estado, proporcionar un pronóstico para un estado, predecir la respuesta al tratamiento de un estado, determinar la predisposición a un estado, predecir una predisposición a un estado, determinar el curso del estado, predecir una progresión del estado, graduar un estado, estadificar un estado, clasificar un estado, caracterizar un estado, o combinaciones de los mismos. Esta forma de realización se caracteriza porque:

i) el estado es un estado benigno o un acontecimiento adverso;

ii) el estado de metilación de las posiciones CpG de por lo menos un patrón de metilación pre-identificado se determina en una muestra de ADN procedente de un individuo, y por ello la determinación se lleva preferentemente a cabo según una forma de realización descrita en la presente memoria;

iii) determinación de la proporción de fragmentos de ADN. Los fragmentos se caracterizan porque comprenden el patrón de metilación preidentificado; y

iv) diagnosticar un estado, proporcionar un pronóstico para un estado, predecir la respuesta al tratamiento de un estado, determinar la predisposición a un estado, predecir una predisposición o un estado, determinar el curso del estado, predecir la progresión del estado, graduar un estado, estadificar un estado, clasificar un estado, caracterizar un estado, o combinaciones de los mismos comparando la proporción determinada de fragmentos de ADN con un valor umbral preseleccionado. De acuerdo con una forma de realización preferida determinada, el diagnóstico de un estado, el pronóstico de un estado, la predicción de la respuesta al tratamiento de un estado, la

determinación de la predisposición a un estado, la predicción de una predisposición a un estado, la determinación del curso del estado, la predicción de una progresión del estado, la graduación un estado, la estadificación de un estado, la clasificación de un estado, la caracterización de un estado, o combinaciones de los mismos se realiza mediante la determinación de que dicha proporción de fragmentos de ADN es mayor, mayor o igual, igual, igual o menor, o menor que el valor umbral preseleccionado.

En una forma de realización preferida, el método de la invención es un método para la identificación de un marcador, en el cual el estado A, el estado B, o ambos son un estado benigno o por lo menos un acontecimiento adverso, comprendiendo éste último por lo menos una categoría seleccionada entre el grupo siguiente: interacciones farmacológicas indeseadas; enfermedades oncológicas, enfermedades proliferativas o enfermedades asociadas a las mismas; alteración funcional, daño o enfermedad del SNC; síntomas de agresividad o trastornos de la conducta; consecuencias clínicas, psicológicas y sociales de daños cerebrales; trastornos psicóticos y trastornos de la personalidad; demencia y/o síndromes asociados; enfermedad cardiovascular del tubo digestivo; función anormal, daño o enfermedad del sistema respiratorio; lesión, inflamación, infección, inmunidad y/o convalecencia; función anormal, daño o enfermedad del cuerpo como una anomalía en el proceso de desarrollo; función anormal, daño o enfermedad de la piel, de los músculos, del tejido conectivo o de los huesos; función anormal, daño o enfermedad endocrina y metabólica; y cefaleas o disfunción sexual.

De acuerdo con una forma de realización preferida para la identificación de un marcador, un estado A, un estado B, o ambos o un estado en general es un estado sano o por lo menos un acontecimiento adverso. Por ello, el acontecimiento adverso comprende por lo menos una categoría seleccionada entre el grupo siguiente: interacciones farmacológicas indeseadas; enfermedades oncológicas, enfermedades proliferativas o enfermedades asociadas a las mismas; alteración funcional, daño o enfermedad del SNC; síntomas de agresividad o trastornos de la conducta; consecuencias clínicas, psicológicas y sociales de daños cerebrales; trastornos psicóticos y trastornos de la personalidad; demencia y/o síndromes asociados; enfermedad cardiovascular del tubo digestivo; función anormal, daño o enfermedad del sistema respiratorio; lesión, inflamación, infección, inmunidad y/o convalecencia; función anormal, daño o enfermedad del cuerpo como una anomalía en el proceso de desarrollo; función anormal, daño o enfermedad de la piel, de los músculos, del tejido conectivo o de los huesos; función anormal, daño o enfermedad endocrina y metabólica; y cefaleas o disfunción sexual.

De acuerdo con una forma de realización preferida, el método de la invención comprende controles.

De acuerdo con una forma de realización preferida determinada, la obtención de las muestras remotas comprende la selección y predeterminación de los criterios de control. Preferiblemente por lo menos uno de los criterios de control es:

Criterios de selección de la muestra: muestras seleccionadas de pacientes con una enfermedad definida, muestras seleccionadas de individuos sanos, muestras seleccionadas de pacientes con una enfermedad similar a la enfermedad definida, y muestras seleccionadas de pacientes con una enfermedad que no es similar a la enfermedad definida.

1. Criterios que especifican más las muestras derivadas del paciente con la enfermedad definida. Tales criterios son por ejemplo, entre otros: estadio, grado, clase, clasificación, características, síntomas, tratamiento médico previo, presencia o ausencia de antecedentes de enfermedad, disponibilidad de análisis histológico.

2. Criterios generales: a) las muestras son excluidas si proceden de pacientes o individuos portadores de enfermedades infecciosas como por ejemplo, entre otras, VIH (virus de la inmunodeficiencia humana), VHB (virus de la hepatitis B) o VHC (virus de la hepatitis C). B) Las muestras sólo son admitidas si:

- proceden de un individuo de una edad mínima predefinida,
- proceden de un paciente cuyo historial médico está disponible,
- o ambos.

3. Criterios que especifican más las muestras derivadas de un individuo sano: sólo se admiten las muestras que proceden de individuos:

- sin anomalías histológicas del órgano o la enfermedad definida normalmente afecta,
- sin antecedentes concernientes a la enfermedad definida dentro de un plazo de tiempo determinado.

5 4. Criterios que especifican más las muestras seleccionadas de pacientes con una enfermedad similar a la enfermedad definida: en este punto es necesario predefinir qué es una enfermedad similar. Sólo se admiten las muestras de pacientes que están caracterizadas por los criterios predefinidos como por ejemplo, entre otros: estadio, grado, clase, clasificación, características, síntomas, tratamiento médico previo, presencia o ausencia de antecedentes de la enfermedad, disponibilidad de análisis histológico.

10 5. Criterios que especifican más las muestras seleccionadas de pacientes con una enfermedad que no es similar a la enfermedad definida: sólo se admiten muestras de los pacientes

- cuya enfermedad es activa en el momento del análisis,
- que no tienen antecedentes de la enfermedad definida dentro de un plazo de tiempo predefinido. Si la enfermedad no similar está afectando al mismo tejido u órgano que la enfermedad definida, es preferible una nueva selección de muestras acorde con los criterios definidos, como por ejemplo, entre otras: estadio, grado, clase, clasificación, características, síntomas, tratamiento médico previo, presencia o ausencia de antecedentes de la enfermedad, disponibilidad de análisis histológico.

De acuerdo con una forma de realización preferida determinada, el aislamiento del ADN, el tratamiento con bisulfito y el análisis de la metilación de las muestras remotas comprende la selección y la predeterminación de los criterios de control. Preferiblemente se utiliza por lo menos uno de los criterios de control presentados en la Tabla 1.

25 Tabla 1: Controles adecuados para el método de la invención

<p>• Controles positivos:</p> <p>Una cantidad conocida de ADN es sometida a las formas de realización de la invención. La concentración del ADN facilitado es analizada. Estos controles son una medida de la variación en un mismo lote y entre lotes distintos de muestras remotas.</p>
<p>• Control del aislamiento del ADN:</p> <p>Una solución que contiene ADN completamente metilado y BSA (albúmina de suero bovino) es sometida a las formas de realización de la etapa de aislamiento del ADN. Este control ofrece una medida de la variación del aislamiento del ADN en un mismo lote y entre lotes distintos de muestras remotas. Además es un control del correcto funcionamiento de la etapa de aislamiento del ADN.</p>
<p>• Control del aislamiento del ADN y del tratamiento con bisulfito</p> <p>a) Una solución que contiene ADN completamente metilado y BSA es sometida al aislamiento del ADN y el tratamiento con bisulfito.</p> <p>b) Una solución que contiene ADN completamente metilado y ADN genómico se somete a la etapa de tratamiento con bisulfito.</p> <p>Estos dos tipos de controles ofrecen una medida de la variabilidad y el correcto funcionamiento de la etapa de tratamiento con bisulfito.</p>
<p>• Ejecución de un estudio de calibración</p> <p>Calibración directa únicamente mediante la utilización de los controles especificados anteriormente para el aislamiento del ADN y el tratamiento con bisulfito. Este estudio de calibración ofrece un intervalo de la variabilidad del proceso con el que se calibra el estudio.</p>
<p>• Controles de admisión de los lotes</p> <p>Los conjuntos de muestras son descartados si los controles (ver anteriormente) dentro de un lote no están comprendidos en un intervalo de variabilidad del proceso delimitado por 3 desviaciones estándar (STDev) de la media de calibración del proceso.</p>
<p>• Controles negativos – Contaminación medida mediante una PCR del aislamiento de ADN: una solución de BSA sin ADN. Tratamiento con bisulfito: una solución que comprende un tampón de elución sin ADN. Análisis de metilación: una solución sin ADN, por ejemplo, entre otras, agua.</p>

<ul style="list-style-type: none"> • Control de contaminación o manipulación incorrecta <p>Si alguno de los controles negativos mencionados anteriormente son positivos, los lotes resultarán excluidos de toda investigación posterior. La tasa de contaminación o manipulación incorrecta de las muestras se determina y es una medida de la calidad del método de la invención.</p>
<ul style="list-style-type: none"> • Criterios de admisión previos al estudio <p>Un conjunto de normas establecido para la aceptación o exclusión de las muestras a partir de los resultados de los controles de lote realizados antes del estudio.</p>

El término controles de lote puede hacer referencia a cualquier control especificado en la Tabla 1 y que se incluya en un conjunto de muestras remotas, siendo dicho conjunto de muestras procesado en paralelo según la invención.

Un experto en la materia sabe cómo aplicar los controles especificados en las formas de realización mencionadas anteriormente.

Kit.

También se muestra un kit, que consta por lo menos de uno de lo siguientes componentes:

- un recipiente;
- una o varias soluciones, sustancias, dispositivos o combinaciones de los mismos para recoger una muestra de orina;
- una o varias soluciones, sustancias, dispositivos o combinaciones de los mismos para recoger una muestra de plasma;
- una o varias soluciones, sustancias, dispositivos o combinaciones de los mismos para el aislamiento del ADN;
- una o varias soluciones, sustancias, dispositivos o combinaciones de los mismos para el tratamiento con bisulfito del ADN;
- una o varias soluciones, sustancias, dispositivos o combinaciones de los mismos para la determinación del estado de metilación o del patrón de metilación;
- una descripción para llevar a cabo una de las formas de realización de la invención.

Un kit preferido comprende un recipiente;

- una o varias soluciones, sustancias, dispositivos o combinaciones de los mismos para el aislamiento del ADN;
- una o varias soluciones, sustancias, dispositivos o combinaciones de los mismos para el tratamiento con bisulfito del ADN;
- una o varias soluciones, sustancias, dispositivos o combinaciones de los mismos para la determinación del estado de metilación o del patrón de metilación;
- una descripción para llevar a cabo una de las formas de realización de la invención.

Un kit particularmente preferido comprende la adición de por lo menos uno de los siguientes componentes: i) una o varias soluciones, sustancias, dispositivos o combinaciones de los mismos para recoger una muestra de orina; ii) una o varias soluciones, sustancias, dispositivos o combinaciones de los mismos para recoger una muestra de plasma; y iii) una o varias soluciones, sustancias, dispositivos o combinaciones de los mismos para la amplificación del ADN convertido con bisulfito.

Un kit particularmente preferido consta de un recipiente; una o varias soluciones, sustancias, dispositivos o combinaciones de los mismos para recoger una muestra de plasma u orina; una o varias soluciones, sustancias, dispositivos o combinaciones de los mismos para el aislamiento del ADN; una o varias soluciones, sustancias, dispositivos o combinaciones de los mismos para el tratamiento con bisulfito del ADN; una o varias soluciones, sustancias, dispositivos o combinaciones de los mismos para la amplificación del ADN convertido con bisulfito; una o varias soluciones, sustancias, dispositivos o combinaciones de los mismos para la determinación del estado de metilación o del patrón de metilación; y una descripción para llevar a cabo una de las formas de realización de la invención.

Otro kit particularmente preferido consta de un recipiente y una o varias soluciones, sustancias, dispositivos o combinaciones de los mismos para la amplificación del ADN convertido con bisulfito. El ADN convertido con bisulfito puede ser solo tratado con bisulfito o ser ADN tratado con bisulfito y purificado (desulfonado).

- 5 De acuerdo con los kits especificados en la presente memoria, la o las soluciones, sustancias, dispositivos o combinaciones de los mismos para la amplificación del ADN convertido con bisulfito comprende: i) una actividad ligasa, una actividad transferasa terminal, o ambas; ii) una actividad polimerasa; iii) por lo menos un cebador; y iv) por lo menos un nucleótido, por lo menos un oligómero, o ambos.
- 10 Preferiblemente, según los kits especificados en la presente memoria: i) la actividad ligasa es cualquier ligasa descrita en la presente memoria, en particular una ligasa de ADN monocatenario; ii) la actividad transferasa terminal es una actividad transferasa como la descrita en la presente memoria, en particular una desoxinucleotidiltransferasa terminal; iii) la actividad polimerasa es una enzima útil para la amplificación, en particular es una ADN-polimerasa, una ADN-polimerasa termoestable, una ARN-transcriptasa, una ARN-transcriptasa en combinación con una ARNasa como enzima adicional, o una ligasa; iv) el cebador o los cebadores son cebadores como los especificados en la
- 15 presente memoria, en particular cebadores aleatorios, cebadores aleatorios con bajo contenido en guanina, cebadores específicos, cebadores específicos de genes, o cebadores específicos de elongación; v) el oligómero es un oligómero como se especifica en la presente memoria, en particular un oligonucleótido o un oligómero quimérico de por lo menos un monómero de PNA y un nucleótido terminal 5' o 3'. Un cebador específico de gen es cualquier
- 20 cebador que es capaz de hibridar bajo condiciones restrictivas o moderadamente restrictivas con una molécula de ADN derivada de la muestra de ADN inicialmente proporcionada. En contraste a lo anterior, un cebador específico de elongación es cualquier cebador capaz de hibridar bajo condiciones restrictivas o moderadamente restrictivas con una porción elongada de una molécula de ADN, elongación que es realizada del modo descrito en la presente memoria. Por supuesto, también están incluidos los cebadores que son en parte específicos de la porción elongada
- 25 y en parte específicos de la molécula de ADN facilitada y tratada con bisulfito. Por supuesto, un kit preferido podría comprender únicamente uno o más de dichos componentes, pero no todos.

En un kit preferido

- 30 la actividad ligasa es una ligasa de ADN monocatenario;
la actividad transferasa terminal es una desoxinucleotidiltransferasa terminal;
la actividad polimerasa es una ADN-polimerasa, una ADN-polimerasa termoestable, una ARN-transcriptasa, una ARN-transcriptasa combinada con una ARNasa como enzima adicional, o una ligasa;
- 35 el cebador o cebadores son cebadores aleatorios, cebadores aleatorios con bajo contenido en guanina, cebadores específicos, cebadores específicos de gen, o cebadores específicos de elongación;
el oligómero es un oligonucleótido o un oligómero quimérico de por lo menos un monómero de PNA y un nucleótido terminal 5' o 3'; o
combinaciones de los mismos.
- 40 Un kit particularmente preferido también comprende una descripción o manual para llevar a cabo una amplificación del ADN tratado con bisulfito según el método especificado en la presente memoria.

Un kit preferido comprende un recipiente y

- 45 una o varias soluciones, sustancias, dispositivos o combinaciones de los mismos para la amplificación del ADN convertido con bisulfito además de una o varias soluciones, sustancias, dispositivos o combinaciones de los mismos para el tratamiento con bisulfito del ADN. Preferiblemente, esto también incluye una o varias soluciones, sustancias, dispositivos o combinaciones de los mismos para purificar, especialmente para la desulfonación del ADN tratado con bisulfito.
- 50 Según un kit particularmente preferido como una o varias soluciones, sustancias, dispositivos o combinaciones de los mismos para el tratamiento con bisulfito del ADN comprende un reactivo bisulfito como se describe en la presente memoria y un captador de radicales o una solución con captador de radicales como se especifica en la presente memoria. Preferiblemente, un kit particularmente preferido comprende además un dispositivo de purificación como el descrito en la presente memoria, como por ejemplo un dispositivo de filtro Microcon™, un
- 55 reactivo básico o una solución de hidróxido sódico como la que se especifica en la presente memoria, o ambos.

Un kit preferido comprende uno o más de los siguientes elementos:

una descripción para llevar a cabo el método de la invención para proporcionar una muestra de plasma; y
una descripción para llevar a cabo el método de la invención para proporcionar una muestra de orina.

5 Un kit preferido que comprende una o más soluciones, sustancias, dispositivos o combinaciones de los mismos para recoger una muestra de plasma, comprende además por lo menos uno de los siguientes componentes:

10 un recipiente con EDTA;
un recipiente con presión negativa;
una jeringa;
uno o varios recipientes adecuados para la centrifugación; una o varias pipetas;
uno o varios recipientes adecuados para la refrigeración, congelación, almacenamiento, transporte, o
combinaciones de los mismos de la muestra de plasma;
15 un cuaderno de recogida de casos; y
una lista de comprobación del proceso.

Un kit preferido de la invención que comprende una o más soluciones, sustancias, dispositivos o combinaciones de los mismos para recoger una muestra de orina, comprende además por lo menos uno de los siguientes componentes:

20 un tarro para recoger orina;
una pipeta;
uno o más recipientes con EDTA adecuados para la refrigeración, congelación, almacenamiento, transporte o combinaciones de los mismos de la muestra de orina;
25 un cuaderno de recogida de casos; y una lista de comprobación del proceso.

El objeto de la invención es además un kit como el descrito anteriormente que puede comprender además por lo menos uno de los siguientes:

30 una o más soluciones, sustancias, dispositivos o combinaciones de los mismos para concentrar una muestra remota o por lo menos un componente de la misma;
una o más soluciones, sustancias, dispositivos o combinaciones de los mismos para concentrar el ADN aislado de una muestra remota; o
35 una o más soluciones, sustancias, dispositivos o combinaciones de los mismos para purificar el ADN tratado con bisulfito.

Se prefiere un kit que contenga uno más de los siguientes elementos:

- 40 A) un recipiente;
B) una o más soluciones, sustancias, dispositivos o combinaciones de los mismos para recoger una muestra de orina tales como, entre otros, por lo menos un tarro para recoger orina, por lo menos una pipeta, por lo menos un recipiente con EDTA adecuado para la refrigeración, congelación, almacenamiento, transporte o combinaciones de los mismos de la muestra de orina, por lo menos un cuaderno de recogida de casos, por lo
45 menos una lista de comprobación del proceso;
C) una o más soluciones, sustancias, dispositivos o combinaciones de los mismos para recoger una muestra de plasma tales como, entre otros, por lo menos un recipiente con EDTA que tenga preferentemente presión negativa o la posibilidad de aplicar presión negativa como por ejemplo una jeringa, por lo menos un recipiente adecuado para la centrifugación, por lo menos una pipeta, por lo menos un recipiente con EDTA adecuado para la refrigeración, congelación, almacenamiento, transporte o combinaciones de los mismos, por lo menos un
50 cuaderno de recogida de casos, por lo menos una lista de comprobación del proceso;
D) una o más soluciones, sustancias, dispositivos o combinaciones de los mismos para concentrar una muestra remota o por lo menos un componente de la misma como se describe en la presente memoria;
E) una o más soluciones, sustancias, dispositivos o combinaciones de los mismos para el aislamiento del ADN como se describe en la presente memoria;
55 F) una o más soluciones, sustancias, dispositivos o combinaciones de los mismos para concentrar un ADN aislado de una muestra remota como se describe en la presente memoria;

- G) una o más soluciones, sustancias, dispositivos o combinaciones de los mismos para el tratamiento con bisulfito del ADN como se describe en la presente memoria;
- H) una o más soluciones, sustancias, dispositivos o combinaciones de los mismos para purificar el ADN tratado con bisulfito.
- 5 I) una o más soluciones, sustancias, dispositivos o combinaciones de los mismos para determinar el estado de metilación o el patrón de metilación como se describe en la presente memoria;
- J) una descripción para llevar a cabo por lo menos una de las formas de realización descritas en la presente memoria.

10 Uso del método de la invención.

Los métodos y kits mostrados en la presente memoria son utilizados para el análisis de por lo menos un estado de metilación del ADN, de por lo menos un nivel de metilación de ADN, o de por lo menos un patrón de metilación del ADN. Por supuesto, también se prefieren sus combinaciones.

15 El método de la invención y los kits descritos en la presente memoria son utilizados para el análisis de la metilación del ADN. En particular, este análisis comprende la detección y cuantificación de la metilación o la no metilación de por lo menos una posición CpG. Asimismo, comprende la identificación de por lo menos una posición CpG, siendo la metilación de dicha posición o posiciones indicativa de un estado descrito en la presente memoria. Preferiblemente, este análisis comprende la identificación de un estado de metilación, un nivel de metilación, o un patrón de metilación. Se prefiere particularmente que tal análisis comprenda la identificación de por lo menos un patrón de metilación que sea indicativo de un estado descrito en la presente memoria. Preferiblemente, dicho análisis comprende la determinación de un estado de metilación en una posición CpG, la determinación de un nivel de metilación en una posición CpG, la cuantificación de un patrón de metilación, o combinaciones de los mismos. Se
20
25 prefiere particularmente que dicho análisis comprenda la cuantificación de un patrón de metilación.

Los métodos y kits de la prueba mostrados en la presente memoria además son utilizados preferentemente para identificar una diana específica de una indicación, que comprende:

- 30 a) detección del porcentaje de fragmentos de ADN caracterizados por un patrón de metilación definido dentro de una mezcla de fragmentos de ADN que procede de una célula, grupo de células, tejido u órgano enfermos;
- b) detección del porcentaje de fragmentos de ADN caracterizados por un patrón de metilación definido dentro de una mezcla de fragmentos de ADN que procede de una célula, grupo de células, tejido u órgano sanos; y
- 35 c) definición de una diana específica de una indicación basándose en las diferencias en los porcentajes del ADN procedente de una célula, grupo de células, tejido u órgano enfermos en comparación con el ADN procedente de una célula, grupo de células, tejido u órgano sanos.

Preferiblemente, el método de la invención y los kits descritos en la presente memoria son utilizados para la
40 identificación de una diana específica de una indicación. Esta forma de realización comprende la detección y la cuantificación de una fracción de fragmentos de ADN dentro de un grupo de fragmentos de ADN. El grupo de fragmentos de ADN se caracteriza porque se obtiene de una célula, grupo de células, tejido u órgano enfermos. La fracción de fragmentos de ADN se caracteriza porque cada fragmento de ADN comprende por lo menos un patrón de metilación que es específico o indicativo de la enfermedad asociada con la célula, grupo de células, tejido u
45 órgano. Esta forma de realización comprende también una segunda detección y cuantificación de una fracción de fragmentos de ADN dentro de un grupo de fragmentos de ADN. El grupo de fragmentos de ADN se caracteriza porque se obtiene de una célula, grupo de células, tejido u órgano sanos. La fracción de fragmentos de ADN se caracteriza porque cada fragmento de ADN comprende por lo menos un patrón de metilación que es específico o indicativo de dicha enfermedad. Asimismo, esta forma de realización comprende la identificación de una diana
50 específica de una indicación. La identificación resulta determinada por las diferencias cuantitativas de dichas acciones de fragmentos de ADN obtenidas de la célula, grupo de células, tejido u órgano enfermos y de la célula, grupo de células, tejido u órgano sanos.

El uso de los métodos y kits descritos en la presente memoria es especialmente preferido para identificar una diana
55 específica de indicación, siendo dicha diana una sección de ADN, una molécula de ARN, una proteína, un péptido o un compuesto metabólico.

En particular se prefiere la utilización del método de la invención y de los kits descritos en la presente memoria para la identificación de una diana específica de una indicación. Según esta forma de realización, la diana específica de indicación es una sección de ADN, una molécula de ARN, una proteína, un péptido o compuestos metabólicos.

5 El uso del método de la invención y de los kits descritos en la presente memoria se prefiere especialmente, en el cual un modulador conocido *per se* de dicha sección de ADN, dicha molécula de ARN, dicha proteína, dicho péptido o dicho compuesto metabólico es asignado a la indicación específica de la célula, grupo de células, tejido u órgano enfermos.

10 En particular, la utilización del método de la invención y de los kits descritos en la presente memoria se prefiere en caso de que un modulador conocido *per se* de dicha sección de ADN, dicha molécula de ARN, dicha proteína, dicho péptido o dicho compuesto metabólico es asignado a la indicación específica de la célula, grupo de células, tejido u órgano enfermos.

15 Preferiblemente, la utilización de dicho modulador asignado se prefiere para preparar una composición farmacéutica en caso de una indicación específica, o una indicación oncológica específica. Esto se prefiere en particular si la indicación es una indicación oncológica.

20 El uso de los métodos y los kits descritos en la presente memoria además se prefiere especialmente para por lo menos uno de los siguientes supuestos en relación con un paciente o individuo: diagnosticar un estado, pronosticar un estado, predecir una respuesta al tratamiento, diagnosticar una predisposición a un estado, diagnosticar la progresión del estado, graduar un estado, estadificar un estado, clasificar un estado, caracterizar un estado, o combinaciones de los mismos, siendo el estado un estado sano o un acontecimiento adverso. El acontecimiento adverso incluye por lo menos una categoría seleccionada entre el grupo siguiente: interacciones farmacológicas indeseadas; enfermedades oncológicas, enfermedades proliferativas o enfermedades asociadas a las mismas; alteración funcional, daño o enfermedad del SNC; síntomas de agresividad o trastornos de la conducta; consecuencias clínicas, psicológicas y sociales de daños cerebrales; trastornos psicóticos y trastornos de la personalidad; demencia y/o síndromes asociados; enfermedad cardiovascular del tubo digestivo; función anormal, daño o enfermedad del sistema respiratorio; lesión, inflamación, infección, inmunidad y/o convalecencia; función anormal, daño o enfermedad del cuerpo como una anomalía en el proceso de desarrollo; función anormal, daño o enfermedad de la piel, de los músculos, del tejido conectivo o de los huesos; función anormal, daño o enfermedad endocrina y metabólica; y cefaleas o disfunción sexual.

35 En particular se prefiere la utilización del método de la invención o de los kits mostrados en la presente memoria para por lo menos una de las aplicaciones o usos seleccionados del grupo siguiente: diagnóstico de un estado, pronóstico de un estado, predicción de la respuesta al tratamiento, diagnóstico de predisposición a un estado, diagnóstico de progresión del estado, graduación un estado, estadificación de un estado, clasificación de un estado, la caracterización de un estado, o combinaciones de los mismos. Según esta forma de realización, el estado es un estado sano o un acontecimiento adverso. Dicho acontecimiento adverso incluye por lo menos una categoría seleccionada entre el grupo siguiente: interacciones farmacológicas indeseadas; enfermedades oncológicas, enfermedades proliferativas o enfermedades asociadas a las mismas; alteración funcional, daño o enfermedad del SNC; síntomas de agresividad o trastornos de la conducta; consecuencias clínicas, psicológicas y sociales de daños cerebrales; trastornos psicóticos y trastornos de la personalidad; demencia y/o síndromes asociados; enfermedad cardiovascular del tubo digestivo; función anormal, daño o enfermedad del sistema respiratorio; lesión, inflamación, infección, inmunidad y/o convalecencia; función anormal, daño o enfermedad del cuerpo como una anomalía en el proceso de desarrollo; función anormal, daño o enfermedad de la piel, de los músculos, del tejido conectivo o de los huesos; función anormal, daño o enfermedad endocrina y metabólica; y cefaleas o disfunción sexual.

50 El uso de los métodos y kits descritos en la presente memoria además se prefiere especialmente para distinguir tipos celulares o tejidos, o para investigar la diferenciación celular, en la cual el estado A y el estado B son condiciones celulares distintas.

55 El método de la invención y los kits mostrados en la presente memoria también son utilizados preferentemente para distinguir tipos celulares, tejidos o para investigar la diferenciación celular. Esto sirve de una manera particularmente preferida para analizar la respuesta de un paciente a un tratamiento farmacológico.

Definiciones

En ciertos aspectos, el término "estado de metilación" se refiere, aunque no exclusivamente, a la presencia o ausencia de metilación en un solo nucleótido de una sola molécula de ADN, entendiendo que dicho nucleótido puede resultar metilado.

En ciertos aspectos, el término "nivel de metilación" se refiere, aunque no exclusivamente, a la presencia media de metilación en un solo nucleótido de una pluralidad de moléculas de ADN, entendiendo que dicho nucleótido puede resultar metilado.

En ciertos aspectos, el término "patrón de metilación" se refiere, aunque no exclusivamente, al estado de metilación de una serie de nucleótidos localizados en cis en una sola molécula de ADN, entendiendo que dichos nucleótidos pueden resultar metilados.

En ciertos aspectos, el término "muestra remota" se refiere a una muestra que contiene ADN genómico, procediendo dicha muestra de sangre, plasma, suero u orina.

En ciertos aspectos, el término tratamiento también comprende, aunque no exclusivamente, la profilaxis y el tratamiento de seguimiento (por ejemplo de un tumor que ha dejado de ser detectable o de un tumor estable). El término profilaxis además de la detección también comprende el reconocimiento médico. En ciertos aspectos, los términos detección o diagnóstico y/o tratamiento o terapia de una enfermedad oncológica también comprende como opción, no exclusivamente, la detección y/o el tratamiento de las metástasis de los tumores primarios en otros tejidos.

En ciertos aspectos, el término pronóstico comprende, aunque no exclusivamente, afirmaciones sobre la probabilidad de éxito de una terapia o un tratamiento, y/o afirmaciones sobre la agresividad de una enfermedad, y/o afirmaciones sobre la supuesta esperanza de vida sin la aparición de nuevos síntomas de la enfermedad o metástasis y/o sobre la probabilidad de necesitar un tratamiento adicional, y/o sobre la compatibilidad de efectos secundarios indeseados.

En ciertos aspectos, una micromatriz de ADN es, aunque no exclusivamente, una construcción arbitraria con un sustrato o portador, sobre el que o en el que diferentes especies de ácido nucleico, como genes, fragmentos de genes u otros oligonucleótidos o polinucleótidos permanecen dispuestas en diferentes lugares definidos asignados a cada una de ellas. En cada uno de estos lugares se dispone una especie de ácido nucleico concreta, aunque también puede existir una mezcla definida de distintas especies de ácido nucleico en un lugar determinado, y cada lugar puede contener una mezcla distinta. Los ácidos nucleicos pueden estar inmovilizados, aunque esto no es forzosamente necesario, dependiendo del sustrato o portador utilizado. Ejemplos no limitativos de micromatrices son: micromatrices de ácido nucleico, micromatrices de gen, placas de microtitulación con soluciones de ácido nucleico en los pocillos, con los ácidos nucleicos inmovilizados o no, membranas con ácidos nucleicos inmovilizados, y matrices, micromatrices o chips de oligonucleótidos, caracterizados porque los oligonucleótidos de una longitud máxima de 200 pb están inmovilizados sobre una superficie.

En ciertos aspectos, un modulador de una diana es, aunque no exclusivamente, un compuesto o sustancia que inhibe o induce la generación de la diana, reduce o aumenta la actividad de la diana generada, referente a la actividad *in vitro* o *in vivo* en ausencia de la sustancia. Un modulador puede ser, por una parte, una sustancia que a través de su acción moderadora afecte al desarrollo de la cascada de la diana, y por otra parte, puede ser una sustancia que forme un enlace con la diana generada, y que a consecuencia de esa acción reduzca o aumente las interacciones fisiológicas con sustancias endógenas. Los moduladores también pueden ser moléculas que afecten e inhiban o activen la transcripción del gen diana. Estas moléculas pueden ser, por ejemplo, poliamidas o proteínas con dedos de cinc que bloquean la transcripción mediante su unión a regiones del ADN de la maquinaria transcripcional basal. La transcripción también puede producirse indirectamente a través de la inhibición de los factores de transcripción, los cuales son esenciales para la transcripción del gen diana. La inhibición de tales factores de transcripción puede resultar asegurada por la unión de los llamados aptámeros señuelo (*decoy*). Los moduladores pueden ser moléculas naturales o sintéticas que se unen específicamente a una diana o a un predecesor o sucesor de la misma. También pueden ser anticuerpos específicos, como por ejemplo anticuerpos policlonales o monoclonales humanos, humanizados y no humanizados. El término anticuerpos incluye además anticuerpos de expresión en fagos, anticuerpos de expresión de ribozimas (fusión covalente entre ARN y proteína) y

anticuerpos de expresión de ARN (producidos *in vitro*). El término también incluye anticuerpos que son modificados por quimerización, humanización o desinmunización, y fragmentos específicos de la cadena ligera y/o pesada de la región variable de anticuerpos básicos del tipo anterior. La producción y la extracción de tales anticuerpos con ciertos inmunogenes es bien conocida por los expertos en la materia y no es necesario explicarlas en detalle.

5 Además se incluyen anticuerpos biespecíficos, que por un lado se unen a una molécula activadora de una célula inmunitaria efectora (por ejemplo CD3, CD16, CD64), y por el otro a un antígeno de la célula tumoral diana. De darse la unión, ésta, por ejemplo, ocasionaría la muerte de la célula tumoral. Los moduladores también pueden ser, por ejemplo, anticalinas específicas de diana y aficuerpos que imiten a un anticuerpo.

10 En ciertos aspectos, una enfermedad oncológica es, no exclusivamente, una enfermedad oncológica específica de un órgano como: cáncer de pulmón, cáncer de ovario, cáncer de escroto, cáncer de próstata, cáncer de páncreas, cáncer de mama, cáncer de un órgano del tubo digestivo, etc. Las secuencias adecuadas referentes a todos los aspectos de la presente invención aparecen descritas por ejemplo en los documentos: DE 20121979 U1, DE 20121978 U1, DE 20121977 U1, DE 20121975 U1, DE 20121974 U1, DE 20121973 U1, DE 20121972 U1, DE 20121971 U1, DE 20121970 U1, DE 20121969 U1, DE 20121968 U1, DE 20121967 U1, DE 20121966 U1, DE 20121965 U1, DE 20121964 U1, DE 20121963 U1, DE 20121961 U1, DE 20121960 U1, DE 10019173 A1, DE 10019058 A1, DE 10013847 A1, DE 10032529 A1, DE 10054974 A1, DE 10043826 A1, DE 10054972 A1, DE 10037769 A1, DE 10061338 A1, DE 10245779 A1, DE 10164501 A1, DE 10161625 A1, DE 10230692, DE 10255104, EP 1268855, EP 1283905, EP 1268857, EP 1294947, EP 1370685, EP 1395686, EP 1421220, EP 451354, EP 1458893, EP 1340818, EP 1399589, EP 1478784, WO 004/035803, y WO 2005/001141, a los que se hace referencia explícita.

En ciertos aspectos, se puede elaborar una composición farmacéutica según la invención de una forma habitual, aunque no exclusivamente de dicha forma. Como contraiones de los compuestos iónicos se pueden utilizar por ejemplo: Na⁺, K⁺, Li⁺ o ciclohexilamonio. Las preparaciones farmacéuticas sólidas o líquidas adecuadas son, por ejemplo: granulados, polvos, grageas, comprimidos, (micro)cápsulas, supositorios, jarabes, jugos, suspensiones, emulsiones, gotas o soluciones inyectables (i.v., i.p., i.m., s.c.) o dispersiones finas (aerosoles), sistemas transdérmicos, y preparaciones de liberación retardada del principio activo. Para su producción se utilizan medios ordinarios tales como: sustancias portadoras, explosivos, aglutinantes, agentes de recubrimiento, agentes de esponjamiento, fluidificantes o lubricantes, mejoradores del gusto, edulcorantes y mediadores de solución. Como sustancias complementarias son mencionadas en la presente memoria: carbonato de magnesio, dióxido de titanio, lactosa, manitol y otros azúcares, polvo de talco, proteína de leche, gelatina, almidón, celulosa y derivados, aceites animales y vegetales tales como aceite de hígado de bacalao, girasol, cacahuete o sésamo, polietilenglicoles, y solventes tales como agua estéril y alcoholes mono- o multivalentes, por ejemplo glicerina. Se puede producir una composición farmacéutica acorde con la invención con por lo menos un modulador utilizado de acuerdo con la invención que se mezcle en una dosis definida con un excipiente farmacéuticamente adecuado y fisiológicamente tolerado y, posiblemente, añadiendo otras sustancias activas, complementarias o auxiliares con una dosis de inhibidor determinada. Esta formulación se debe preparar con la forma de administración deseada.

40 En ciertos aspectos, los marcadores de respuestas son, no exclusivamente, proteínas o moléculas de ARN o modificaciones de un ácido nucleico (tales como SNP o metilación) que están correlacionadas con la respuesta celular de una célula a una sustancia exógena, en concreto una sustancia terapéutica. Los pacientes reaccionan de modo distinto a una misma terapia. Esto se explica por las respuestas celulares individuales de cada paciente a la sustancia terapéutica. Dichos marcadores de respuesta se pueden identificar por medio de un análisis diferencial de tejidos idénticos de individuos distintos practicado en personas aquejadas por una misma enfermedad que, a pesar de ser tratadas con una misma terapia, reaccionan de modo dispar a la misma (por ejemplo cicatrización a distinta velocidad o diferentes efectos negativos tales como efectos secundarios). En estas personas, la existencia (diferencial) de una proteína o enzima o de una modificación del ácido nucleico, al igual que su ausencia, pueden convertirlas en un marcador de respuesta.

50 En ciertos aspectos, el término "intervalo de confianza" hace referencia, no exclusivamente, a la cuantificación de la incertidumbre de una medición. Normalmente se describe en forma de porcentaje del intervalo de confianza, esto es, el intervalo de valores dentro del cual se puede estar seguro con un cierto porcentaje de probabilidad de que se encuentra el valor verdadero para la población entera.

55

Ejemplos.

Ejemplo 1. Recogida de la muestra

5 Ejemplo 1a. Recogida de las muestras de plasma

Las muestras de plasma se obtuvieron de varios proveedores ubicados en Estados Unidos, Rusia, Hungría y Alemania según las especificaciones siguientes:

10 Las muestras de plasma se obtuvieron de pacientes con cáncer colorrectal en estadio I-III (AJCC) y de varios controles comprendidos en los siguientes grupos:

- 15
- Grupo CCR: pacientes con cáncer colorrectal (confirmado por anatomopatología)
 - Controles sanos: pacientes sin hallazgos anatomopatológicos en la colonoscopia y sin signos de enfermedad aguda o crónica exacerbada
 - Controles oncológicos: pacientes con otros carcinomas distintos del cáncer colorrectal, por ejemplo cáncer de mama o de próstata
 - Controles no oncológicos: pacientes con enfermedades no oncológicas

20 Las tablas 2 y 3 proporcionan una visión general de los dos conjuntos de muestras recogidos:

Grupo diagnóstico	Volumen de muestra	Número de muestras	Observaciones
Cáncer colorrectal	16 ml de plasma	175	Estadio I,II,III independientemente de los síntomas
Controles no oncológicos		175	Pacientes sintomáticos con enfermedades no agudas
Controles oncológicos		50	Mayoritariamente cáncer de próstata y mama

Tabla 2. Visión general de un conjunto de muestras.

Grupo diagnóstico	Volumen de muestra	Número de muestras	Observaciones
Cáncer colorrectal	16 ml de plasma	200	Estadio I,II,III y síntomas no específicos del CCR
Controles sanos		125	Pacientes asintomáticos
Controles sin cáncer		175	Pacientes sintomáticos con enfermedades no agudas
Controles con cáncer		50	Mayoritariamente cáncer de próstata y mama

Tabla 3. Visión general de un segundo conjunto de muestras.

25 Criterios de admisión/exclusión de las muestras:

De cada grupo se recogió un número equivalente de muestras con un mínimo de 30 muestras. Las muestras remotas de plasma se aceptaban si cumplían los siguientes criterios (Tablas 4-8):

Criterios generales – aplicados a todas las muestras	
Consentimiento	Formulario de consentimiento explicado y firmado por el paciente (~45 ml de sangre)
Enf. infecciosas	Paciente no portador de VIH, VHB o VHC
Edad	Paciente preferentemente mayor de 50 años (mínimo 40 años)
Historial médico	Historial médico disponible
Admisión	Grupo de enfermedad todavía elegible para la admisión en el estudio

Tabla 4. Criterios generales para la admisión de las muestras de plasma.

Grupo CCR – Muestras procedentes de pacientes con cáncer colorrectal (CCR)	
Momento	Paciente todavía no tratado, es decir, que no había recibido tratamiento alguno, incluido el tratamiento neoadyuvante y la extracción del tumor por colonoscopia
Patología	Tipo histológico: adenocarcinoma
Estadificación	estadio I-III según AJCC
Antecedentes	Pacientes sin antecedentes de cáncer de colon
Colonoscopia	Dispone de informe que incluye el análisis histológico de la colonoscopia Colonoscopia no realizada en los últimos 7 días o más de 6 meses atrás

5 Tabla 5 Criterios de admisión de las muestras de plasma en el grupo de cáncer colorrectal.

Controles oncológicos - Muestras procedentes de pacientes con por ejemplo cáncer de mama o próstata	
Momento	Paciente todavía sin tratamiento, es decir, que no ha recibido tratamiento alguno contra el cáncer
Antecedentes	Paciente sin antecedentes de cáncer de colon
Patología	Diagnóstico histológico disponible
Información de estadificación	Datos de clasificación TNM
Síntomas	Los pacientes no sometidos a colonoscopia por ninguno de los siguientes síntomas específicos del CCR constituyeron la <i>población diana preferida</i> para este grupo: <ul style="list-style-type: none"> - hemorragia anorrectal (hematoquecia) - hábitos defecatorios alterados - anemia franca/conocida con hemoglobina <10 g/dl - pérdida de peso inexplicada (10% de peso en 6 meses) - signos de obstrucción intestinal (cambio en la forma de las heces) - hábitos defecatorios alterados

Tabla 6. Criterios de admisión de las muestras de plasma en el grupo de control oncológico.

Controles sanos – sin ningún signo de enfermedad aguda	
Momento	Paciente en situación 'normal' (por ejemplo sin anestesia general, cirugía, etc.)
Patología	Tipo histológico: mucosa normal, sin inflamación u otros hallazgos
Antecedentes	Sin antecedentes de cáncer en los últimos 5 años (excepto carcinoma basocelular)
Colonoscopia	Dispone de informe que incluye el análisis histológico de la colonoscopia Colonoscopia no realizada en los últimos 7 días o más de 6 meses atrás
Síntomas	Sin signos ni síntomas de enfermedad aguda Sin cambio en síntomas de una enfermedad crónica existente (exacerbación)

Tabla 7. Criterios de admisión de las muestras de plasma en el grupo de control sano.

Controles no oncológicos – Enfermedades infecciosas, inflamatorias o sistémicas agudas	
Momento	La enfermedad es activa en el momento actual.
Antecedentes	Sin antecedentes de cáncer en los últimos 5 años (excepto carcinoma basocelular)
Colonoscopia	Colonoscopia sólo si la enfermedad está localizada en el colon, por ejemplo diverticulitis Colonoscopia no realizada en los últimos 7 días o más de 6 meses atrás

Tabla 8. Criterios de admisión de las muestras de plasma en el grupo de control no oncológico.

- 5 Cada investigador principal facilitó la información clínica del paciente especificada en el cuaderno de recogida de casos incluido en el kit de recogida de muestra suministrado para cada paciente. Éste incluyó, entre otra información:
- Datos generales del paciente: edad, sexo, raza
 - 10 • Síntomas
 - Información diagnóstica: enfermedades actuales, incluidos datos del informe anatomopatológico
 - Información del tratamiento
- 15 Asimismo, cada proveedor recibió un protocolo del estudio con una descripción del proceso de recogida y con los kits de recogida de las muestras para asegurar la utilización del mismo material para la extracción de sangre, la extracción del plasma y la conservación de las muestras.
- 20 Para cada paciente se usó un kit de recogida de muestra con tubos preetiquetados y formularios impresos. Una bolsa grande contenía el cuaderno de recogida de datos (CRD) para anotar la información clínica y una lista de control del proceso para registrar las etapas de procesamiento. El material necesario para la extracción de sangre (agujas y recipientes de sangre), la extracción del plasma (tubos Falcon y pipetas) y la conservación de las muestras (crioviales) es proporcionado envasado en bolsas pequeñas.
- 25 Una vez admitido el paciente por el investigador principal, se le extrajo la sangre y se rellenó el CRD. Los tubos para la recogida de sangre se llenaban por encima de la marca impresa en la etiqueta para garantizar la correcta concentración de EDTA en la muestra. Los tubos de sangre se procesaron inmediatamente o se mantuvieron entre compresas frías hasta tres horas si era necesario enviarlos al laboratorio.
- 30 El plasma se extrajo de la sangre mediante un proceso de centrifugación de dos etapas. Ambas etapas se realizaron a 1.500 x g a 4°C. Los recipientes de sangre se usaron para la primera centrifugación. Después, se extrajo con cuidado el sobrenadante de 4-5 tubos de sangre y se depositó en dos tubos Falcon de 15 ml dejando 5 mm de margen por encima de la capa leucocítica.
- 35 Después de la segunda centrifugación, el plasma de los tubos Falcon pequeños se transfirió a un tubo Falcon grande de 50 ml para agrupar la muestra antes de alicuotarla en 4-5 crioviales de 4,5 ml. En este punto, en cada tubo pequeño Falcon se dejó un volumen residual de 0,5 a 1 ml para asegurar una separación óptima entre los leucocitos y el sobrenadante.
- 40 Los crioviales se congelaron en posición vertical inmediatamente, como máximo hasta 4 horas después de la extracción de la sangre. La congelación y el almacenamiento se llevaron a cabo entre -70 y -80 °C.
- Cada etapa se anotó en la lista de control del proceso facilitada con el kit de recogida.
- 45 Las muestras se enviaron con hielo carbónico seco a petición.

La información registrada se introdujo en una hoja de cálculo electrónica y ésta fue proporcionada de igual forma que los CRD y las listas de control del proceso para el análisis posterior de las muestras de plasma. Los datos clínicos facilitados en la hoja de cálculo electrónica se revisaron para asegurar:

- 5 • Verosimilitud
- Exhaustividad
- Pseudoanonimato del paciente y
- Cumplimiento con los criterios de admisión y exclusión.

10 **Ejemplo 1b.** Recogida de las muestras de orina:

Las muestras de orina fueron recogidas por varios proveedores ubicados en Estados Unidos y Alemania.

- 15 Cada proveedor proporcionó un protocolo del estudio con una descripción del proceso de recogida y de los kits de recogida de muestras para asegurar la utilización del mismo material para la recogida de la orina y la conservación de las muestras.

Antes de comenzar la recogida se comprobaron los criterios de admisión y exclusión.

- 20 Para cada paciente se utilizó un kit de recogida de muestra con tubos preetiquetados y formularios impresos. Una bolsa grande contenía el cuaderno de recogida de casos (CRD) para anotar la información clínica y una lista de control del proceso para registrar las etapas de procesamiento. El material necesario para la recogida de orina (envases para orina, pipeta) y la conservación de las muestras (crioviales) se envasa en bolsas pequeñas.

- 25 Una vez que el investigador principal decidió admitir al paciente, se le practicó un masaje de la próstata, se recogieron los primeros 20 ml de orina y se rellenó el CRD. El tarro de orina tenía que llenarse hasta la marca que figuraba en el envase para garantizar la correcta concentración de EDTA en la muestra.

- La orina se pipeteó en dos crioviales de 10 ml y se congeló entre -70 y -80 °C durante la hora siguiente a la recogida.

- 30 Cada etapa se registró en la lista de control del proceso facilitada con el kit de recogida.

Las muestras se enviaron con hielo carbónico a petición.

- 35 La información registrada se introdujo en una hoja de cálculo electrónica y se facilitó al igual que los CRD y las listas de control del proceso para el análisis posterior de las muestras de orina.

Ejemplo 2. Controles del proceso.

- 40 Se prepararon y usaron los siguientes controles del proceso.

Control negativo de MagNA Pure: BSA 5% (Albúmina de suero bovino Fracción V (Roche n.º cat. 03 117 375 001) diluido en suero salino tamponado con fosfato 1x (tampón PBS 10X pH 7,4 (Ambion Inc. n.º cat. 9625).

- 45 Control positivo de MagNA Pure: ADN metilado (Chemicon n.º cat. S7821) inoculado en una solución de BSA 5%, concentración final 25 ng/ml.

Dichos controles se prepararon a granel antes de cada estudio, y se almacenaron en alícuotas de 4 ml, que es un volumen suficiente para hacer un análisis con el instrumento MagNA Pure LC (Roche).

- 50 **Ejemplo 3.** Aislamiento del ADN contenido en las muestras de plasma.

- El aislamiento del ADN de 895 muestras de plasma se efectuó con el kit MagNA Pure Compact Nucleic Acid Isolation Kit (I) Large Volume (Roche). Las muestras de plasma se descongelaron y el ADN se extrajo en paralelo de 55 ocho alícuotas de 1 ml de cada muestra de plasma. Las muestras y los controles se depositaron en una placa de microtitulación, manipulándose y agrupándose según la figura 2. Cada ejecución del aparato MagNA Pure LC incluye tres muestras de 8 ml cada una, dividida en alícuotas de 1 ml; un control negativo de 4 ml dividido en

alícuotas de 1 ml; y un control positivo de 4 ml dividido en alícuotas de 1 ml. La posición de los controles negativo y positivo en la placa de microtitulación se asignó al azar para cada ejecución de análisis al inicio del estudio. Se escogió un volumen de elución de 100 µl por pocillo. Las diferentes ejecuciones de análisis se ajustaron y efectuaron por parejas con 4 aparatos MagNA Pure LC. El ADN facilitado en tampón de elución fue sometido después a la etapa de agrupamiento y concentración.

Ejemplo 4. Agrupamiento y concentración.

El objetivo de esta etapa consiste en agrupar las 8 extracciones de ADN realizadas en paralelo con cada muestra remota y concentrar el eluato de 800 µl hasta un volumen de 100 µl (véase la figura 2). De acuerdo con el protocolo de extracción MagNA Pure se obtuvieron 100 µl de eluato de cada alícuota de 1 ml. Se usaron dos columnas Microcon YM-30 (Millipore) por muestra remota. En otras palabras, en cada filtro se agruparon 4 eluatos que sumaban un volumen de 400 µl. A continuación, los filtros se centrifugaron con una microcentrífuga hasta obtener un volumen de 50 µl. A su vez, los dos concentrados de 50 µl se agruparon para disponer de una muestra de 100 µl que contenía el ADN extraído de los 8 ml de la muestra de plasma.

Para los controles positivo y negativo se utilizó una sola columna Microcon YM-30 (Millipore). Los 50 µl resultantes de cada control se ajustaron hasta un volumen de 100 µl añadiendo el tampón de elución MagNA Pure facilitado con el kit MagNA Pure Compact Nucleic Acid Isolation Kit (I) Large Volume.

Ejemplo 5. Control de calidad de la extracción del ADN.

Se extrajeron 5 µl de cada 100 µl de muestra concentrada, del control positivo y el control negativo y se diluyeron en 45 µl de tampón de elución MagNA Pure facilitado con el kit MagNA Pure Compact Nucleic Acid Isolation Kit (I) Large Volume. 12,5 µl del ADN diluido se sometieron al ensayo de ADN genómico CFF1 para determinar la concentración del ADN total. La concentración de ADN recuperado en las muestras del control positivo se utilizó como medida de control de calidad para calibrar la etapa de extracción del ADN. La mediana de la recuperación del ADN de los controles positivos ascendió a 2,8 ng/ml. La mediana de la recuperación del ADN obtenido de 895 muestras de plasma ascendió a 3,86 ng/ml, con un intervalo de 0 a 1086 ng/ml.

Ensayo de ADN genómico CFF1

Cebador directo CFF1 SEC ID N.º 1

5'TAAGAGTAATAATGGATGGATGATG3'

Cebador inverso CFF1 SEC ID N.º 2

5'CCTCCCATCTCCCTTCC3'

Sonda TaqMan CFF1 SEC ID N.º 3

5'-6 FAM-ATGGATGAAGAAAGAAAGGATGAGT-BHQ-1-3'

Las soluciones siguientes se pipetearon juntas y se mezclaron según la Tabla 9.

Solución	Concentración de partida	Volumen	Concentración final
Hybprobe Master Mix	10x	2 µl	1x
MgCl ₂	25 mmol/l	1,2 µl	2,500 mmol/l
Mezcla de cebadores	10 µmol/l (cada uno)	1,25 µl	0,625 µmol/l (cada uno)
Sonda TaqMan	10 µmol/l	0,4 µl	0,200 µmol/l (cada una)
Agua	--	2,65 µl	--
ADN diluido	--	12,5 µl	--
Volumen total de reacción		20 µl	

Tabla 9: Preparación de la mezcla de PCR para el ensayo de ADN genómico CFF1. (Hybprobe Master Mix corresponde a las sondas de hibridación LightCycler FastStart DNA Master (Roche n.º cat 2 239 272)).

La PCR se llevó a cabo con un termociclador LightCycler 2.0 (Roche) en las condiciones indicadas en la Tabla 10.

1	Activación	95°C	10 min
2	Desnaturalización	95°C	15 s
3	Reasociación/extensión y detección	58°C	60 s
5	Ciclación	Las fases 2 y 3 se repitieron 45 veces	
4	Enfriamiento	40°C	30 s

Tabla 10: Condiciones de ciclación de la PCR para el ensayo de ADN genómico CFF1 en un termociclador LightCycler 2.0 (Roche).

Ejemplo 6. Tratamiento con bisulfito y purificación del ADN tratado con bisulfito.

Utillaje utilizado: baño maría a 50°C, termomezcladoras a 60°C, baño maría en ebullición.

Reactivos utilizados: antes de comenzar el estudio se pesaron y alicuotaron todos los reactivos de bisulfito anhidro y de captadores de radicales necesarios en cada caso en 75 tubos. Así se dispuso de 75 conjuntos de reactivo para el tratamiento con bisulfito alicuotado. Cada uno de los 75 conjuntos se usó para un lote de tratamiento con bisulfito.

La solución de bisulfito y la solución de captadores de radicales-dioxano se prepararon poco antes de cada procedimiento. Para elaborar la solución de bisulfito se disolvieron 10,36 g de bisulfito sódico y 2,49 g de sulfito sódico añadiendo 22 ml de agua exenta de nucleasas. La solución se mezcló vigorosamente de forma repetida y se incubó a 50°C hasta que se disolvieron todas las partículas de bisulfito. Para elaborar la solución de captadores de radicales-dioxano se disolvieron 323 mg de ácido 6-hidroxi-2,5,7,8-tetrametil-cromano-2 carboxílico (captador de radicales) añadiendo 8,2 ml de 1,4-dioxano. La solución se mezcló vigorosamente hasta que todas las partículas se disolvieron. Además, se prepararon 500 ml de una solución de tris-(hidroximetil)-aminometano 0,1 mol/l, EDTA 0,1 mmol/l, 50 ml de una solución de NaOH 0,2 mol/l y 50 ml de una solución de NaOH 0,1 mol/l.

Almacenamiento de las muestras: todas las muestras se almacenaron a 4°C.

Materiales y equipo utilizados:

Termomezcladora Eppendorf 5355 (Brinkmann n.º 022670107)
 Termomezcladora Eppendorf con bloque para 2,0 ml (Brinkmann n.º 022670549)
 Baño termostático VWR 1225 (VWR n.º 13309-375)
 Placa eléctrica VWR con agitador 620, 7" x7" (VWR n.º 12365-382)
 Microcentrífuga de Eppendorf 5417C
 Balanza analítica Mettler-Toledo AG64
 Dispositivos de filtro Microcon Millipore Y-30 (Millipore n.º 42411)
 Vaso de precipitados de vidrio 4L Corning (Corning n.º 1003-4L)
 Probeta de pie graduada de 500 ml Nalgene (NNI n.º 3663-0500)
 Unidad de filtro estéril de 0,2 µm Nalgene, 500 ml (Nalgene n.º 166-0020)
 Gradilla flotante para microtubos Nalgene, 16 huecos (VWR n.º 60986-098)
 Gradilla flotante para microtubos Nalgene, 8 huecos (VWR n.º 60986-099)
 Tubo cónico Falcon de 50 ml (Falcon 352070)
 Tubo cónico Falcon de 15 ml (Falcon 352096)
 Agua exenta de nucleasas (Ambion n.º 9932)
 Bisulfito sódico (Sigma n.º S,9000)
 Sulfito sódico (Sigma n.º 4672)
 1,4-dioxano estabilizado (Sigma n.º 33147)
 Captador de radicales – ácido 6-hidroxi-2,5,7,8-tetrametil-chroman-2 carboxílico (Sigma n.º 238813-5G)
 EDTA 0,5 mol/l (Ambion n.º 9260G)
 NaOH 0,2 mol/l (Fisher n.º AC349685000)
 Tris-(hidroximetil)-aminometano 1 mol/l (Ambion n.º 9855G)
 Tapones de tubo (ISC Bioexpress n.º C-3271-2)

Tubos Eppendorf con cierre seguro de 2,0 ml (Eppendorf n.º 22 60 004-4)

Tubo de recogida para columna (Millipore n.º 1065601)

Minicentrífuga Quick-Spin (ISC Bioexpress n.º C-1301-P)

Pipeta automática Pipet-Aid (Drummond n.º 4-000-100)

5 Tubos de microcentrífuga de baja retención de 1,7 ml (ISC Bioexpress n.º C-3228-1)

Tubos de microcentrífuga de baja retención de 0,65 ml (ISC Bioexpress n.º C-3226-1)

a) Tratamiento con bisulfito del ADN aislado

10 *Preparación de la muestra:* los tubos de 2 ml que contenían la solución de ADN aislado del ejemplo 4 se sacaron de la nevera a 4 °C. Cada lote de tratamiento con bisulfito incluyó 20 muestras de ADN aislado y los controles en proceso del tratamiento con bisulfito, un control positivo y un control negativo. El control negativo de bisulfito era tampón de elución MagNA Pure, mientras que el control positivo de bisulfito contenía 0,1 µg de ADN metilado Chemicon y 0,9 µg de ADN genómico humano Roche por 1 ml de tampón de elución MagNA Pure.

15 Los tubos se centrifugaron brevemente a 6.000 rpm. 354 µl de la solución de bisulfito y 146 µl de la solución de dioxano se añadieron a cada tubo consecutivamente. Los tubos se mezclaron vigorosamente durante 10 s y se centrifugaron brevemente a 6.000 rpm.

20 *Reacción de bisulfito:*

Los tubos se cerraron y se introdujeron en un baño de agua en ebullición durante 3 minutos para desnaturalizar el ADN. A continuación, se transfirieron a la termomezcladora precalentada y se incubaron a 60 °C mientras se mezclaban a 1.000 rpm durante 30 min. Después, los tubos se volvieron a sumergir en el baño en ebullición durante 25 3 min, antes de volver a ser incubados en la termomezcladora durante 1,5 h a 60 °C y 1.000 rpm. De nuevo, los tubos se volvieron a introducir en el baño en ebullición durante 3 min y, por último, se volvieron a incubar en la termomezcladora durante 3 h a 60 °C y 1.000 rpm.

Desalación de la mezcla de reacción de bisulfito:

30 Los tubos de la reacción de bisulfito se mezclaron y se centrifugaron brevemente a 6.000 rpm. Los precipitados formados durante el calentamiento se disolvieron mediante la mezcla repetida y la adición de 200 µl de agua. A continuación, los tubos se centrifugaron brevemente durante 10 s. Se extrajeron 400 µl de solución de cada tubo y se transfirieron a una columna Micron YM-30 Microcon debidamente etiquetada. Se utilizó una columna para cada muestra remota original, que se colocó en un tubo de recogida. Los montajes de columna se centrifugaron durante 35 20 min a 14.000 x g. Después de la centrifugación, la columna se transfirió a un nuevo tubo de recogida y la fracción restante de aproximadamente 400 µl de la reacción de bisulfito se transfirió a la correspondiente columna Micron YM-30 Microcon. De nuevo, los montajes de columna se centrifugaron durante 20 min a 14.000 x g y la columna se transfirió a un nuevo tubo. Después de esta segunda centrifugación, la membrana de filtrado de las columnas tiene 40 que estar húmeda pero no debe mostrar ningún volumen visible de líquido. Las columnas que seguían reteniendo líquido se volvieron a centrifugar repetidamente durante 5 min a 14.000 x g hasta que el filtro sólo quedó húmedo. Por último, las columnas se colocaron en un nuevo tubo.

b) Purificación del ADN tratado con bisulfito

45 *Lavado y desulfonación del ADN tratado con bisulfito:*

Se vertieron 400 µl de NaOH 0,2 mol/l en todas las columnas YM-30 Microcon húmedas que contenían el ADN tratado con bisulfito. Las columnas se centrifugaron a 14.000 x g durante 12 min y después se colocaron en un nuevo tubo. A cada columna se transfirieron 400 µl de NaOH 0,1 mol/l y de nuevo se centrifugaron a 14.000 x g 50 durante 12 min. Después de esta segunda centrifugación, la membrana del filtro de las columnas debe estar húmeda pero no mostrar ningún volumen de líquido visible. Las columnas que seguían reteniendo líquido se centrifugaron repetidamente durante 5 min a 14.000 x g hasta que el filtro sólo quedó húmedo. Por último, las columnas se colocaron en un nuevo tubo. Después de esta etapa de desulfonación, las columnas se lavaron dos veces con 400 55 µl de agua y se centrifugaron a 14.000 x g durante 12 min. En esta segunda etapa de lavado se usó un nuevo tubo para recoger el flujo caído. Después del segundo lavado, la membrana de filtro de las columnas debe estar húmeda pero no mostrar ningún volumen de líquido visible. Las columnas que seguían reteniendo líquido se centrifugaron

repetidamente durante 5 min a 14.000 x g hasta que el filtro sólo quedó húmedo. Las columnas húmedas se colocaron en un nuevo tubo para llevar a cabo la elución.

Elución del ADN tratado con bisulfito:

Se transfirieron entre 50 y 65 µl de Tris 0,1 mmol/l EDTA 0,1 mol/l precalentados a 50°C a cada columna que contenía el ADN desulfonado. A continuación, el montaje de la columna se colocó en un termomezcladora y se incubó a 50°C durante 10 min mientras se agitaba a 1.000 rpm. Después, se invirtieron las columnas y se colocaron en un nuevo tubo etiquetado. El ADN se eluyó de cada columna mediante centrifugación a 1.000 x g durante 7 min. Las muestras de ADN tratado con bisulfito y eluido cuyo volumen era inferior a 50 µl se ajustaron hasta 50 µl añadiendo la cantidad apropiada de Tris 0,1mmol/l EDTA 0,1 mol/l.

A efectos de control, 5 µl de los 50 µl de ADN eluido se diluyeron con 45 µl de agua; una fracción de 12,5 µl se sometió al ensayo HB14 para determinar la cantidad de ADN convertido con bisulfito y 20 µl se destinaron al análisis de sulfito. La mediana de la recuperación de ADN correspondiente a 887 muestras de plasma ascendió a 3,32 ng/ml, oscilando el intervalo entre 0 y 1109 ng/ml.

Ensayo HB14 (determinación de la cantidad de ADN convertido con bisulfito):

Cebador directo HB14 SEC ID N.º 4
5'-TGGTGATGGAGGAGGTTTAGTAAGT-3'
Cebador inverso HB14 SEC ID N.º 5
5'-AACCAATAAAACCTACTCCTCCCTTAA-3'
Sonda TaqMan HB14 SEC ID N.º 6
5'-FAM-ACCACCACCCAACACACAATAACAAACACA-BHQ1a-3'

Las soluciones siguientes se pipetearon juntas y se mezclaron según la Tabla 11.

Solución	Concentración de partida	Volumen	Concentración final
Hybprobe Master Mix	10x	2 µl	1x
MgCl ₂	25 mmol/l	1,6 µl	3,000 mmol/l
Mezcla de cebadores	10 µmol/l (cada uno)	1,8 µl	0,900 µmol/l (cada uno)
Sonda TaqMan	10 µmol/l	0,6 µl	0,300 µmol/l (cada una)
Agua		1,5 µl	
ADN convertido con bisulfito		12,5 µl	
Volumen total de reacción		20 µl	

Tabla 11: Preparación de la mezcla de PCR para el ensayo HB14. (Hybprobe Master Mix corresponde a las sondas de hibridación LightCycler FastStart DNA Master (Roche n.º cat. 2 239 272)).

La PCR se realizó en un termociclador LightCycler 2.0 (Roche) en las condiciones especificadas en la Tabla 12.

1	Activación	95°C	10 min
2	Desnaturalización	95°C	15 s
3	Reasociación/elongación y detección	60°C	45 s
4	Ciclación	Las fases 2 a 3 se repitieron 45 veces	
5	Enfriamiento	40°C	30 s

Tabla 12: Condiciones de ciclación de la PCR para el ensayo HB14 con un termociclador LightCycler 2.0 (Roche).

Análisis del sulfito:

El sulfito residual se midió en muestras de ADN convertido con bisulfito y diluido mediante el Sulfite Cell Test (Merck n.º cat.1.14394.0001). Se preparó una curva patrón de sulfito comprendida entre 100 mg/l y 0,78 mg/l de sulfito sódico anhidro (Na_2SO_3 , $M = 126,04 \text{ g/mol}$) en Tris 0,1 mol/l EDTA 0,1 mmol/l. El agente de detección se preparó colocando una microcucharilla gris rasa (en la tapa del frasco SO3-1K) de reactivo en la celda de reacción, se cerró y agitó enérgicamente (o se agitó con suavidad en un vórtex 3 veces durante 5 s) hasta disolver completamente el reactivo.

Las mediciones del sulfito se realizaron en una placa de 96 pocillos. El volumen final fue de 100 µl. A 30 µl de agua depositados en los pocillos de una placa de fondo transparente se añadieron 20 µl de la alícuota de ADN convertido con bisulfito y diluido. Para elaborar los patrones se pipetearon 50 µl de los patrones de sulfito en la placa de fondo transparente y a continuación se añadieron a cada pocillo 50 µl del reactivo-sulfito de Merck. Para las muestras de blanco se añadieron 50 µl de agua a 50 µl del reactivo-sulfito de Merck. La placa se leyó a 412 nm en un lector de placas Spectramax Plus (Molecular Devices). Los datos se analizaron con el software SOFTMax PRO 4.0.

Ejemplo 7. Amplificación genómica completa del ADN tratado con bisulfito.

Ejemplo 7a. Amplificación genómica completa del ADN tratado con bisulfito mediante la ligasa de ADNmc CircLigase.

Se mezclan 15 µl del ADN tratado con bisulfito y purificado del ejemplo 6 con 2 µl de tampón de reacción 10X de CircLigase (Epicenter® Biotechnologies), 1 µl de una solución de ATP 1 mmol/l y 2 µl de ligasa de ADNmc CircLigase 5 U/µl (Epicenter® Biotechnologies). La mezcla de unión se incubó durante 1 h a 60°C, antes de calentarse a 80°C durante 10 min para inactivar la enzima ligasa. Después de calentar a 95°C durante 3 min se almacena en hielo.

Para la amplificación, a 10 µl de mezcla de unión se le añadieron 10 µl de tampón de muestra del kit TempliPhi™ ADN Sequencing Template Amplification Kit / TempliPhi™ 100/500 Amplification Kit (GE Healthcare) y una mezcla recién preparada de 18 µl de tampón de reacción del kit TempliPhi™ y 2 µl de ADN-polimerasa Phi29 del kit TempliPhi™. Después de la incubación durante 16 h a 30°C, la ADN-polimerasa Phi29 se inactiva por calor durante 10 min a 65°C.

La cantidad de ADN convertido con bisulfito y amplificado se puede determinar mediante el ensayo HB14 del modo descrito en el ejemplo 6b. Para ello, 10 µl de la mezcla de la reacción de amplificación inactivada se mezclan con 2,5 µl de agua, y esta mezcla se somete al ensayo HB14. La eficiencia de la amplificación genómica completa del ADN tratado con bisulfito se puede determinar calculando el cociente entre la concentración hallada de ADN convertido con bisulfito después de la amplificación genómica completa y 15 veces la concentración hallada de ADN convertido con bisulfito antes de la amplificación genómica completa (véase ejemplo 6b). El factor de 15 se calculó a partir de la cantidad equivalente de ADN convertido con bisulfito y eluido aplicada para el ensayo HB14 antes de la amplificación genómica completa y la cantidad equivalente de ADN convertido con bisulfito y eluido aplicada para el ensayo HB14 después de la amplificación genómica completa. Si se usan otros volúmenes, un experto en la materia sabe calcular el factor correspondiente.

La cantidad de ADN total se determina como corresponde, pero en lugar del ensayo HB14 se utiliza el ensayo de ADN genómico CFF1 del ejemplo 5. Un experto en la materia sabe cómo ajustar el procedimiento de determinación del ADN convertido con bisulfito para el ensayo de ADN genómico CFF1.

Para verificar que el cociente entre el ADN original metilado y sin metilar no ha cambiado, se lleva a cabo un ensayo que es específico para un patrón de metilación definido. Este ensayo es por ejemplo el ensayo HM 17378.71LC mostrado en el ejemplo 8. En el mismo se analizan cantidades equivalentes de ADN convertido con bisulfito antes y después de la amplificación. En este caso también, un experto en la materia sabe cómo ajustar convenientemente el procedimiento descrito anteriormente para la determinación del cociente de ADN convertido con bisulfito antes y después de la amplificación a fin de determinar el cociente de ADN que representa un patrón de metilación definido antes y después de la amplificación genómica completa.

Ejemplo 7b. Amplificación genómica completa del ADN tratado con bisulfito mediante la utilización de nucleotidiltransferasa terminal.

Visión general:

La amplificación genómica completa del ADN convertido con bisulfito consta de las siguientes etapas:

1. Fragmentación del ADN humano con enzimas de restricción del ADN.
2. Adición de la cola (secuencia de poli-dA) en los extremos 3' de los fragmentos de ADN con la nucleotidiltransferasa terminal (TdT).
3. Conversión de todas las citosinas sin metilar en uracilos mediante el tratamiento con bisulfito y posterior purificación (incluida desulfonación).
4. Amplificación lineal del ADN convertido con bisulfito mediante una reacción de elongación del cebador con cebadores complementarios de la cola unida (cebadores de poli-dT)
5. Cuantificación del ADN resultante mediante una PCR en tiempo real (cantidad total de ADN con el ensayo CFF1, cantidad de ADN convertido con bisulfito con el ensayo HB14)

Realización:

El plan experimental detallado se representa en la Tabla 13. Se llevan a cabo seis reacciones distintas que comprenden la utilización de dos endonucleasas de restricción distintas, *StuI* y *BseRI*, así como los controles respectivos.

N.º reacción/ Etapa	I	II	III	IV	V	VI
Fragmentación	<i>StuI</i>	<i>StuI</i>	<i>BseRI</i>	<i>BseRI</i>	x	x
Adición de la cola	TdT + dATP	TdT + dATP	TdT + dATP	TdT + dATP	TdT + dATP	TdT + dATP
Conversión del ADN	Tratamiento con bisulfito y purificación					
Amplificación	Reacción de elongación del cebador					
Cuantificación	Cuantificación por PCR en tiempo real					

Tabla 13. Plan experimental.

Las diferentes etapas se llevan a cabo en las siguientes condiciones:

1. Fragmentación:

La escisión del ADN genómico humano (Roche) con enzimas de restricción tiene lugar en un volumen total de 40 µl que consiste en: 1 µg de ADN, 4 µl de Tampón NE 2 10x (New England Biolabs) y 5 unidades de las enzimas de restricción *StuI* o *BseRI*, respectivamente. Los controles negativos (reacciones V y VI) no contienen ninguna enzima de restricción. Las reacciones se incuban durante 2 horas a 37°C.

2. Adición de la cola:

La adición de la cola al ADN fragmentado con una secuencia de poli-dA se lleva a cabo con una nucleotidiltransferasa terminal (TdT, New England Biolabs) en presencia de dATP. Los controles negativos no son tratados con TdT. La reacción tiene lugar en un volumen de 50 µl que consiste en 40 µl de la región de fragmentación, 1 µl de tampón NE 4 10x (New England Biolabs), CoCl₂ 0,25 mmol/l, dATP 50 µmol/l (Fermentas) y 2 unidades de TdT (omitidas en los respectivos controles negativos; reacciones II, IV y VI). Las mezclas se incuban durante 30 min a 37°C y finalmente se inactivan calentándolas a 70°C durante 10 min.

3. Conversión del ADN con bisulfito:

Las citosinas sin metilar se convierten en uracilos según las formas de realización y los métodos descritos en la presente memoria. Las mezclas de reacción enteras (cada una 50 µl) de la reacción de adición de las colas son

sometidas al tratamiento con bisulfito y la purificación (incluida la desulfonación). Después de la conversión con bisulfito el ADN se recupera en un volumen de 50 µl.

4. Amplificación lineal:

La amplificación genómica completa del ADN tratado con bisulfito se realiza mediante una reacción de elongación del cebador en un volumen de 50 µl que contiene 25 µl del ADN convertido con bisulfito (como se describe en la etapa 3), 2 U de polimerasa Taq Hotstar (Qiagen), 25 pmol de cebador (dT₂₅), tampón de PCR 1x (Qiagen), 0,2 mmol/l de cada dNTP (Fermentas). La ciclación se realiza con un Mastercycler (Eppendorf) en las condiciones siguientes: 15 min a 95°C y 15 ciclos a 96°C durante 1 min, 45°C durante 1 min y 72°C durante 5 min.

5. Cuantificación con PCR en tiempo real:

El ADN convertido con bisulfito y amplificado (1 µl de cada uno) es sometido a una PCR cuantitativa en tiempo real PCR (ensayo GSTP1) con un termociclador LightCycler 2.0 (Roche). Las reacciones se realizan en un volumen de 20 µl con un kit LightCycler FastStart ADN Master Hybridization (Roche) que contiene MgCl₂ 4 mmol/l, 0,15 µmol/l de cada sonda de detección (SEC ID N.º 7 5'-GTTTAAGGTTAAGTTGGGTGTTTGTA-Fluo-3' y SEC ID N.º 8 5'-Red640-TTTTGTTTGTGTTAGGTTGTTTTTAGG-fosfato-3' y 0,3 µmol/l de cada cebador (cebador directo SEC ID N.º 9 5'-GGAGTGGAGGAAATTGAGAT-3', cebador inverso SEC ID N.º 10 5'-CCACACAACAAATACTCAAAAC-3'). Se realizan 40 ciclos a 95°C durante 10 s, 56°C durante 30 s y 72°C durante 10 s después de la incubación inicial durante 10 min a 95°C. La cuantificación se realiza por triplicado.

Resultados:

Cabe esperar que ninguna de las reacciones sin TdT (reacciones II, IV y VI) muestre amplificación significativa del ADN convertido con bisulfito debido a la ausencia de la cola que actúa como sitio de unión del cebador. Debido a la pérdida de aproximadamente el 20% durante el tratamiento con bisulfito y la posterior purificación, estas reacciones dan como resultado 0,8 µg de ADN convertido con bisulfito. Es de esperar una pequeña amplificación en la mezcla de reacción V que no contiene ninguna endonucleasa de restricción pero sí transferasa terminal. Ello es consecuencia de la fragmentación al azar del ADN genómico humano utilizado, porque tales fragmentos actúan como moldes para los TdT y pueden ser amplificados. Suponiendo una pérdida del 20% durante la conversión con bisulfito y una eficiencia del 90% de la amplificación lineal en cada ciclo de amplificación, se espera que las mezclas de reacción I y III rindan 10,8 µg de ADN convertido con bisulfito y amplificado.

Discusión:

Se supone que el método de amplificación genómica completa mediante la transferasa terminal resulta conveniente para amplificar el ADN convertido con bisulfito hasta aproximadamente 10 veces. Es posible conseguir una mayor amplificación aumentando el número de ciclos de amplificación durante las reacciones de elongación del cebador, pero si se utilizan cebadores poli-dT tal resultado resulta limitado por la presencia de varios lugares poli-dA y poli-dT dentro del genoma humano tratado con bisulfito. Estos lugares podrían ser amplificados de manera exponencial (PCR), obstaculizando la amplificación lineal. Esta limitación se puede sortear utilizando dCTP metilado en 5' (d5meCTP) para la reacción de adición de la cola y un cebador de poli-G en la reacción de amplificación. Como las colas de poli-5meC generadas no resultan afectadas por la reacción de bisulfito, se convierten en los únicos lugares a los que pueden unirse los cebadores poli-G en todo el genoma humano tratado con bisulfito, y de ese modo se puede prescindir de la amplificación con PCR. Este método también se puede refinar de otra manera utilizando un cebador que contenga las bases residuales del sitio de reconocimiento de la endonucleasa de restricción. Esto redundaría en una mayor especificidad del cebador, evitando una amplificación PCR indeseada.

Ejemplo 8. Cuantificación del patrón de metilación definido mediante el ensayo HM 17378.71LC.

Para la cuantificación de un patrón de metilación definido se usó un ensayo adecuado para medir dicho patrón. Un ejemplo de este tipo de ensayo es el HM 17378.71LC.

Se sometieron 12,5 µl del ADN convertido con bisulfito y eluido del ejemplo 6 al ensayo HM 17378.71LC. Los 12,5 µl de ADN eluido del ejemplo 6 equivalen a 1,9 ml de la muestra remota original indicada en el ejemplo 2. Como

alternativa también se puede usar una cantidad equivalente del ADN convertido con bisulfito y amplificado del ejemplo 7. El ensayo se llevó a cabo por triplicado.

Ensayo HM 17378.71LC

- 5 Sonda Taqman Fluor. LC HM 17378.71LC SEC ID N.º 11
 5'- GTtCGAAATGAT111ATtAGtTGC-FL-3'
 Sonda TaqMan LC 640 Red HM 17378.71LC SEC ID N.º 12
 5'- LCred640-CGTTGAtCGCGGGGTtC-PH-3'
 Cebador directo HM 17378.71LC SEC ID N.º 13
 10 5' - GtAGtAGtAGtttAGtAtttAttTT-3'
 Cebador inverso HM 17378.71LC SEC ID N.º 14
 5'- CCCACCAaCCATCATaT-3'
 Oligonucleótido de bloqueo HM 17378.71LC SEC ID N.º 15
 5' - CATCATaTCAaACCCCAaTCAACACACaC-INV-3' '

15 (INV representa un extremo 3' invertido)

Una letra mayúscula pequeña representa una citosina convertida con bisulfito en la secuencia de dichos cebadores, sondas y en el oligonucleótido de bloqueo.

20 Las siguientes soluciones se pipetearon juntas y se mezclaron según la Tabla 14.

Solución	Concentración de partida	Volumen	Concentración final
Hybprobe Master Mix	10x	2 µl	1x
MgCl ₂	25 mmol/l	2 µl	3,50 mmol/l
Mezcla de cebadores	10 µmol/l (cada uno)	0,6 µl	0,30 µmol/l (cada uno)
Oligonucleótido de bloqueo	100 µmol/l	0,8 µl	4,00 µmol/l
Mezcla de sonda de detección	10 µmol/l (cada una)	0,3 µl	0,15 µmol/l (cada una)
Agua	--	1,8 µl	--
ADN convertido con bisulfito	--	12,5 µl	--
Volumen total de reacción		20 µl	

25 Tabla 14: Preparación de la mezcla de PCR para el ensayo HM 17378.71LC. (Hybprobe Master Mix corresponde a las sondas de hibridación LightCycler FastStart DNA Master Hybprobe Master Mix (Roche n.º cat. 2 239 272)).

La PCR se llevó a cabo con un termociclador LightCycler 2.0 (Roche) en las condiciones especificadas en la Tabla 15.

1	Activación	95°C	10 min
2	Desnaturalización	95°C	10 s
3	Reasociación y detección	56°C	30 s
4	Extensión	72°C	10 s
5	Ciclación	Las fases 2 a 4 se repitieron 50 veces	
6	Enfriamiento	40°C	30 s

30 Tabla 15: Condiciones de ciclación de la PCR para el ensayo HM 17378.71LC con un termociclador LightCycler 2.0 (Roche).

Ejemplo 9. Realización de un estudio:

Visión general:

5 Se recogieron 895 muestras de plasma conforme al ejemplo 1a y se analizaron del modo siguiente: en dos estudios se efectuó un flujo de trabajo que abarca los ejemplos 2 a 6 y 8. El ADN se aisló de muestras de plasma, se agrupó y se concentró antes de ser tratado con bisulfito y purificado. A continuación, el ADN convertido con bisulfito se cuantificó con el ensayo HB14 descrito en el ejemplo 6. El patrón de metilación definido por el ensayo HM17378.71LC se cuantificó (véase el ejemplo 7). El límite de detección del 90% correspondiente al ensayo HM17278.71LC se cifró en 21 pg mediante una serie de dilución de ADN metilado (tratado con SSS1) en un fondo de 50 ng de ADN sanguíneo (ADN genómico humano Roche). En el primer estudio se añadió una cantidad de ADN equivalente a 1,6 ml de plasma a cada reacción de PCR y cada muestra de plasma se procesó por duplicado. En el segundo estudio se añadió una cantidad de ADN equivalente a 1,9 ml de plasma a cada reacción de PCR y se procesaron por triplicado. El flujo de trabajo completo se llevó a cabo en formato de lote en paralelo. En cada etapa del proceso se procesaron muestras de control positivo y negativo para determinar las fluctuaciones por lote de procesamiento. Con la fase de calibración del proceso se calibraron las etapas de extracción con MagNaPure y de tratamiento con bisulfito, y aquellos lotes cuyas concentraciones de ADN control quedaron fuera del intervalo de 3 desviaciones estándar fueron excluidos del análisis.

Realización:

Todas las muestras remotas se procesaron en el plazo de tres días. El primer día se aisló y concentró el ADN. El segundo, se trató el ADN con bisulfito y se purificó. Por último, el tercer día se realizó un ensayo HM 17378.71LC por triplicado, un ensayo de ADN genómico CFF1, y un ensayo HB14 para una muestra respectiva. Cada día i) se llevaron a cabo 12 ejecuciones MagNA Pure LC con 4 aparatos funcionando tres veces en paralelo y las placas con el ADN eluido se concentraron en pares; ii) tres lotes de muestras fueron sometidos al tratamiento con bisulfito y después a la purificación; cada lote comprendía 20 muestras del ADN aislado con MagNA Pure más un control positivo y un control negativo (en total 66 muestras, incluidos los controles); y iii) se realizaron cinco series de ejecuciones de la PCR en tiempo real con un termociclador LightCycler (1 serie para el ensayo de ADN genómico CFF1, 1 serie para el ensayo HB14, y 3 series para el ensayo HM 17378.71LC).

Análisis estadístico:

A título de ejemplo, en el primer estudio la mediana de recuperación del ADN en los controles positivos fue de 2,8 ng/ml para el aislamiento del ADN. La mediana de recuperación del ADN correspondiente a 895 muestras de plasma fue de 3,86 ng/ml, con un intervalo de 0 a 1.086 ng/ml. En el tratamiento con bisulfito y la purificación, la mediana de recuperación del ADN correspondiente a 887 muestras de plasma fue de 3,32 ng/ml, y el intervalo de 0 a 1.109 ng/ml.

El primer estudio se diseñó para determinar el método óptimo de agregación de los duplicados y el valor umbral (valor de corte) para la clasificación como positivo/negativo. El segundo estudio se diseñó para validar el ensayo y la regla de clasificación utilizando un conjunto de muestras distinto. El número de muestras se prefijó de antemano para proporcionar intervalos de confianza aceptables. En el primer estudio cada muestra de plasma se sometió por duplicado al análisis del patrón de metilación definido por el ensayo HM17378.71LC. Una muestra se consideró positiva si ambas réplicas eran positivas. La sensibilidad y la especificidad de los datos derivados del segundo estudio se calcularon aplicando el valor umbral (valor de corte) determinado el primer estudio. Debido a la alta especificidad del marcador (valor umbral o de corte del ensayo HM17378.71LC) hallada en el primer estudio, se determinó un umbral cualitativo de 0 pg de ADN que comprende el patrón de metilación definido por el ensayo HM17378.71LC. En el segundo estudio la muestra de plasma de cada paciente se analizó por triplicado. Una muestra se consideró positiva si por lo menos 2 de las 3 réplicas eran positivas. Las curvas de amplificación fueron analizadas automáticamente así como por dos revisores independientes para validar las curvas verdaderas. Las discrepancias fueron resueltas por un tercer revisor independiente.

Resultados:

La sensibilidad se determinó primero en el primer estudio y después en el segundo estudio. Los resultados de ambos estudios se resumen en las tablas 16 y 17. La sensibilidad en ambos estudios osciló entre el 50 y el 57%

para la detección del cáncer colorrectal. Estos resultados indican que el marcador definido mediante el ensayo HM17378.71LC y el valor umbral seleccionado (valor de corte) es también muy específico (94-95%) en los individuos asintomáticos mayores de 50 años. La especificidad también resultó alta (92%) cuando se incluyeron pacientes con trastornos tales como gastritis, artritis, infección respiratoria y cáncer en fase inicial de otro tipo distinto al cáncer colorrectal. El marcador demostró que podía detectar el cáncer colorrectal con una sensibilidad similar independientemente del estadio de progresión o de la ubicación de la lesión en el colon, a diferencia de las pruebas fecales tales como FOBT e iFOBT que demuestran tener una menor sensibilidad para el cáncer colorrectal proximal y el cáncer en estadios tempranos.

- 5
- 10 El cumplimiento del paciente y el rendimiento de las actuales estrategias de cribado limitan la eficacia de las pruebas disponibles en el mercado actualmente. Un sencillo análisis de sangre para detectar precozmente el cáncer colorrectal seguido por una colonoscopia en los individuos positivos tiene posibilidades de convertirse en una herramienta muy eficaz para reducir la mortalidad por esta enfermedad.

Grupo	N.º de positivos/total de analizados	% [IC 95%]
CCR	72/127	57 [47,66]
CCR estadio I	3/11	27 [6,61]
CCR estadio II	4/15	27 [8,55]
CCR estadio III	35/59	59 [46,77]
CCR estadio IV	27/36	75 [58,88]
Sanos	10/233	4 [2,8]
Todos los controles	28/365	8 [-]

Tabla 16: Resultados del primer estudio.

Grupo	N.º de positivos/total de analizados	% [IC 95%]
CCR	104/209	50 [43,57]
CCR estadio I	24/51	47 [33,62]
CCR estadio II	29/65	45 [32,57]
CCR estadio III	30/52	58 [43,71]
CCR estadio IV	14/26	54 [33,73]
Sanos	5/83	6 [2,14]
Todos los controles	19/239	8 [5,12]

15

Tabla 17: Resultados del segundo estudio.

Listado de secuencias

	<110> Epigenomics AG; Ballhause, Matthias; Berlin, Kurt; devos, Theo; Dietrich, Dimo; Liebenberg, Volker; Lofton-Day cathy; Lograsso, Joe; Maas, Jennifer; Model, Fabian; Schuster, Matthias; Sledziewski, Andrew; Tetzner, Reimo	
5	<120> MÉTODO PARA PROPORCIONAR FRAGMENTOS DE ADN DERIVADOS DE UNA MUESTRA REMOTA	
	<130> 47675-184	
10	<140>	
	<141> 2006.04.17	
	<150> US 60/672,242	
	<151> 2005.04.15	
15	<150> US 60/676,997	
	<151> 2005.05.02	
	<150> US 60/697,521	
20	<151> 2005.07.08	
	<150> US 60/723,602	
	<151> 2005.10.04	
25	<150> US 60/780,248	
	<151> 2006.03.08	
	<160> 15	
30	<210> 1	
	<211> 25	
	<212> DNA	
	<213> Homo Sapiens	
35	<400> 1	
	taagagtaat aatggatgga tgatg	25
	<210> 2	
40	<211> 17	
	<212> DNA	
	<213> Homo Sapiens	
	<400> 2	
45	cctcccatct cccttc	17
	<210> 3	
	<211> 25	
50	<212> DNA	
	<213> Homo sapiens	
	<400> 3	
55	atggatgaag aaagaaagga tgagt	25
	<210> 4	
	<211> 25	
	<212> DNA	
60	<213> Homo Sapiens	
	<400> 4	
	tggtgatgga ggaggttag taagt	25
65	<210> 5	

ES 2 382 746 T3

	<211> 27 <212> DNA <213> Homo Sapiens	
5	<400> 5 aaccaataaa acctactcct cccttaa	27
	<210> 6 <211> 30 <212> DNA <213> Homo sapiens	
10	<400> 6 accaccaccc aacacacaat acaaacaca	30
15	<210> 7 <211> 27 <212> DNA <213> Homo Sapiens	
20	<400> 7 gtttaagggt aagttgggt gtttga	27
25	<210> 8 <211> 29 <212> DNA <213> Homo Sapiens	
30	<400> 8 ttttgtttg tgtaggtg ttttagg	29
35	<210> 9 <211> 20 <212> DNA <213> Homo Sapiens	
40	<400> 9 ggagtggagg aaattgagat	20
45	<210> 10 <211> 22 <212> DNA <213> Homo Sapiens	
50	<400> 10 ccacacaaca aataactcaaa ac	22
55	<210> 11 <211> 25 <212> DNA <213> Homo Sapiens	
60	<400> 11 gttcgaaatg attttattta gttgc	25
65	<210> 12 <211> 17 <212> DNA <213> Homo Sapiens	
	<400> 12	

	cgttgatgc ggggttc	17
5	<210> 13 <211> 26 <212> DNA <213> Homo Sapiens	
10	<400> 13 gtagtagtta gtttagtatt tatttt	26
15	<210> 14 <211> 17 <212> DNA <213> Homo Sapiens	
20	<400> 14 cccaccaacc atcatat	17
25	<210> 15 <211> 32 <212> DNA <213> Homo Sapiens	
30	<400> 15 catcatatca aaccccacaa tcaacacaca ac	32

REIVINDICACIONES

1. Método para determinar el estado de metilación de por lo menos una citosina, un patrón de metilación, o ambos en el ADN de una muestra de sangre, una muestra de plasma, una muestra de suero o una muestra de orina de un individuo, que comprende:

- (a) proporcionar dicha muestra que comprende ADN;
- (b) aislar el ADN de dicha muestra;
- (c) tratar el ADN aislado con un reactivo bisulfito en presencia de un captador de radicales; y
- (d) determinar el estado de metilación de por lo menos una citosina en el ADN de dicha muestra, estando cada citosina localizada en una posición definida y/o de un patrón de metilación en el ADN de dicha muestra, con una reacción de amplificación a base de polimerasa y/o un ensayo basado en una amplificación.

en el que dicho ADN tratado con bisulfito de la etapa (c) es sometido directamente a la etapa (d) sin desulfonación previa y en el que la desulfonación se produce durante el aumento inicial de temperatura de la reacción de amplificación.

2. Método según la reivindicación 1, en el que el ADN de dicha muestra está caracterizado porque menos del 5%, menos del 3%, menos del 1%, o menos del 0,1% del ADN procede de un cáncer de próstata o de un cáncer de un órgano del tubo digestivo.

3. Método según la reivindicación 1, en el que dicha muestra está caracterizada porque comprende menos de 60 ng de ADN en 1 ml de muestra o menos de 10 ng de ADN en 1 ml de muestra.

4. Método según la reivindicación 1, en el que la pérdida de ADN es minimizada mediante por lo menos un método seleccionado de entre el grupo constituido por: un método de aislamiento del ADN caracterizado porque presenta unos rendimientos elevados del ADN; una precisión elevada del pipeteo; una reutilización del dispositivo de pipeteo; y una reutilización del dispositivo que ha estado en contacto con el ADN.

5. Método según la reivindicación 1, en el que dicha muestra es plasma, y proporcionar la muestra de plasma comprende una o más de las etapas siguientes:

- (a) obtener sangre de un individuo;
- (b) añadir EDTA (ácido etilendiaminotetraacético) a la sangre que comprende una mezcla suave;
- (d) transferir el plasma a un nuevo recipiente;
- (e) centrifugar el plasma;
- (f) transferir el plasma recentrifugado a un nuevo recipiente;
- (g) enfriar una muestra que comprende plasma;
- (h) congelar, almacenar o transportar una muestra que comprende plasma; y
- (i) proporcionar dicha muestra a partir de la obtención de sangre de un individuo hasta la congelación del plasma recentrifugado correspondiente dentro de un periodo de aproximadamente 8 horas.

6. Método según la reivindicación 1, en el que dicha muestra es orina y proporcionar la muestra de orina comprende una o más de las etapas siguientes:

- (a) realizar una palpación de la próstata, un masaje prostático o ambos desde la mitad de la próstata hasta el lado izquierdo de la próstata, hasta el lado derecho de la próstata o ambos;
- (b) recoger la orina miccionada;
- (c) añadir EDTA a la orina; en el que el EDTA presenta un pH de aproximadamente 5,0, aproximadamente 6,0, aproximadamente 7,0, aproximadamente 7,5, aproximadamente 8,0, aproximadamente 8,5, aproximadamente 9,0, o aproximadamente 10;
- (d) enfriar la muestra que comprende orina;
- (e) congelar, almacenar o transportar la muestra que comprende orina; y
- (f) proporcionar la muestra de orina desde la recogida de la orina miccionada hasta la congelación de la mezcla de orina-EDTA correspondiente dentro de un periodo de aproximadamente 120 min.

7. Método según la reivindicación 1, en el que dicha muestra es dividida en diferentes submuestras después de proporcionar dicha muestra, y/o en el que dicha muestra o por lo menos un componente de dicha muestra se concentra después de proporcionar dicha muestra.
- 5 8. Método según la reivindicación 7, en el que la concentración comprende ultrafiltración, reducción del volumen, o ambos.
9. Método según la reivindicación 1, en el que el aislamiento del ADN comprende una más de las etapas siguientes: tratar dicha muestra con una proteasa; tratar dicha muestra con por lo menos una solución o reactivo degradante de
10 proteínas; poner en contacto el ADN de dicha muestra con un dispositivo purificador de ADN; lavar el ADN con el dispositivo purificador de ADN; y recuperar el ADN del dispositivo purificador de ADN.
10. Método según la reivindicación 1, en el que tratar el ADN con un reactivo bisulfito comprende las etapas de:
15 mezclar aproximadamente 10 hasta aproximadamente 250 µl de una solución que comprende ADN con aproximadamente 45 a aproximadamente 750 µl de solución de bisulfito, presentando la solución de bisulfito un pH en el intervalo de aproximadamente 5,45 a aproximadamente 5,50 que comprende aproximadamente 4,83 a aproximadamente 4,93 mol/l de hidrogenosulfito; añadir aproximadamente 5 a aproximadamente 500 µl de una
20 solución de captador de radicales orgánico, comprendiendo la solución un solvente orgánico y aproximadamente 10 a aproximadamente 750 mmol/l de ácido β-hidroxi-2,5,7,8-tetrametil-cromano-2-carboxílico; y aplicar un protocolo de temperatura durante aproximadamente 2 a aproximadamente 18 h, en el que la reacción se lleva a cabo en un intervalo de temperatura de aproximadamente 0 a aproximadamente 80°C con aproximadamente 2 a
25 aproximadamente 5 aumentos adicionales de la temperatura, en cada caso durante aproximadamente 0,5 a aproximadamente 10 min, hasta una temperatura de aproximadamente 85 a aproximadamente 100°C que incluye un aumento inicial de la temperatura hasta una temperatura de aproximadamente 85 a aproximadamente 100°C.
11. Método según la reivindicación 1, en el que la determinación del estado de metilación de por lo menos una citosina, un patrón de metilación, o de ambos permite el diagnóstico de, proporcionar un pronóstico de, predecir una
30 respuesta al tratamiento de, determinar una predisposición a, predecir una predisposición a, determinar una progresión de, predecir una progresión de, graduar, estadificar un estado, clasificar un estado, o caracterizar una enfermedad proliferativa o un cáncer de un órgano del tubo digestivo, preferentemente de un cáncer colorrectal, o de un cáncer de próstata.

FLUJO DE TRABAJO DE LA MUESTRA REMOTA

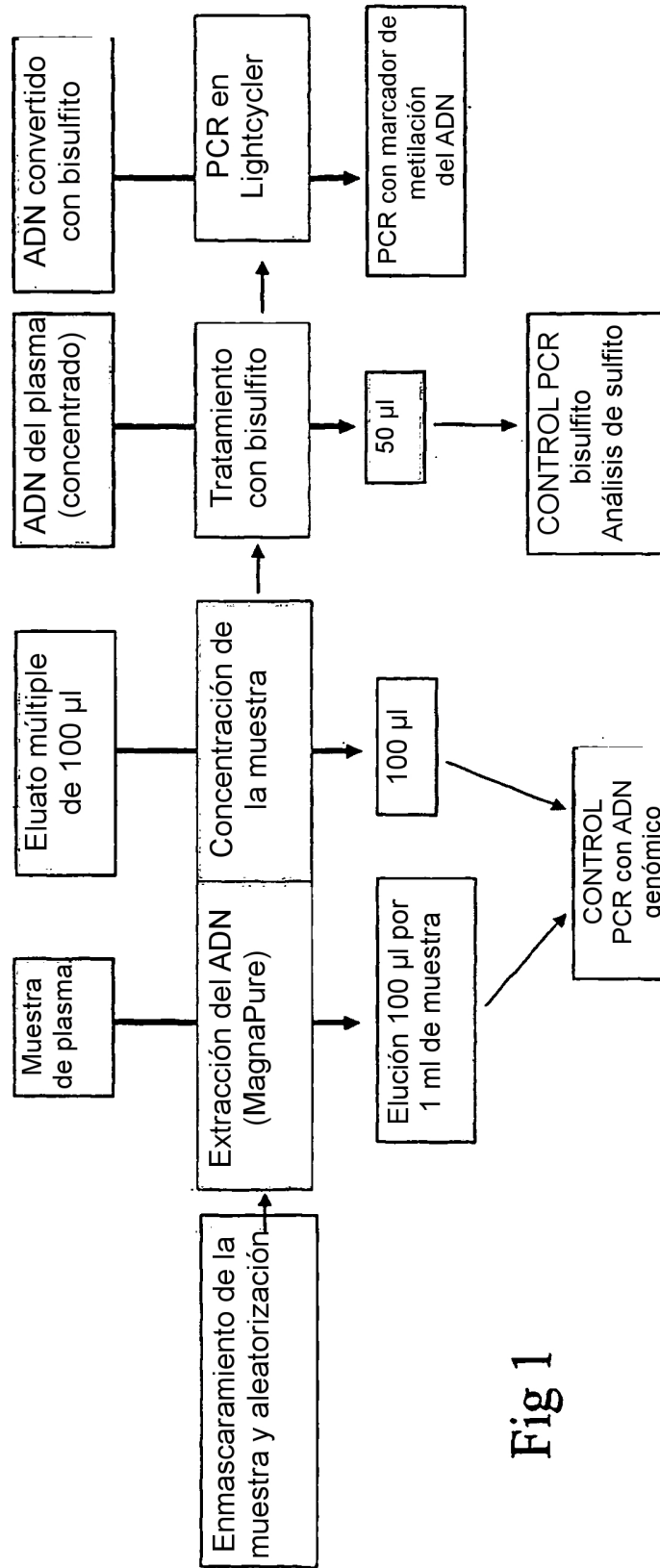
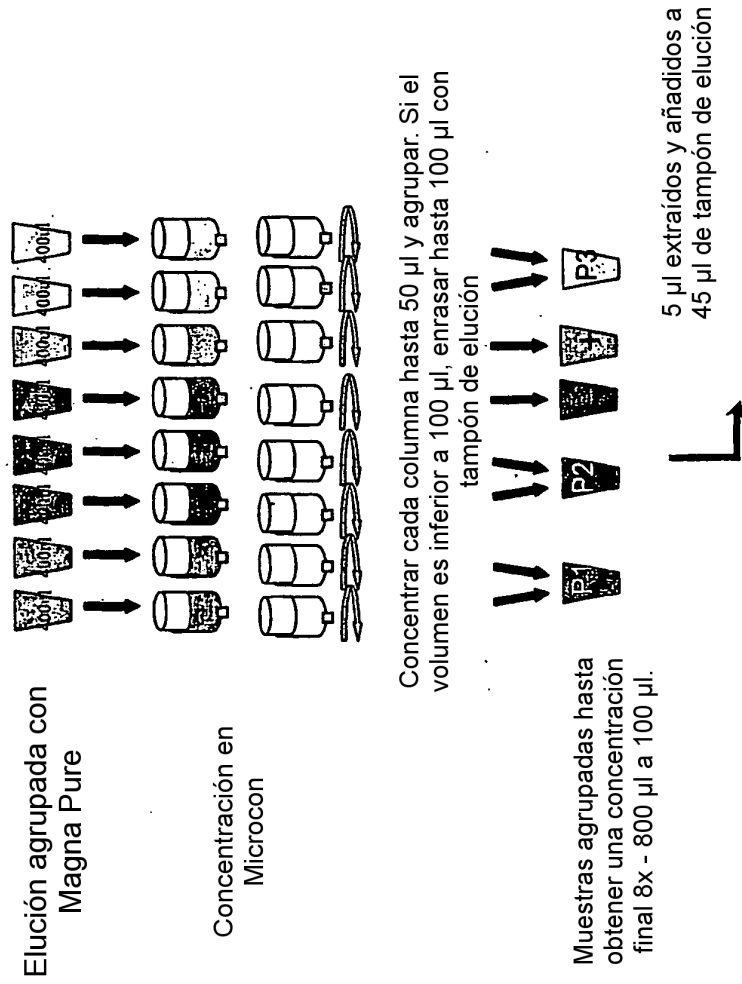


Fig 1

Figura 2 - Agrupamiento y concentración



95 µl para el tratamiento con bisulfito