

19



OFICINA ESPAÑOLA DE
PATENTES Y MARCAS

ESPAÑA



11 Número de publicación: **2 382 780**

51 Int. Cl.:
C12Q 1/68 (2006.01)
C12P 19/34 (2006.01)
C07H 21/02 (2006.01)
C07H 21/04 (2006.01)

12

TRADUCCIÓN DE PATENTE EUROPEA

T3

- 96 Número de solicitud europea: **04796212 .1**
96 Fecha de presentación: **21.10.2004**
97 Número de publicación de la solicitud: **1689887**
97 Fecha de publicación de la solicitud: **16.08.2006**

54 Título: **Procedimientos para la determinación cuantitativa de la densidad de metilación en un locus de ADN**

30 Prioridad:
21.10.2003 US 513426 P
12.04.2004 US 561563 P
12.04.2004 US 561721 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:
ORION GENOMICS, LLC
4041 FOREST PARK AVENUE
ST. LOUIS, MO 63108, US

72 Inventor/es:
JEDDELOH, Jeffrey A. y
LAKEY, Nathan D.

74 Agente/Representante:
Ungría López, Javier

ES 2 382 780 T3

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

DESCRIPCIÓN

Procedimientos para la determinación cuantitativa de la densidad de metilación en un locus de ADN.

Referencia cruzada a las solicitudes de patente relacionadas

- 5 La presente solicitud reivindica beneficio de prioridad a la solicitud de patente provisional de EE.UU. nº 60/561.721 presentada el 12 de abril de 2004, la solicitud de patente provisional de EE.UU. nº 60/561.563 presentada el 12 de abril de 2004 y la solicitud de patente provisional de EE.UU. nº 60/513.426 presentada el 21 de octubre 2003.

Antecedentes de la invención

- 10 Las células cancerosas humanas normalmente contienen genomas somáticamente alterados caracterizados por mutación, amplificación o delección de genes críticos. Además, el molde de ADN de células cancerosas humanas frecuentemente muestra cambios somáticos en la metilación de ADN. Véanse, por ejemplo, E. R. Fearon y col., *Cell* 61:759 (1990); P. A. Jones y col., *Cancer Res.* 46:461 (1986); R. Holliday, *Science* 238:163 (1987); A. De Bustros y col., *Proc. Natl. Acad. Sci. USA* 85:5693 (1988); P. A. Jones y col., *Adv. Cancer Res.* 54:1 (1990); S. B. Baylin y col., *Cancer Cells* 3:383 (1991); M. Makos y col., *Proc. Natl. Acad. Sci. USA* 89:1929 (1992); N. Ohtani-Fujita y col., *Oncogene* 8:1063 (1993).

- 15 Las ADN metilasas transfieren grupos metilo del donante de metilo universal S-adenosil-metionina a sitios específicos sobre el ADN. Se han atribuido varias funciones biológicas a las bases metiladas en ADN. La función biológica más establecida es la protección del ADN de la digestión por enzimas de restricción relacionadas. Este fenómeno de modificación de la restricción sólo se ha observado hasta ahora en bacterias.

- 20 Sin embargo, las células de mamífero poseen una metilasa diferente que metila exclusivamente residuos de citosina sobre el ADN que son vecinos de 5' de guanina (CpG). Se ha mostrado por varias líneas de evidencia que esta metilación desempeña una función en la actividad génica, diferenciación de células, tumorigénesis, inactivación del cromosoma X, huella genómica y otros procesos biológicos importantes (Razin, A., H., y Riggs, R. D. eds. *DNA Methylation Biochemistry and Biological Significance*, Springer Verlag, N.Y., 1984).

- 25 En células eucariotas, la metilación de residuos de citosina que están inmediatamente 5' con respecto a una guanosina se produce predominantemente en locus pobres en CG (Bird, A., *Nature* 321:209 (1986)). A diferencia, regiones discretas de dinucleótidos CG llamadas islas de CpG siguen sin estar metiladas en células normales, excepto durante la inactivación del cromosoma X y huella específica parental (Li y col., *Nature* 366:362 (1993)) en la que la metilación de regiones reguladoras en 5' puede conducir a represión de la transcripción. Por ejemplo, se ha demostrado la metilación *de novo* del gen Rb en una pequeña fracción de retinoblastomas (Sakai y col., *Am. J. Hum. Genet.*, 48:880 (1991)), y un análisis más detallado del gen VHL mostró metilación anormal en un subconjunto de carcinomas de células renales esporádicas (Herman y col., *Proc. Natl. Acad. Sci. USA*, 91:9700 (1994)). La expresión de un gen supresor de tumores también puede abolirse por la metilación de ADN *de novo* de una isla de CpG en 5' normalmente sin metilar. Véase, por ejemplo, Issa y col., *Nature Genet.* 7:536 (1994); Merlo y col., *Nature Med.* 1:686 (1995); Herman y col., *Cancer Res.*, 56:722 (1996); Graff y col., *Cancer Res.*, 55:5195 (1995); Herman y col., *Cancer Res.* 55:4525 (1995).

- 40 Pham Tho y col. (2003) *American J. Physiol.*, 285(2):R962-R970 se refiere a insuficiencia uteroplacentaria aumentando la apoptosis y alterando la metilación del gen p53 en el riñón de rata con IUGR nacida a término. Chu y col. (2002) *J. Urol.*, 167(4):1854-1858 se refieren al uso de reacción en cadena de la polimerasa cuantitativa en tiempo real para detectar hipermetilación de las islas de CpG en la región promotora que flanquea el gen Gstp 1 para diagnosticar carcinoma de próstata. Chotai y col. (1998) *J. Med. Gen.*, 35(6): 472-475 se refieren a una prueba de PCR rápida para el diagnóstico molecular diferencial de síndromes de Prader-Willi y Angelman.

- 45 La identificación de los cambios genéticos más tempranos en tumorigénesis es un objetivo principal en la investigación del cáncer molecular. Los enfoques de diagnóstico basados en la identificación de estos cambios pueden permitir la implementación de estrategias de detección tempranas, estadificación del tumor y enfoques terapéuticos novedosos que eligen como diana estos cambios tempranos, conduciendo a tratamiento contra el cáncer más eficaz. La presente invención trata estos y otros problemas.

Breve resumen de la invención

La presente invención proporciona un procedimiento para cuantificar la densidad de metilación en un locus de ADN genómico en comparación con un control, procedimiento que comprende

- 50 digerir parcialmente ADN genómico con McrBC en el que dicha digestión no se lleva a cabo hasta completitud; cuantificar copias intactas del locus por amplificación cuantitativa, produciéndose así un producto de amplificación; y comparar la cantidad de copias intactas del locus con un valor de control que representa la cantidad de metilación de ADN de control, cuantificándose así la densidad de metilación en el locus en comparación con la densidad de metilación del ADN de control.

En algunas realizaciones, la cantidad del producto amplificado se compara con una curva patrón.

La etapa de amplificación puede comprender hibridar dos cebadores de oligonucleótidos con ADN que flanquea el locus para producir un producto de amplificación correspondiente al locus sin escindir de ADN genómico entre los cebadores.

- 5 En algunas realizaciones, el valor de control representa la cantidad de un producto de amplificación de una muestra de ADN que tiene un número conocido o predicho de nucleótidos metilados.

La enzima de restricción es *McrBC*.

- 10 En algunas realizaciones, el procedimiento comprende además poner en contacto el ADN genómico con un agente que modifica citosina sin metilar antes de la etapa de amplificación, y al menos uno de los dos cebadores de oligonucleótidos distingue entre ADN sin metilar y metilado modificado en el ADN genómico.

En algunas realizaciones, el agente es bisulfito de sodio.

En algunas realizaciones, el valor de control se genera poniendo en contacto ADN que comprende un locus de control con *McrBC*; amplificando el locus de control; y determinando la cantidad de producto amplificado. En algunas realizaciones, el locus de control es conocido o se predice que está sin metilar.

- 15 En algunas realizaciones, el valor de control comprende un número conocido de nucleótidos metilados. El ADN genómico puede ser de un ser humano. El procedimiento puede realizarse para detectar la presencia o ausencia de células cancerosas en un sujeto.

La etapa de cuantificación puede comprender detectar una sonda que se hibrida con el producto de amplificación. La sonda puede comprender un resto fluorescente detectable.

- 20 La etapa de cuantificación puede comprender la detección directa de copias intactas de locus con captura híbrida.

El ADN puede ser de un animal. El animal puede ser un ser humano.

El ADN genómico puede ser de un tejido seleccionado del grupo que consiste en tejido de cerebro, tejido de colon, tejido urogenital, tejido de pulmón, tejido renal, tejido hematopoyético, tejido de mama, tejido del timo, tejido de testículos, tejido de ovario, tejido uterino y sangre.

- 25 El ADN genómico puede ser de un organismo seleccionado del grupo que consiste en plantas, hongos y bacterias.

La presente invención también proporciona procedimientos de cálculo de la densidad de metilación relativa para un locus diana en una muestra de ADN. Por tanto, la presente invención proporciona un procedimiento de cálculo de la densidad de metilación relativa para un locus diana en una muestra de ADN en comparación con un control, procedimiento que comprende

- 30 i. digerir parcialmente la muestra de ADN con *McrBC* en la que dicha digestión no se lleva a cabo hasta completitud;
- ii. amplificar cuantitativamente copias intactas del locus en la muestra de ADN después de las etapas de puesta en contacto;
- iii. identificar el valor umbral de ciclos (Ct) para la porción amplificada a partir de la muestra de ADN; y,
- 35 iv. determinar la densidad de metilación relativa para el locus diana calculando la diferencia (ACt) entre el Ct de la muestra de ADN y un valor Ct de control en el que $2^{\Delta Ct}$ es proporcional a la densidad de metilación relativa entre la muestra de ADN y el control.

El Ct de control puede calcularse por etapas que comprenden

- 40 i. poner en contacto una muestra de ADN de control con una enzima de restricción dependiente de la metilación en condiciones que permitan que al menos algunas copias de posibles sitios de escisión por enzimas de restricción en el locus sigan estando sin escindir para obtener una población de ácidos nucleicos en la que al menos algunas copias metiladas del locus están fragmentadas, o

- 45 poner en contacto la muestra de ADN de control con una enzima de restricción sensible a la metilación en condiciones que permitan que al menos algunas copias de posibles sitios de escisión por enzimas de restricción en el locus sigan estando sin escindir para obtener una población de ácidos nucleicos en la que al menos algunas copias sin metilar del locus están fragmentadas;

- ii. amplificar copias intactas del locus en la muestra de ADN de control después de las etapas de puesta en contacto; e

iii. identificar el valor umbral de ciclos (Ct) para la porción amplificada a partir de la muestra de ADN de control.

5 La etapa de amplificación puede comprender hibridar dos cebadores de oligonucleótidos con ADN que flanquea el locus para producir un producto de amplificación correspondiente al locus sin escindir de ADN genómico entre los cebadores.

También se desvelan en este documento kits que pueden usarse para cuantificar la densidad de metilación promedio en un locus de ADN genómico. Por tanto, un kit para cuantificar la densidad de metilación promedio en un locus de ADN genómico puede comprender

McrBC;

10 una molécula de ADN de control que comprende un número predeterminado de nucleótidos metilados; y cebadores de oligonucleótidos de control que se hibridan con la molécula de ADN de control.

15 El kit puede comprender adicionalmente cebadores de oligonucleótidos diana que se hibridan con un locus predeterminado de ADN genómico humano. Al menos un cebador de oligonucleótidos diana puede distinguir entre ADN sin metilar y metilado modificado en ADN genómico humano. El kit puede comprender una pluralidad de moléculas de ADN que comprenden diferentes números predeterminados de nucleótidos metilados. El kit puede comprender adicionalmente reactivos suficientes para soportar la actividad de la enzima de restricción. El kit puede comprender adicionalmente una ADN polimerasa termoestable. El kit puede comprender adicionalmente un agente que modifica citosina sin metilar. El kit puede comprender adicionalmente oligonucleótido detectablemente marcado. El kit puede comprender reactivos de captura híbrida.

20 **Breve descripción de los dibujos**

La Figura 1 ilustra los resultados de la amplificación de ADN a diferentes diluciones de metilado:sin metilar.

La Figura 2 ilustra la capacidad de *McrBC* para distinguir entre ADN a diferentes diluciones de metilado:sin metilar. Las flechas en la parte inferior de la figura indican ΔCt aproximado entre muestras cortadas con *HhaI* y doblemente cortadas con *HhaI/McrBC*.

25 La Figura 3 ilustra el análisis de ADN a una dilución 1:2000 de metilado:sin metilar.

La Figura 4 ilustra una representación del cambio en el umbral de ciclos en función de la dilución de ADN metilado/sin metilar.

La Figura 5 ilustra resultados de diferentes diluciones de metilado:sin metilar.

La Figura 6 ilustra una progresión de la densidad de metilación hipotética en el desarrollo de enfermedad.

30 La Figura 7 ilustra la restricción de ADN de *McrBC*.

La Figura 8 ilustra los resultados de amplificación de diferentes diluciones de *McrBC* que restringen ADN escasamente metilado.

La Figura 9 ilustra los resultados de amplificación de diferentes diluciones de *McrBC* que restringen ADN densamente metilado.

35 La Figura 10 ilustra el uso de diferentes diluciones de enzimas de restricción para determinar la resolución óptima entre ADN con diferentes densidades de metilación.

La Figura 11 ilustra qué datos se obtienen cuando el estado de metilación de sólo nucleótidos particulares se detecta en una progresión de enfermedad hipotética.

40 La Figura 12 ilustra qué datos se obtienen cuando la densidad de metilación promedio de un locus se detecta en una progresión de enfermedad hipotética.

La Figura 13 ilustra la comparación de diferentes digestiones con enzimas de restricción para proporcionar análisis adicional de metilación de ADN.

45 La Figura 14 ilustra el análisis de detección de la metilación basada en *McrBC*/amplificación y comparación con secuenciación con bisulfito. Los datos se generaron usando tratamiento con bisulfito, digestión con *McrBC* y luego amplificación.

La Figura 15 representa una parte del promotor p16 (SEC ID N°: 1) metilado *in vitro* con *M.Sss I*.

La Figura 16 ilustra los datos que demuestran que las enzimas de restricción dependientes de la metilación (es

decir, *McrBC*) y sensibles a la metilación (es decir, *Aci I*) distinguen diferentes densidades de metilación en un locus de ADN.

5 La Figura 17 ilustra los datos del umbral de ciclos que demuestran que las enzimas de restricción dependientes de la metilación (es decir, *McrBC*) y sensibles a la metilación (es decir, *Aci I*) distinguen diferentes densidades de metilación en un locus de ADN.

10 La Figura 18 ilustra un mapa de restricción consenso de genes kafirina. Los locus de restricción relevantes están indicados verticalmente y los números indican las escalas de distancias en pares de bases. Cada secuencia codificante se representa como la flecha sombreada de azul y la región ensayada se indica por la barra negra. Los círculos representan sitios que no están presentes en cualquier gen de kafirina, y el color representa el número de genes que no comparten el sitio. El círculo naranja (el sitio *HhaI* más hacia 5') está conservado en 9 de los 11 genes kafirina, y el círculo rojo (el sitio *PstI* más hacia 3') está presente en 10 de los 11.

La Figura 19 ilustra la metilación de CG heterogénea y la metilación de CNG homogénea de once genes kafirina.

Definiciones

15 Un "fragmento" de ADN se refiere a una molécula de ADN intacta de tamaño variable que puede ser un cromosoma entero o fragmentos más pequeños del mismo.

"Metilación" se refiere a la metilación en las posiciones C⁵ o N⁴ de citosina, la posición N⁶ de adenosina u otros tipos de metilación de ácidos nucleicos.

20 Una "enzima de restricción dependiente de la metilación" se refiere a una enzima de restricción que escinde en o próxima a una secuencia de reconocimiento metilada, pero no escinde en o próxima a la misma secuencia cuando la secuencia de reconocimiento no está metilada. Las enzimas de restricción dependientes de la metilación pueden reconocer, por ejemplo, secuencias específicas que comprenden una citosina metilada o una adenosina metilada. Enzimas de restricción dependientes de la metilación incluyen aquellas que cortan en una secuencia de reconocimiento metilada (por ejemplo, *DpnI*) y enzimas que cortan en una secuencia que no está en la secuencia de reconocimiento (por ejemplo, *McrBC*). Por ejemplo, *McrBC* requiere dos medio sitios. Cada medio sitio debe ser una purina seguida de 5-metil-citosina (R5mC) y los dos medio sitios no deben estar más próximos de 20 pares de bases y no más lejos de 4000 pares de bases entre sí (N20-4000). *McrBC* corta generalmente próximo a un medio sitio o el otro, pero las posiciones de escisión están normalmente distribuidas sobre varios pares de bases aproximadamente 32 pares de bases a partir de la base metilada. Enzimas de restricción dependientes de la metilación a modo de ejemplo incluyen, por ejemplo, *McrBC* (véase, por ejemplo, la patente de EE.UU. n° 5.405.760), *McrA*, *McrA* y *Dpn I*.

30 Un experto en la materia apreciará que homólogos y ortólogos de las enzimas de restricción descritas en este documento también son adecuados para su uso en la presente invención.

Una "enzima de restricción insensible a la metilación" se refiere a una enzima de restricción que corta ADN independientemente del estado de metilación de la base de interés (A o C) en o próxima a la secuencia de reconocimiento.

35 Una "enzima de restricción detectora de la metilación" se refiere a una enzima de restricción cuya actividad cambia en respuesta a la metilación de su secuencia de reconocimiento.

40 Una "enzima de restricción sensible a la metilación" se refiere a una enzima de restricción (por ejemplo, *PstI*) que escinde en o en la proximidad a una secuencia de reconocimiento sin metilar, pero no escinden en o en la proximidad a la misma secuencia cuando la secuencia de reconocimiento está metilada. Enzimas de restricción sensibles a 5'-metil-citosina a modo de ejemplo incluyen, por ejemplo, *Aat II*, *Aci I*, *Acl I*, *Age I*, *Alu I*, *Asc I*, *Ase I*, *AsiS I*, *Bbe I*, *BsaA I*, *BsaH I*, *BsiE I*, *BsN I*, *BsrF I*, *BssH II*, *BssK I*, *BstB I*, *BstN I*, *BstU I*, *Cla I*, *Eae I*, *Eag I*, *Fau I*, *Fse I*, *Hha I*, *HinP1 I*, *HinC II*, *Hpa II*, *Hpy99 I*, *HpyCH4 IV*, *Kas I*, *mlu I*, *MapA1 I*, *Msp I*, *Nae I*, *Nar I*, *Not I*, *Pml I*, *Pst I*, *Pvu I*, *Rsr II*, *Sac II*, *Sap I*, *Sau3A I*, *Sfi I*, *Sfo I*, *SgrA I*, *Sma I*, *SnaB I*, *Tsc I*, *Xm I* o *Zra I*. Véase, por ejemplo, McClelland, M. y col., *Nucleic Acids Res.* 22(17):3640-59 (1994) y <http://rebase.neb.com>. Enzimas de restricción sensibles a metil-adenosina a modo de ejemplo incluyen, por ejemplo, *Mbol*.

Como se usa en este documento, una "secuencia de reconocimiento" sólo se refiere a una secuencia de ácidos nucleicos primaria y no refleja el estado de metilación de la secuencia.

La “densidad de metilación” se refiere al número de residuos metilados en un locus de ADN dado dividido entre el número total de nucleótidos en la misma secuencia de ADN que pueden estar metilados. La densidad de metilación puede determinarse para citosinas metiladas o adenosinas metiladas.

5 La escisión de ADN “en condiciones que permitan que al menos algunas copias de posibles sitios de escisión por enzimas de restricción en el locus sigan estando sin escindir” se refiere a cualquier combinación de condiciones de reacción, concentración de enzima de restricción y enzima y/o ADN que hacen que al menos algo del ADN que comprende un posible sitio de escisión de la enzima de restricción siga sin cortar. Por ejemplo, una digestión parcial del ADN (por ejemplo, limitando la cantidad de enzima o la cantidad de tiempo de la digestión) permite que algunos posibles sitios de escisión por enzimas de restricción en el locus sigan sin cortar. Alternativamente, una digestión completa usando una enzima de restricción tal como *McrBC* hará que algunos posibles sitios de escisión por enzimas de restricción en el locus sigan sin cortar debido a que la enzima no siempre corta entre los dos medio sitios de reconocimiento, dejando así al menos algunas copias sin escindir de un locus en una población de secuencias en las que el locus se define por los dos medio sitios de reconocimiento. Un “posible sitio de escisión por enzima de restricción” se refiere a una secuencia que puede escindir una enzima de restricción (es decir, que comprende la secuencia de nucleótidos apropiada y el estado de metilación) cuando reconoce la secuencia de reconocimiento de la enzima, que puede ser igual o diferente del sitio de escisión.

20 “Amplificar” ADN se refiere a cualquier reacción química, que incluye enzimática, que produce un aumento del número de copias de una secuencia de ácidos nucleicos de molde. Las reacciones de amplificación incluyen reacción en cadena de la polimerasa (PCR) y reacción en cadena de la ligasa (LCR) (véanse las patentes de EE.UU. 4.683.195 y 4.683.202; PCR Protocols: A Guide to Methods and Applications (Innis y col., eds, 1990)), amplificación por desplazamiento de hebras (SDA) (Walker y col. *Nucleic Acids Res.* 20(7):1691-6 (1992); Walker PCR Methods Appl 3(1):1-6 (1993)), amplificación mediada por transcripción (Phyffer y col., *J. Clin. Microbiol.* 34:834-841 (1996); Vuorinen y col., *J. Clin. Microbiol.* 33: 1856-1859 (1995)), amplificación basada en secuencias de ácidos nucleicos (NASBA) (Compton, *Nature* 350 (6313): 91-2 (1991), amplificación por círculo rodante (RCA) (Lisby, *Mol. Biotechnol.* 12 (1): 75-99 (1999)); Hatch y col., *Genet. Anal.* 15 (2): 35-40 (1999)); amplificación de señales de ADN ramificado (ADNr) (véase, por ejemplo, Iqbal y col., *Mol. Cell Probes* 13 (4): 315-320 (1999)); y amplificación lineal.

30 Una “digestión parcial” de ADN como se usa en este documento se refiere a poner en contacto ADN con una enzima de restricción bajo condiciones de reacción apropiadas de forma que la enzima de restricción escinda algunos (por ejemplo, menos de aproximadamente el 10%, 20%, 30%, 40%, 50%, 60%, 70%, 80% o el 90%), pero no todos, los posibles sitios de escisión para esa enzima de restricción particular en el ADN. En particular, la digestión parcial se refiere a la digestión que no se lleva a cabo hasta completitud. Una digestión parcial de la secuencia puede lograrse, por ejemplo, poniendo en contacto ADN con una enzima de restricción activa durante un periodo de tiempo más corto que el que es necesario para lograr una digestión completa y luego terminar la reacción, o bajo otras condiciones de reacción alteradas que permitan la cantidad deseada de digestión parcial. “Locus posibles” son generalmente secuencias de reconocimiento de enzimas, pero también incluyen situaciones en las que una enzima escinde en una secuencia distinta de la secuencia de reconocimiento (por ejemplo, *McrBC*).

40 Condiciones que incluyen el tiempo, tampones y otros reactivos necesarios para digestiones completas son normalmente proporcionadas por los fabricantes de enzimas de restricción. Aquellos expertos en la materia reconocerán que la calidad de la muestra de ADN puede prevenir la digestión completa.

45 “Isoesquizómeros” se refieren a enzimas de restricción que reconocen la misma secuencia de nucleótidos. Como se usa en esta definición, la “misma secuencia de nucleótidos” no pretende diferenciar entre secuencias metiladas y sin metilar. Por tanto, un “componente isoescuizomérico” de una enzima de restricción dependiente de la metilación o sensible a la metilación es una enzima de restricción que reconoce la misma secuencia de reconocimiento que la enzima de restricción dependiente de la metilación o sensible a la metilación independientemente de si la secuencia de reconocimiento está metilada o no.

“Un agente que modifica citosina sin metilar” se refiere a cualquier agente que altera la composición química de citosina sin metilar, pero que no cambia la composición química de citosina metilada. Un ejemplo de un agente tal es bisulfito de sodio.

50 “Cebadores que distinguen entre ADN metilado y sin metilar” se refiere a oligonucleótidos que:

- (i) se hibridan (por ejemplo, son al menos parcialmente complementarios) con una secuencia que representa una secuencia de ADN metilada después de la conversión con bisulfito, pero no se hibridan con una secuencia que representa la secuencia sin metilar idéntica después de la conversión con bisulfito; o
- (ii) se hibridan con una secuencia que representa una secuencia sin metilar de ADN después de la conversión con bisulfito, pero no se hibridan con una secuencia que representa la secuencia metilada idéntica después de la conversión con bisulfito.

Como se describe en este documento, cebadores que distinguen entre secuencias metiladas y sin metilar se diseñan generalmente para hibridarse con una secuencia que se produciría si el ADN se tratara con un agente (tal como bisulfito de sodio) que modifica los nucleótidos sin metilar, pero no los nucleótidos metilados o viceversa. Por ejemplo, cuando el bisulfito de sodio se pone en contacto con ADN, la citosina sin metilar se convierte en uracilo, mientras que la citosina metilada no se modifica. Como las formas de uracilo se complementan con adenina, un cebador que se une a la secuencia sin metilar contendría adeninas en localizaciones en las que las adeninas formarían complementos con las citosinas modificadas (es decir, uracilos). Similarmente, si se deseó un cebador que se hibrida con secuencias que contienen citosina metiladas, el cebador contendría guaninas en las que formaría complementos con las citosinas metiladas. Por tanto, las secuencias que “representan” ADN metilado o sin metilar incluyen ADN que resulta de tratamiento con bisulfito de sodio del ADN.

Un “locus” como se usa en este documento se refiere a una secuencia diana dentro de una población de ácidos nucleicos (por ejemplo, un genoma). Si una única copia de la secuencia diana está presente en el genoma, entonces “locus” se referirá a un único locus. Si múltiples copias de la secuencia diana están presentes en el genoma, entonces “locus” se referirá a todos los locus que contienen la secuencia diana en el genoma.

15 Descripción detallada de la invención

I. Introducción

La presente invención proporciona procedimientos rápidos y eficientes para determinar la presencia de metilación y la densidad de metilación en regiones de ADN genómico. La determinación de alteraciones en la densidad de metilación puede ser útil para proporcionar diagnósticos y pronósticos para diversas enfermedades que incluyen diversos cánceres. Aunque los procedimientos de la invención también proporcionan la detección de acontecimientos de metilación específicos, los presentes procedimientos son particularmente notables debido a que no están limitados por una predicción o expectativa de que el estado de metilación de un nucleótido particular sea determinante de un fenotipo. En casos en los que la densidad de metilación (es decir, la cantidad de nucleótidos que están metilados en una longitud particular de una secuencia de ácidos nucleicos), en vez de la presencia o ausencia de un nucleótido metilado particular, module la expresión génica, y en los que la densidad de metilación de un locus refleje la progresión de enfermedad a lo largo de un continuo, los presentes procedimientos son particularmente útiles.

II. Cuantificación de la cantidad relativa de metilación en ADN genómico

La cantidad de metilación de un locus de ADN puede determinarse proporcionando una muestra de ADN genómico que comprende el locus, escindiendo el ADN con una enzima de restricción que es (*Mcr* BC) y luego cuantificando la cantidad de ADN intacto o cuantificando la cantidad de ADN de corte en los locus de ADN de interés. La cantidad de ADN intacto o de corte dependerá de la cantidad inicial de ADN genómico que contiene el locus, la cantidad de metilación en el locus y el número (es decir, la fracción) de nucleótidos en el locus que están metilados en el ADN genómico. La cantidad de metilación en un locus de ADN puede determinarse comparando la cantidad de ADN intacto o ADN de corte con un valor de control que representa la cantidad de ADN intacto o ADN de corte en una muestra de ADN similarmente tratada. Como se trata más adelante, el valor de control puede representar un número conocido o predicho de nucleótidos metilados. Alternativamente, el valor de control puede representar la cantidad de ADN intacto o de corte del mismo locus en otra célula (por ejemplo, normal, no enferma) o un segundo locus.

Como se ha tratado en detalle más adelante, la densidad de metilación promedio de un locus puede determinarse usando (*Mcr*BC) en condiciones que permitan que al menos algunas copias de posibles sitios de escisión por enzimas de restricción en el locus sigan estando sin escindir y posteriormente cuantificando las copias intactas restantes y comparando la cantidad con un control. Si la enzima de restricción se pone en contacto con copias de un locus de ADN en condiciones que permitan que al menos algunas copias de posibles sitios de escisión por enzimas de restricción en el locus sigan estando sin escindir, entonces el ADN intacto restante será inversamente proporcional a la densidad de metilación y, por tanto, puede compararse con un control para determinar la densidad de metilación relativa del locus en la muestra. Según la presente invención, el ADN genómico es parcialmente digerido con *Mcr*BC no llevándose a cabo la digestión hasta la completitud.

A. Digestión con enzimas de restricción

Las digestiones parciales con enzima de restricción pueden usarse para proporcionar información referente a la densidad de metilación dentro de un locus de ADN particular.

i. *Mcr*BC

El mecanismo de corte de ADN por *Mcr*BC se produce del siguiente modo. Un complejo de ocho subunidades de *Mcr*B se une a cada uno de los dos medio sitios de reconocimiento (purina-metilC representado como (A o G)mC). Véase la Figura 7. Estos complejos reclutan entonces una subunidad de *Mcr*C para los medio sitios respectivos y empiezan a translocar el ADN mediado por hidrólisis de GTP. Cuando dos complejos unidos por *Mcr*BC se ponen en contacto entre sí, se forma un complejo doble y se produce la restricción. El corte no se producirá generalmente si los dos medio sitios están más próximos de 20 pb y se ha observado la restricción resultante de los medio sitios tan

lejos de 4 kb de uno a otro, que es raro. La restricción puede producirse a ~32 pb a la izquierda o derecha de cualquier medio sitio unido dando cuatro localizaciones de sitios de corte posibles: ~32 pb 5' del primer medio sitio, ~32 pb 3' del primer medio sitio, ~32 pb 5' del segundo medio sitio, y ~32 pb 3' del segundo medio sitio. Por tanto, es posible que los dos medio sitios existan dentro de un locus definido por cebadores de PCR y que la escisión se produzca fuera del locus. También es posible que los dos medio sitios existan fuera del locus y que se produzca un corte dentro del locus. También es posible que exista un sitio en el locus y que exista otro fuera del locus y que se produzca un corte tanto dentro como fuera del locus. Por tanto, cuanto más metilados estén los medio sitios que están "en la proximidad" del locus (tanto si están literalmente entre los cebadores de amplificación como en la secuencia flanqueante vecina), más probablemente se observará un corto dentro del locus para una concentración dada de *McrBC*. Por consiguiente, el número de copias de un locus metilado que se escinde por *McrBC* en una digestión parcial será proporcional a la densidad de nucleótidos metilados.

ii. Digestiones parciales

La cantidad de escisión con una enzima de restricción sensible a la metilación o dependiente de la metilación en una digestión parcial (es decir, incompleta) refleja la densidad de metilación promedio dentro del locus de ADN en la muestra. Por ejemplo, si un locus tiene una mayor densidad de metilación que un control, entonces una digestión parcial usando una enzima de restricción dependiente de la metilación escindirán más frecuentemente copias del locus. Similarmenete, si un locus tiene una menor densidad de metilación que un control, entonces una digestión parcial usando una enzima de restricción dependiente de la metilación escindirán copias del locus menos frecuentemente dentro del locus debido a que están presentes menos sitios de reconocimiento. Alternativamente, si se usa una enzima de restricción sensible a la metilación, menos copias de un locus con una mayor densidad metilada se escinden menos y, por tanto, más hebras de ADN intacto que contienen el locus. En cada uno de estos casos, la digestión de la muestra de ADN en cuestión se compara con un valor de control tal como aquellos tratados anteriormente para digestiones completas. Alternativamente, la cantidad de ADN intacto después de la digestión puede compararse con una segunda muestra para determinar la densidad de metilación relativa entre las muestras.

Puede ser útil probar una variedad de condiciones (por ejemplo, tiempo de restricción, concentración de enzimas, tampones diferentes u otras condiciones que afectan la restricción) para identificar el conjunto óptimo de condiciones para resolver diferencias leves o grandes en la densidad de metilación entre dos o más muestras. Las condiciones pueden determinarse para cada muestra analizada o pueden determinarse inicialmente y luego las mismas condiciones pueden aplicarse a varias muestras diferentes.

iii. Muestras de ADN

Puede usarse ADN que puede obtenerse de cualquier muestra biológica, por ejemplo, de células, tejidos, secreciones y/o fluidos de un organismo (por ejemplo, un animal, planta, hongo o procarionta). Las muestras pueden ser frescas, congeladas, preservadas en fijador (por ejemplo, alcohol, formaldehído, parafina o PreServeCyto™) o diluidas en un tampón. Las muestras biológicas incluyen, por ejemplo, piel, sangre o una fracción de los mismos, tejidos, biopsias (de, por ejemplo, pulmón, colon, mama, próstata, cuello del útero, hígado, riñón, cerebro, estómago, esófago, útero, testículo, piel, pelo, hueso, riñón, corazón, vesícula biliar, vejiga y similares), fluidos y secreciones corporales (por ejemplo, sangre, orina, moco, esputo, saliva, especímenes de citología cervicouterina, médula, heces, sudor, aliento condensado y similares). Las muestras biológicas también incluyen hojas, tallos, raíces, semillas, pétalos, polen, esporas, sombreros de champiñones y savia.

Las digestiones anteriormente descritas pueden usarse para analizar una muestra de ADN en la que todas las copias de un locus de ADN genómico tienen un patrón de metilación idéntico. En otras realizaciones, la muestra de ADN es una mezcla de ADN que comprende alelos de un locus de ADN en el que algunos alelos están más metilados que otros. En algunas realizaciones, una muestra de ADN contiene ADN de dos o más tipos diferentes de células, en el que cada tipo de célula tiene una densidad de metilación diferente en un locus particular. Por ejemplo, en algunos locus, las células neoplásicas tienen diferentes densidades de metilación en comparación con células normales. Si un tejido, fluido o secreción corporal contiene ADN de células tanto normales como neoplásicas, entonces la muestra de ADN del tejido, fluido o secreción corporal comprenderá una mezcla heterogénea de alelos diferencialmente metilados. En este caso, en un locus dado, un conjunto de alelos dentro del ADN (por ejemplo, aquellos derivados de células neoplásicas en la muestra) tendrá una densidad de metilación diferente de la de otros conjunto de alelos (por ejemplo, aquellos derivados de células normales).

En muestras mixtas (por ejemplo, en biopsias que comprenden célula sana y enferma) puede ser útil basar los resultados en una población de ácidos nucleicos en la muestra (por ejemplo, de células enfermas) en vez de determinar la densidad de metilación promedio a través de ADN de todas las células en la muestra. En algunas realizaciones en las que una primera población de ADN en la muestra tiene baja metilación o no tiene y la segunda población de ADN en la muestra tiene más metilación que la primera población, la densidad en la segunda población puede determinarse escindiendo la muestra con una o más enzimas de restricción sensibles a la metilación (generalmente cortar hasta "completitud"), degradándose así la primera población, a la vez que se deja la segunda población sustancialmente intacta. Por tanto, la muestra también puede ponerse en contacto con una enzima de restricción dependiente de la metilación (usando *McrBC*) y el ADN intacto restante puede amplificarse, determinándose así la densidad de metilación en la segunda población. La densidad de metilación de la primera

población puede determinarse similarmente poniendo en contacto la muestra con una o más enzimas de restricción dependientes de la metilación. (generalmente cortar hasta "completitud") y poniendo en contacto la muestra con una sensible a la metilación bajo condiciones de digestión parcial. En este caso, el ADN amplificado representará la densidad de metilación de la primera población.

5 B. Amplificación para detectar ADN intacto

La presencia y cantidad de ADN escindido por las enzimas de restricción puede determinarse amplificando el locus tras la digestión. Usando técnicas de amplificación (por ejemplo, reacción en cadena de la polimerasa (PCR)) que requieren la presencia de una hebra de ADN intacto para la amplificación puede determinarse la presencia y cantidad de ADN sin cortar restante. Por ejemplo, pueden diseñarse reacciones de PCR en las que los cebadores de amplificación flanquean un locus de interés particular. La amplificación se produce cuando el locus que comprende los dos cebadores sigue estando intacto tras una digestión con restricción. Si se conoce la cantidad de ADN total e intacto, la cantidad de ADN escindido puede determinarse. Como la escisión del ADN depende del estado de metilación del ADN, el ADN intacto y escindido representa diferentes estados de metilación.

La amplificación de un locus de ADN usando reacciones es muy conocida (véanse las patentes de EE.UU. 4.683.195 y 4.683.202; PCR Protocols: A Guide to Methods and Applications (Innis y col., eds, 1990)). Normalmente, la PCR se usa para amplificar moldes de ADN. Sin embargo, se han descrito procedimientos alternativos de amplificación y también pueden emplearse, siempre y cuando los procedimientos alternativos amplifiquen ADN intacto a un mayor grado que los procedimientos amplifican ADN escindido.

El ADN amplificado mediante los procedimientos de la invención puede evaluarse adicionalmente, detectarse, clonarse, secuenciarse y similares, tanto en disolución como después de la unión a un soporte sólido, mediante cualquier procedimiento normalmente aplicado a la detección de una secuencia de ADN específica tal como PCR, restricción con oligómeros (Saiki y col., *Bio/Technology* 3:1008-1012 (1985)), análisis con sondas de oligonucleótidos específicos de alelo (ASO) (Conner y col., *Proc. Natl. Acad. Sci. USA* 80:278 (1983)), ensayos de ligación de oligonucleótidos (OLAs) (Landegren y col., *Science* 241:1077, (1988)) y similares. Se han revisado técnicas moleculares para el análisis de ADN (Landegren y col., *Science* 242:229-237 (1988)).

Los procedimientos de amplificación cuantitativa (por ejemplo, PCR cuantitativa o amplificación lineal cuantitativa) pueden usarse para cuantificar la cantidad de ADN intacto dentro de un locus flanqueado por cebadores de amplificación tras la digestión con restricción. Los procedimientos de amplificación cuantitativa se desvelan en, por ejemplo, las patentes de EE.UU. nº 6.180.349; 6.033.854; y 5.972.602, además de en, por ejemplo, Gibson y col., *Genome Research* 6:995-1001 (1996); DeGraves y col., *Biotechniques* 34(1):106-10, 112-5 (2003); Deiman B y col., *Mol Biotechnol.* 20(2):163-79 (2002). Las amplificaciones pueden monitorizarse en "tiempo real".

En general, la amplificación cuantitativa se basa en la monitorización de la señal (por ejemplo, fluorescencia de una sonda) que representa copias del molde en ciclos de una reacción de amplificación (por ejemplo, PCR). En los ciclos iniciales de la PCR se observa una señal muy baja debido a que la cantidad del amplicón formado no soporta una salida de señal medible del ensayo. Después de los ciclos iniciales, como la cantidad de amplicón formado aumenta, la intensidad de señal aumenta a un nivel medible y alcanza una meseta en ciclos posteriores cuando la PCR entra en una fase no logarítmica. Mediante una representación de la intensidad de señal frente al número de ciclos, el ciclo específico al que se obtiene una señal medible a partir de la reacción de PCR puede deducirse y usarse para calcular la cantidad de diana antes del inicio de la PCR. El número de ciclos específicos que se determina por este procedimiento se denomina normalmente en lo sucesivo el umbral de ciclos (Ct). Procedimientos a modo de ejemplo se describen en, por ejemplo, Heid y col. *Genome Methods* 6:986-94 (1996) con referencia a sondas de hidrólisis.

Un procedimiento para la detección de productos de amplificación es el ensayo de PCR por "hidrólisis" con 5'-3' exonucleasa (también denominado en lo sucesivo el ensayo TaqMan™) (patentes de EE.UU. nº 5.210.015 y 5.487.972; Holland y col., *Proc. Natl. Acad. Sci. USA* 88: 7276-7280 (1991); Lee y col., *Nucleic Acids Res.* 21: 3761-3766 (1993)). Este ensayo detecta la acumulación de producto de PCR no específico por hibridación y escisión de una sonda fluorogénica doblemente marcada (la sonda "TaqMan™") durante la reacción de amplificación. La sonda fluorogénica consiste en un oligonucleótido marcado con tanto un colorante indicador fluorescente como un colorante extintor de la fluorescencia. Durante la PCR, esta sonda se escinde por la actividad de la 5'-exonucleasa de ADN polimerasa si, y sólo si, se hibrida con el segmento que se amplifica. La escisión de la sonda genera un aumento en la intensidad de fluorescencia del colorante indicador.

Otro procedimiento de detección de productos de amplificación que se basa en el uso de transferencia de energía es el procedimiento de "sondas de balizamiento" descrito por Tyagi y Kramer (*Nature Biotech.* 14:303-309 (1996)), que también es el objeto de las patentes de EE.UU. nº 5.119.801 y 5.312.728. Este procedimiento emplea sondas de hibridación de oligonucleótidos que pueden formar estructuras de horquilla. En un extremo de la sonda de hibridación (tanto el extremo 5' como 3') hay un fluoróforo donante, y en el otro extremo un resto aceptor. En el caso del procedimiento de Tyagi y Kramer, este resto aceptor es un extintor de la fluorescencia, es decir, el aceptor absorbe energía liberada por el donante, pero luego no fluoresce por sí mismo. Por tanto, si el balizamiento está en la conformación abierta, la fluorescencia del fluoróforo donante es detectable, mientras que cuando el balizamiento está en la conformación de horquilla (cerrada), la fluorescencia del fluoróforo donante se inactiva. Si se emplea en

PCR, la sonda de balizamiento molecular, que se hibrida con una de las hebras del producto de PCR, está en la conformación abierta y la fluorescencia se detecta, y las sondas que siguen estando sin hibridar no fluorescerán (Tyagi y Kramer, *Nature Biotechnol.* 14: 303-306 (1996)). Como resultado, la cantidad de fluorescencia aumentará a medida que aumenta la cantidad de producto de PCR y, por tanto, puede usarse como medida del progreso de la PCR. Aquellos expertos en la materia reconocerán que también están disponibles otros procedimientos de amplificación cuantitativa.

También se conocen diversas otras técnicas para realizar la amplificación cuantitativa de un ácido nucleico. Por ejemplo, algunas metodologías emplean uno o más oligonucleótidos de sonda que están estructurados de forma que se genere un cambio en la fluorescencia cuando el (los) oligonucleótido(s) se hibrida(n) con un ácido nucleico diana. Por ejemplo, un procedimiento tal implica un enfoque de fluoróforo dual que explota la transferencia de energía por resonancia de fluorescencia (FRET), por ejemplo, sondas de hibridación LightCycler™, en las que dos sondas de oligonucleótidos se hibridan con el amplicón. Los oligonucleótidos se diseñan para hibridarse en una orientación de cabeza a cola con los fluoróforos separados a una distancia que es compatible con la transferencia de energía eficiente. Otros ejemplos de oligonucleótidos marcados que están estructurados para emitir una señal cuando se unen con un ácido nucleico o se incorporan en un producto de extensión incluyen: sondas Scorpions™ (por ejemplo, Whitcombe y col., *Nature Biotechnology* 17:804-807, 1999, y la patente de EE.UU. nº 6.326.145), sondas Sunrise™ (o Amplifluor™) (por ejemplo, Nazarenko y col., *Nuc. Acids Res.* 25:2516-2521, 1997, y la patente de EE.UU. nº 6.117.635), y sondas que forman una estructura secundaria que produce señal reducida sin un extintor de la fluorescencia y que emite señal elevada cuando se hibrida con una diana (por ejemplo, Lux probes™).

En otras realizaciones puede usarse la intercalación de agentes que producen una señal cuando se intercalan en ADN bicatenario. Agentes a modo de ejemplo incluyen SYBR GREEN™ y SYBR GOLD™. Como estos agentes no son específicos de molde, se supone que la señal se genera basándose en la amplificación específica del molde. Esto puede confirmarse monitorizando la señal en función de la temperatura debido a que el punto de fusión de las secuencias molde será generalmente mucho mayor que la de, por ejemplo, los dímeros de cebadores, etc.

25 C. Captura híbrida

En algunas realizaciones pueden usarse ensayos de captura híbrida de ácidos nucleicos para detectar la presencia y cantidad de ADN escindido por las enzimas de restricción. Este procedimiento puede usarse con amplificación previa del ADN. Tras las digestiones con restricción, las sondas de ARN que se hibridan específicamente con secuencias de ADN de interés se combinan con el ADN para formar híbridos de ARN:ADN. Entonces, los anticuerpos que se unen a híbridos de ARN:ADN se usan para detectar la presencia de los híbridos y, por tanto, la presencia y cantidad de ADN sin cortar.

Los fragmentos de ADN que están restringidos en una ventana de secuencia que es complementaria a la sonda de ARN se hibridan menos eficientemente con la zona de ARN que los fragmentos de ADN que siguen intactos en la ventana de secuencia que se monitoriza. La cantidad de hibridación permite cuantificar ADN intacto, y la cantidad de metilación de ADN puede deducirse directamente a partir de la cantidad de ADN intacto de diferentes tratamientos con enzima de restricción (es decir, tratamientos con enzima de restricción sensible a la metilación y/o dependiente de la metilación).

Los procedimientos de detección de híbridos de ARN:ADN usando anticuerpos se conocen en la técnica y se describen en, por ejemplo, Van Der Pol y col., *J. Clin. Microbiol.* 40(10): 3558 (2002); Federschneider y col., *Am J. Obstet. Gynecol.* 191(3):757 (2004); Pretet y col., *J. Clin. Virol.* 31(2): 140-7 (2004); Giovannelli y col., *J. Clin. Microbiol.* 42(8):3861. (2004); Masumoto y col., *Gynecol. Oncol.* 94(2):509-14 (2004); Nonogaki y col., *Acta Cytol.* 48(4):514 (2004); Negri y col., *Am. J. Clin. Pathol.* 122(1):90 (2004); Sarian y col., *Gynecol. Oncol.* 94(1):181 (2004); Oliveira y col., *Diagn. Cytopathol.* 31 (1):19 (2004); Rowe y col., *Diagn. Cytopathol.* 30(6):426 (2004); Clavel y col., *Br. J. Cancer* 90(9):1803-8 (2004); Schiller y col., *Am. J. Clin. Pathol.* 121(4):537 (2004); Arbyn y col., *J. Natl. Cancer Inst.* 96(4):280 (2004); Syrjanen y col., *J. Clin. Microbiol.* 2004 Feb;42(2):505 (2004); Lin y col., *J. Clin. Microbiol.* 42(1):366 (2004); Guyot y col., *BMC Infect. Dis.* 25; 3(1):23 (2003); Kim y col., *Gynecol. Oncol.* 89(2):210-7 (2003); Negri y col., *Ami J Surg Pathol.* 27(2):187 (2003); Vince y col., *J. Clin. Virol. Suppl* 3:5109 (2002); Poljak y col., *J. Clin. Virol. Suppl* 3:589 (2002). En algunos casos, los anticuerpos se marcan con una marca detectable (por ejemplo, una marca enzimática, un isótopo o una marca fluorescente) para facilitar la detección. Alternativamente, el complejo anticuerpo:ácido nucleico puede ponerse adicionalmente en contacto con un anticuerpo secundario marcado con una marca detectable. Para una revisión de procedimientos inmunológicos y de inmunoensayos adecuados véase, por ejemplo, Harlow & Lane, *ANTIBODIES, A LABORATORY MANUAL*, Cold Spring Harbor Publication, Nueva York (1988); *Basic and Clinical Immunology* (Stites & Terr eds., 7ª ed. 1991); Las patentes de EE.UU. 4.366.241; 4.376.110; 4.517.288; y 4.837.168); *Methods in Cell Biology: Antibodies in Cell Biology*, volumen 37 (Asai, ed. 1993).

Los anticuerpos monoclonales, policlonales o mezclas de los mismos pueden usarse para unir los híbridos de ARN:ADN. La detección de híbridos de ARN:ADN usando anticuerpos monoclonales se describe en, por ejemplo, las patentes de EE.UU. nº 4.732.847 y 4.833.084. La detección de híbridos de ARN:ADN usando anticuerpos policlonales se describe en, por ejemplo, la patente de EE.UU. nº 6.686.151. Los anticuerpos policlonales o monoclonales pueden generarse con propiedades de unión específica. Por ejemplo, pueden generarse anticuerpos monoclonales o policlonales que se unen específicamente a híbridos de ARN:ADN más cortos (por ejemplo, menos de 20 pares de bases) o más largos (por ejemplo, más de 100 pares de bases). Además, pueden producirse anticuerpos monoclonales o policlonales que son tanto más como menos sensibles a desapareamientos dentro del híbrido de ARN:ADN.

Los procedimientos de producción de anticuerpos policlonales y monoclonales que reaccionan específicamente con híbridos de ARN:ADN son conocidos para aquellos expertos en la materia. Por ejemplo, la preparación de anticuerpos policlonales y monoclonales inmunizando animales de laboratorio adecuados (por ejemplo, pollos, ratones, conejos, ratas, cabras, caballos y similares) con un inmunógeno apropiado (por ejemplo, un híbrido de ARN:ADN). Tales procedimientos se describen en, por ejemplo, Coligan, *Current Protocols in Immunology* (1991); Harlow & Lane, *antes*; Goding, *Monoclonal Antibodies: Principles and Practice* (2ª ed. 1986); y Kohler & Milstein, *Nature* 256:495497 (1975).

Los anticuerpos también pueden producirse recombinantemente. La preparación de anticuerpos por selección de anticuerpos a partir de bibliotecas de ácidos nucleicos que codifican anticuerpos recombinantes encapsulados en fago o vectores similares se describen en, por ejemplo, Huse y col., *Science* 246:1275-1281 (1989) y Ward y col., *Nature* 341:544-546 (1989). Además, los anticuerpos pueden producirse recombinantemente usando procedimientos conocidos en la técnica y descritos en, por ejemplo, Sambrook y col., *Molecular Cloning, A Laboratory Manual* (2ª ed. 1989); Kriegler, *Gene Transfer and Expression: A Laboratory Manual* (1990); y *Current Protocols in Molecular Biology* (Ausubel y col., eds., 1994)).

D. Generación de valores de control

Los valores de control pueden representar tanto valores externos (por ejemplo, el número de locus intactos en una segunda muestra de ADN con un número conocido o esperado de nucleótidos metilados o secuencias de reconocimiento de enzimas de restricción metiladas) como valores internos (por ejemplo, un segundo locus en la misma muestra de ADN o el mismo locus en una segunda muestra de ADN). Aunque es útil, no es necesario saber cuántos nucleótidos (es decir, el valor absoluto) están metilados en el control. Por ejemplo, para locus en los que la metilación produce un estado de enfermedad, el conocimiento de que el locus está más metilado de lo que está en células normales puede indicar que el sujeto del que se obtuvo esa muestra puede tener la enfermedad o estar en las fases tempranas de desarrollar la enfermedad.

En los casos en los que la misma muestra de ADN incluye un locus de control, la amplificación múltiple, por ejemplo, PCR múltiple, puede usarse para analizar dos locus más (por ejemplo, al menos un locus diana y al menos un locus de control).

Las muestras de ADN pueden variar dos parámetros con respecto a la metilación: (i) el porcentaje de copias totales en una población que tiene cualquier metilación en un locus específico, y (ii) para copias con cualquier metilación de ADN, la densidad de metilación promedio entre las copias. Es ideal, aunque no se requiere, usar ADN de control que evalúen ambos de estos parámetros en una muestra de prueba.

Los ADN de control con citosinas metiladas conocidas se producen usando cualquier número de ADN metilasas, cada una de las cuales puede tener una secuencia de reconocimiento de la metilación diana diferente. Este procedimiento puede crear una población de fragmentos de ADN que varía con respecto a la densidad de metilación (es decir, el número de citosinas metiladas por alelo). Las reacciones de metilasa parcial también pueden usarse, por ejemplo, para producir una población normalmente distribuida con un modo a la densidad de metilación promedio para la población. En algunas realizaciones, el modo puede ajustarse para una población dada en función de la completitud de la reacción de metilasa. Los ADN de control también pueden sintetizarse con ADN metilado y bases sin metilar.

En algunos casos se usa una diana de ADN con una secuencia conocida. Puede producirse un ADN de control deseado seleccionando la mejor combinación de metilasas y enzimas de restricción para el análisis. Primero se genera un mapa de sitios que pueden ser metilados por cada metilasa disponible. Segundo, también se produce un mapa de restricción del locus. Tercero, se seleccionan y se usan metilasas para metilar *in vitro* la muestra de ADN de control para provocar un patrón de metilación deseado, que se diseña para realizar óptimamente en combinación con las enzimas de restricción usadas en el análisis de metilación de las muestras de ADN de prueba y de ADN de control. Por ejemplo, *M.HhaI* metila el sitio (G*CGC) y *McrBC* reconoce dos medio sitios con el motivo (RpC). Por tanto, cada sitio *M.HhaI* metilado en la secuencia de control es reconocido por *McrBC*.

Similarmente, una población de moléculas pueden entonces tratarse con una ADN metilasa (por ejemplo, *M.SssI*) en presencia de magnesio para producir una densidad de metilación deseada. Si se deja que la reacción se ejecute hasta completitud, casi todos los sitios que pueden ser metilados serán metilados, produciendo una densidad de

metilación alta y homogénea. Si la reacción se limita en su curso, resultará una menor densidad de metilación promedio (o metilación parcial) (es decir, todos los sitios posibles no son metilados debido a la sincronización de la reacción y/o concentración de enzima). De esta forma puede producirse la densidad de metilación promedio deseada del ADN de control. El ADN de control metilado puede caracterizarse precisamente determinando el número de citosinas metiladas mediante secuenciación con bisulfito. Alternativamente, el ADN de control de metilación puede caracterizarse precisamente determinando el número de citosinas metiladas mediante una comparación con otros ADN de control conocidos como se ha descrito en este documento.

Para la predicción más precisa de las densidades de metilación puede ser útil generar un conjunto de control de ADN que pueda servir convenientemente de curva patrón, en la que cada muestra en el conjunto de control tiene una densidad de metilación diferente, tanto conocida como desconocida. Cortando las múltiples muestras con una enzima de restricción dependiente de la metilación o una enzima de restricción sensible a la metilación en condiciones que permitan que al menos algunas copias de posibles sitios de escisión por enzimas de restricción en el locus sigan estando sin escindir y posteriormente amplificando las copias intactas restantes de un locus, puede generarse una curva patrón de la cantidad de copias intactas (por ejemplo, representada por valores de Ct), guardando así relación la cantidad de ADN intacto con diferentes densidades de metilación. La curva patrón puede entonces usarse para determinar la densidad de metilación de una muestra de ADN de prueba interpolando la cantidad de ADN intacto en la muestra tras la restricción y amplificación como se describe en este documento.

E. Amplificación específica del estado de metilación

En algunas realizaciones, la PCR específica de la metilación puede emplearse para monitorizar el estado de metilación de nucleótidos específicos en un locus de ADN. En estas realizaciones, tras o precediendo la digestión con la enzima de restricción, el ADN se combina con un agente que modifica las citosinas sin metilar. Por ejemplo, se añade bisulfito de sodio al ADN, convirtiéndose así las citosinas sin metilar en uracilo, dejando las citosinas metiladas intactas. Se diseñan uno o más cebadores para distinguir entre las secuencias metiladas y sin metilar que han sido tratadas con bisulfito de sodio. Por ejemplo, los cebadores complementarios a la secuencia metilada con bisulfito contendrán guanosinas, que son complementarias a las citosinas endógenas. Los cebadores complementarios a la secuencia sin metilar tratada con bisulfito contendrán adenosinas, que son complementarias al uracilo, el producto de conversión de citosina sin metilar. Preferentemente, los nucleótidos que distinguen entre las secuencias metiladas convertidas y sin metilar estarán en o próximos al extremo 3' de los cebadores. Variaciones de procedimientos usando PCR basada en bisulfito de sodio se describen en, por ejemplo, Herman y col., Proc. Natl. Acad. Sci. USA 93:9821-9826 (1996); las patentes de EE.UU. nº 5.786.146 y 6.200.756.

F. Detección de metilación asociada a enfermedad

Los cebadores de amplificación pueden diseñarse para amplificar locus asociados a un fenotipo o enfermedad particular. La detección de perfiles de metilación alterados en locus en los que tales alteraciones están asociadas a enfermedad pueden usarse para proporcionar diagnósticos o pronósticos de enfermedad. Véase, por ejemplo, la Tabla 1. Véase también Costello y Plass, J Med Genet 38:285-303 (2001) y Jones y Baylin, Nature. Rev 3:415-428 (2002).

Tabla 1: Ejemplos de genes que presentan hipermetilación en cáncer

Gen	Efecto de pérdida de función en el desarrollo tumoral	Tipos de tumores
RB	Pérdida de control del ciclo celular	Retinoblastoma
MLH1	Aumento de la velocidad de mutación, resistencia a fármacos	Colon, ovario, endometrio, gástrico
BRCA1	Inestabilidad genómica	Mama, ovario
E-CAD	Aumento de la motilidad celular	Mama, gástrico, pulmón, próstata, colon, leucemia
APC	Transducción anormal de células	Mama, pulmón, colon, gástrico, esófago, pancreático, hepatocelular
p16	Pérdida de control del ciclo celular	La mayoría de los tipos de tumores
VHL	Degradación alterada de proteínas	Carcinoma de células renales de células claras
p73	Pérdida de control del ciclo celular	Leucemia, linfoma, ovario
RASSF1A	Transducción anormal de células	Pulmón, mama, ovario, riñón, nasofaríngeo

Gen	Efecto de pérdida de función en el desarrollo tumoral	Tipos de tumores
<i>p15</i>	Pérdida de control del ciclo celular	Leucemia, linfoma, gástrico, carcinoma de células escamosas, hepatocelular
<i>GSTP1</i>	Aumento de la lesión de ADN	Próstata
<i>DAPK</i>	Apoptosis reducida	Linfoma, pulmón
<i>MGMT</i>	Aumento de la velocidad de mutación	Colon, pulmón, cerebro, esófago, gástrico
<i>P14ARF</i>	Pérdida de control del ciclo celular	Melanoma, cáncer de piel de no melanoma, pancreático, mama, cabeza y cuello, pulmón, mesotelioma, neurofibromatosis, colon, sarcoma de tejidos blandos, vejiga, sarcoma de Hodgkin, Ewing, tumor de Wilms, osteosarcoma, rabdomiosarcoma
<i>ATM</i>	Reparación defectuosa de ADN	Leucemia, linfoma
<i>CDKN2B</i>	Pérdida de control del ciclo celular	Mama, ovario, próstata
<i>FHIT</i>	Reparación defectuosa de ADN	Pulmón, páncreas, estómago, riñón, cuello del útero, mama
<i>MSH2</i>	Reparación defectuosa de ADN	Colon
<i>NF1/2</i>	Pérdida de control del ciclo celular	Neurofibroma
<i>PTCH</i>	Pérdida de control del ciclo celular	Carcinomas de piel, basales y de células escamosas, cerebro
<i>PTEN</i>	Pérdida de control del ciclo celular	Mama, tiroides, piel, cabeza y cuello, endometrio
<i>SMAD4</i>	Pérdida de control del ciclo celular	Páncreas, colon
<i>SMARCA3/B1</i>	Pérdida de control del ciclo celular	Colon
<i>STK11</i>	Pérdida de control del ciclo celular	Melanoma, gastrointestinal
<i>TIMP3</i>	Rotura de la matriz celular	Útero, mama, colon, cerebro, riñón
<i>TP53</i>	Pérdida de control del ciclo celular; apoptosis reducida	Colon, próstata, mama, vesícula biliar, vías biliares,
<i>BCL2</i>	Pérdida de control del ciclo celular; apoptosis reducida	Linfoma, mama
<i>OBCAM</i>	Pérdida de control del ciclo celular	Ovario
<i>GATA4</i>	Silenciamiento de la transcripción de genes en la dirección 3'	Colorrectal, gástrico, ovario
<i>GATA5</i>	Silenciamiento de la transcripción de genes en la dirección 3'	Colorrectal, gástrico, ovario
<i>HIC1</i>	Pérdida de control del ciclo celular	Epitelio, linfoma, sarcoma

Abreviaturas: APC, poliposis coli adenomatosa; BRCA1, cáncer de mama 1; DAPK, proteína cinasa asociada a muerte; E-cad, cadherina epitelial; GSTP1 glutatión S-transferasa π 1; mlH1, homólogo 1 de MutL, MGMT, O(6)-metilguanina-ADN metiltransferasa; p15 p15^{INK4b}, p16, p16^{INK4}, p73, p73; Rb, retinoblastoma; RASSF1a, familia 1A del dominio de asociación a Ras; VHL, von Hippel-Lindau; ATM, ataxia telangiectasia mutada; CDKN2, inhibidor de cinasas dependiente de ciclina; FHIT, tríada de histidina frágil; MSH2, homólogo 2 de mutS; NF1/2, neurofibromina 1/2; PTCH, homólogo de patched; PTEN, homólogo de fosfatasa y tensina; SMAD4, madres contra el homólogo 4 de Decapentaplegic; SMARCA3/B1, regulador de cromatina relacionado con SWI/SNF, asociado a matriz, dependiente de actina, subfamilia A, miembro 3/subfamilia B, miembro 1; Sty11, serina/treonina cinasa 11; TIP3, tejido inhibidor de metaloproteinasa 3; Bc1-2m B-cell CLL/Linfoma 2; OBCAM, molécula de adhesión a células de unión a opioide; GATA, factor de transcripción de globina; HIC1, hipermetilado en cáncer.

Por ejemplo, la metilación del locus p16 está asociada a cáncer pancreático. Véase, por ejemplo, Schutte y col., *Cancer Res.* 57:3126-3131 (1997). Los cambios de metilación en el locus II/H19 del factor de crecimiento similar a la insulina en riñón están asociados a tumorigénesis de Wilms. Véase, por ejemplo, Okamoto y col., *Proc. Natl. Acad. Sci. USA* 94:5367-5371 (1997). La asociación de alteración de metilación en los locus p15, E-cadherina y von Hippel-Lindau también está asociada a cánceres. Véase, por ejemplo, Herman y col., *Proc. Natl. Acad. Sci. USA* 93:9821-9826 (1997). El estado de metilación de GSTP 1 está asociado a cáncer de próstata. Véase, por ejemplo, la patente de EE.UU. nº 5.552.277.

Pueden obtenerse muestras de ADN genómico mediante cualquier medio conocidos en la técnica. En los casos en los que va a detectarse un fenotipo o enfermedad particular, las muestras de ADN deben prepararse a partir de un tejido de interés o, según sea apropiado, a partir de sangre. Por ejemplo, puede prepararse ADN a partir de tejido de biopsia para detectar el estado de metilación de un locus particular asociado a cáncer. El espécimen que contiene ácido nucleico usado para la detección de locus metilados (véase, por ejemplo, Ausubel y col., *Current Protocols in Molecular Biology* (1995 suplemento)) puede ser de cualquier fuente y puede extraerse mediante una variedad de técnicas tales como aquellas descritas por Ausubel y col., *Current Protocols in Molecular Biology* (1995) o Sambrook y col., *Molecular Cloning, A Laboratory Manual* (3ª ed. 2001). Tejidos a modo de ejemplo incluyen, por ejemplo, tejido de cerebro, colon, urogenital, hematopoyético, timo, testículos, ovario, útero, próstata, mama, colon, pulmón y renal.

La detección e identificación de locus de metilación alterada (en comparación con células normales) en las muestras de ADN puede indicar que al menos algunas de las células de las que se derivó la muestra están enfermas. Tales enfermedades incluyen, pero no se limitan a, por ejemplo, astrocitoma de bajo grado, astrocitoma anaplásico, glioblastoma, meduloblastoma, cáncer de colon, cáncer de hígado, cáncer de pulmón, cáncer renal, leucemia (por ejemplo, leucemia linfocítica aguda, leucemia linfocítica crónica, leucemia mieloide aguda, leucemia mieloide crónica), linfoma, cáncer de mama, cáncer de próstata, cáncer de cuello uterino, cáncer de endometrio, neuroblastoma, cáncer de la cavidad bucal (por ejemplo, lengua, boca, faringe), cáncer de esófago, cáncer de estómago, cáncer del intestino delgado, cáncer rectal, cáncer anal, cáncer del canal anal y ano recto, cáncer de las vías biliares intrahepáticas, cáncer de vesícula biliar, cáncer biliar, cáncer pancreático, cáncer óseo, cáncer de las articulaciones, cáncer de piel (por ejemplo, melanoma, cáncer no epitelial, carcinoma de células basales, carcinoma de células escamosas), cánceres de tejido blando, cáncer uterino, cáncer de ovario, cáncer vulvar, cáncer vaginal, cáncer urinario, cáncer de uréter, cáncer del ojo, cáncer de cabeza y cuello, linfoma no Hodgkin, linfoma Hodgkin, mieloma múltiple, cáncer de cerebro, cáncer del sistema nervioso. La identificación de perfiles de metilación alterada también es útil para la detección y el diagnóstico de pérdida de huella genómica, síndrome de X frágil e inactivación del cromosoma X.

Si se desea pueden usarse procedimientos de ADN múltiple para amplificar múltiples dianas a partir de la misma muestra. Las dianas adicionales pueden representar controles (por ejemplo, de un locus de estado de metilación conocido) o locus adicionales asociados a un fenotipo o enfermedad.

En algunas realizaciones, los procedimientos de la invención se usan para identificar nuevos locus asociados a un fenotipo de enfermedad tal como cáncer, o se usan para validar una asociación tal.

F. Procedimientos a modo de ejemplo de determinación de la metilación relativa en un locus

Como se ha descrito anteriormente, están disponibles varias posibilidades para determinar la cantidad relativa de metilación en un locus genético de interés. Por ejemplo, pueden realizarse digestiones parciales o completas, pueden usarse enzimas de restricción sensibles a la metilación o dependientes de la metilación, puede emplearse tratamiento con bisulfito de sodio, etc. Sin pensar en limitar la invención a una serie particular de etapas, las siguientes posibilidades se ejemplifican adicionalmente.

Una muestra de ADN puede digerirse (parcialmente) con *McrBC* y un locus puede amplificarse posteriormente usando amplificación de ADN cuantitativa (por ejemplo, PCR, amplificación por círculo rodante y otros procedimientos conocidos para aquellos expertos en la materia). Los perfiles cinéticos resultantes de las reacciones de amplificación se comparan con aquellos derivados de un muestra de ADN de control similarmente tratada. Los perfiles cinéticos de reacciones de amplificación pueden obtenerse por numerosos medios conocidos para aquellos expertos en la materia que incluyen monitorización de la reacción de fluorescencia de TaqMan™, balizamientos moleculares, incorporación de colorante intercalante (por ejemplo, SYBR Green™), sondas SCORPION™ y otros.

La muestra de ADN puede fraccionarse en porciones iguales y tratarse una porción con *McrBC* y la otra no. Las dos porciones se amplifican y se comparan para determinar la cantidad relativa de metilación en el locus.

La muestra de ADN puede fraccionarse en porciones iguales en las que cada porción se somete a una cantidad diferente de digestión parcial con *McrBC*. La cantidad de locus intactos en las diversas porciones (por ejemplo, como se mide por amplificación de ADN cuantitativa) puede compararse con una población de control (tanto de la misma muestra que representa ADN sin cortar como porciones equivalentes de otra muestra de ADN). En los casos en los que las porciones equivalentes son de una segunda muestra de ADN, la segunda muestra puede tener un número esperado o conocido de nucleótidos metilados (o al menos secuencias de reconocimiento de la enzima de

restricción metilada) o, alternativamente, el número de secuencias de reconocimiento metiladas puede ser desconocido. En el último caso, la muestra de control será frecuentemente de una muestra de relevancia biológica, por ejemplo, de un tejido enfermo o normal, etc.

5 Una muestra puede separarse en al menos dos porciones. La primera porción se digiere con una enzima de una de las tres posibles clases de enzimas de restricción de detección de la metilación (es decir, sensible a la metilación, insensible a la metilación y dependiente de la metilación). Cada porción adicional se digiere con el componente isoesquimérico de una clase de detección de la metilación diferente de la enzima usada para digerir la primera porción. Entonces, los locus intactos se amplifican y se cuantifican. La metilación relativa en el locus puede
10 determinarse comparando los resultados obtenidos de dos cualquiera de las reacciones entre sí, con o sin comparación con una porción sin digerir. En el caso en el que se usen enzimas insensibles a la metilación, la porción normalmente se somete a una digestión parcial.

15 La muestra de ADN puede tratarse con un agente que modifica la citosina sin metilar, pero que deja sin modificar la citosina metilada, por ejemplo, bisulfito de sodio. La muestra se separa en porciones iguales y una porción se trata con la enzima de restricción dependiente de la metilación *McrBC*. El tratamiento con bisulfito de sodio no modifica los locus de reconocimiento *McrBC* debido a que el bisulfito de sodio modifica la citosina sin metilar y el locus de reconocimiento de cada hemi-sitio *McrBC* es una base de purina seguida de una citosina metilada. Entonces, las
20 muestras de tanto porciones cortadas como sin cortar se amplifican usando al menos un cebador que distingue entre nucleótidos metilados y sin metilar. Entonces, las porciones amplificadas se comparan para determinar la metilación relativa. Ciertas tecnologías de amplificación cuantitativa emplean una o más sondas de detección que son distintas de los cebadores de amplificación. Estas sondas de detección también pueden diseñarse para discriminar entre
ADN metilado y sin metilar convertido. Las sondas de detección pueden usarse en combinación con la enzima de restricción dependiente de la metilación *McrBC*. Por ejemplo, las sondas de detección pueden usarse para cuantificar la densidad de metilación dentro de un locus comparando los perfiles de amplificación cinéticos entre una muestra tratada con *McrBC* convertida y una muestra convertida que no se trató con *McrBC*.

25 Alternativamente, la muestra puede dividirse en porciones iguales y una porción se digiere (parcialmente) con la enzima de restricción dependiente de la metilación *McrBC*. Entonces, ambas porciones se tratan con bisulfito de sodio y se analizan por amplificación cuantitativa usando un cebador que distingue entre nucleótidos metilados y sin metilar convertidos. Los productos de amplificación se comparan entre sí, además de un patrón, para determinar la densidad de metilación relativa.

30 La muestra de ADN pueden dividirse en porciones y una porción se trata con una o más enzimas de restricción sensibles a la metilación. Entonces, la porción digerida se subdivide adicionalmente y una subdivisión se digiere con la enzima de restricción dependiente de la metilación *McrBC*. Entonces, las diversas porciones y subporciones se amplifican y se comparan. Tras la digestión, las porciones y subporciones pueden tratarse opcionalmente con bisulfito de sodio y amplificarse usando al menos un cebador que distingue entre nucleótidos metilados y sin metilar.

35 La muestra de ADN puede dividirse en cuatro porciones: una primera porción se deja sin tratar, una segunda porción se pone en contacto con una enzima de restricción sensible a la metilación (en la que las secuencias intactas están metiladas), una tercera porción se pone en contacto con una enzima de restricción dependiente de la metilación que es *McrBC* (en la que las secuencias intactas están sin metilar) y una cuarta porción se pone en contacto con una
40 enzima de restricción sensible a la metilación y una enzima de restricción dependiente de la metilación en la que una de las enzimas de restricción en la cuarta porción se pone en contacto con la muestra en condiciones que permitan que al menos algunas copias de los posibles sitios de escisión por enzimas de restricción en el locus sigan estando sin escindir (por ejemplo, bajo condiciones de digestión parcial y/o usando *McrBC*). Véase la Figura 13. Si se desea, una quinta porción de la muestra puede analizarse tras el tratamiento con un isoesquimero insensible a la metilación de una enzima de restricción dependiente de la metilación o sensible a la metilación usada en otra
45 porción, controlándose así digestiones incompletas y/o mutaciones en la secuencia de reconocimiento de la enzima de restricción. Además de la digestión, las porciones y subporciones pueden tratarse opcionalmente con bisulfito de sodio y amplificarse usando al menos un cebador que distingue entre nucleótidos metilados y sin metilar.

III. Cálculo de la densidad de metilación basándose en el umbral de ciclos

50 Como se ha descrito anteriormente, los umbrales de ciclos (Ct) son una medición útil para determinar la cantidad inicial de molde de ADN en una reacción de amplificación. Por consiguiente, los valores de Ct de muestras tratadas con una enzima de restricción dependiente de la metilación y/o sensible a la metilación y amplificadas como se describe en este documento pueden usarse para calcular la densidad de metilación en las secuencias de reconocimiento de las enzimas de restricción sensibles a la metilación o dependientes de la metilación usadas. Un cambio en el valor de Ct entre una muestra y un valor de control (que puede representar el valor de Ct de una
55 segunda muestra) es predictivo de densidad de metilación relativa. Debido a que la amplificación en PCR duplica teóricamente las copias cada ciclo, 2^x se aproxima al número de copias en la amplificación durante la amplificación exponencial en la que X es el número de ciclos. Por tanto, 2^{Ct} es proporcional a la cantidad de ADN intacto al inicio de la amplificación. El cambio de Ct (ΔCt) entre dos muestras o entre una muestra y un valor de control (por ejemplo, que representa un valor de Ct de un control) representa la diferencia en el molde de partida inicial en las muestras.
60 Por tanto, $2^{\Delta Ct}$ es proporcional a la diferencia de la densidad de metilación relativa entre una muestra y un control o

una segunda muestra. Por ejemplo, como se ha explicado en el Ejemplo 9, una diferencia de 1,46 en Ct entre dos muestras (tratada cada una con una enzima de restricción dependiente de la metilación y posteriormente amplificada) indica que una muestra tiene al menos 2,75 (es decir, $2^{(1,46)} = 2,75$) veces más posibilidad de sitios de restricción metilados dentro del locus que la otra muestra.

5 VI. Kits

Los kits pueden usarse para realizar los procedimientos de la invención. Por ejemplo, los kits pueden comprender, por ejemplo, la enzima de restricción dependiente de la metilación *McrBC*, una molécula de ADN de control que comprende un número predeterminado de nucleótidos metilados y uno o dos cebadores de oligonucleótidos de control diferentes que se hibridan con la molécula de ADN de control. En algunos casos, los kits comprenden una pluralidad de moléculas de ADN que comprenden diferentes números predeterminados de nucleótidos metilados para permitir que el usuario compare la amplificación de una muestra con varios ADN que comprenden un número conocido de nucleótidos metilados.

Los kits contendrán frecuentemente instrucciones escritas para usar los kits. Los kits también pueden comprender reactivos suficientes para soportar la actividad de la enzima de restricción. Los kits también pueden incluir una ADN polimerasa termoestable.

En algunos casos, los kits comprenden uno o dos cebadores de oligonucleótidos diana diferentes que se hibridan con una región predeterminada de ADN genómico humano. Por ejemplo, como se ha descrito anteriormente, los cebadores pueden permitir la amplificación de locus asociados al desarrollo o pronóstico de enfermedad.

Los kits pueden comprender una o más sondas de oligonucleótidos detectablemente marcadas para monitorizar la amplificación de polinucleótidos diana.

Los kits pueden comprender al menos un cebador de oligonucleótidos diana que distingue entre ADN sin metilar y metilado modificado en ADN genómico humano. En estos casos, los kits también incluyen normalmente un resto fluorescente que permite adquirir el perfil cinético de cualquier reacción de amplificación en tiempo real.

Los kits pueden comprender al menos un cebador de oligonucleótidos diana que distingue entre ADN sin metilar y metilado modificado en ADN genómico humano. En estos casos, los kits también incluirán normalmente un agente que modifica citosina sin metilar.

Los kits pueden comprender una sonda de ARN, un aglutinante (por ejemplo, un anticuerpo o un mimético de anticuerpo) que se une específicamente a complejos de ARN:ADN, reactivos de detección y enzimas de restricción sensibles a la metilación y/o dependientes de la metilación.

30 Ejemplo 1 de referencia: Construcción de un conjunto de muestras patrón de metilación de ADN

Se genera un conjunto de muestras patrón de numerosas formas. Por ejemplo, se aplica una metilasa (por ejemplo, *M.SssI* u otras metilasas tales como *M.HhaI*, *M.AluI*) *in vitro* a una serie de muestras de ADN para producir un conjunto estándar de ADN que se sabe que tienen densidades de metilación crecientes. Este conjunto patrón se genera obteniendo primero una muestra de secuencia conocida (por ejemplo, el locus de interés). A continuación, la muestra se divide en una serie de muestras y cada muestra en la serie se trata con la metilasa elegida en presencia de magnesio y de un modo que se produzcan densidades de metilación crecientes de las muestras en las series.

Una reacción de metilación parcial se refiere a poner en contacto ADN con una mezcla de una o más metilasas bajo condiciones de reacción apropiadas de forma que la metilasa modifique algunos (por ejemplo, aproximadamente el 10%, 20%, 30%, 40%, 50%, 60%, 70%, 80%, 90%), pero no todos, los posibles sitios de reconocimiento de metilasa para cada enzima en la mezcla de metilasa. Una secuencia de ADN se metila parcialmente tratando ADN con una metilasa activa durante un periodo de tiempo más corto del que es necesario para lograr la metilación completa, y luego terminando la reacción, o bajo otras condiciones de reacción alteradas que permitan la cantidad deseada de metilación parcial.

Las densidades de metilación de cada muestra en las series se miden secuenciando una muestra estadísticamente significativa de clones a partir de una porción tratada con bisulfito de cada miembro de serie en el conjunto, identificando las citosinas convertidas dentro de cada clon y calculando la densidad de metilación promedio para cada reacción dentro del conjunto de muestras de metilación. Con el fin de lograr una densidad de metilación parcial en un fragmento dado, la metilasa actúa de un modo estocástico, y no de un modo procesivo. Para *M.SssI*, esto se logra realizando la reacción en presencia de magnesio, ya que *M.SssI* metila ADN en una forma de procedimiento en ausencia de magnesio, mientras que en presencia de magnesio, la enzima metila CpG en un modo estocástico no procesivo.

Ejemplo 2: Determinación cuantitativa de la metilación relativa de un locus de interés entre un tejido y otro tejido con amplificación cuantitativa

Se recoge ADN de dos fuentes: una población de prueba (enferma) y una población de control (normal).

Cada población de fragmentos de ADN se somete similarmente a diversas digestiones parciales con la enzima *McrBC*. *McrBC* reconoce dos sitios R^{MC} , cada uno un medio sitio, que están dentro de 40 a 3.000 bases y con una separación óptima de los medio sitios de 50-103 pb y luego corta el fragmento de ADN algunas veces 3' de ambos medio sitios, algunas veces 3' del medio sitio más hacia 5' y 5' del medio sitio más hacia 3', y algunas veces 5' de ambos medio sitios.

A continuación, el ADN digerido en cada población se amplifica y la cantidad de locus amplificados se mide en función del número de ciclos. Cuanto mayor sea el número de medio sitios metilados en el locus de interés en un fragmento de ADN dado dentro de la población estudiada, mayor será la probabilidad de que *McrBC* corte entre los cebadores de PCR y, por tanto, se requerirá un mayor número de ciclos de amplificación para lograr la concentración idéntica de locus de PCR amplificado.

Para determinar si el locus de interés dentro de la población de prueba está más o menos metilado que el locus de interés dentro de la población de control, una curva de concentración de ADN amplificado de la población de prueba se compara con la curva de concentración de ADN amplificado de la población de control. Las curvas de concentración reflejan la cantidad de ADN intacto en función de la cantidad de digestión en una serie de digestiones parciales diferentes.

Ejemplo de referencia 3: Medición de la densidad de metilación en un locus de interés dentro de un tejido con amplificación cuantitativa

Se obtiene ADN de una única fuente, y se divide en dos poblaciones. La primera población de ADN se digiere completamente con la enzima *McrBC*, mientras que la población restante no se trata. Alternativamente, la primera población se digiere con una mezcla de una o más enzimas de restricción sensibles a la metilación (por ejemplo, *HpaII*, *HhaI* o *AclI*, etc.), mientras que la segunda población de ADN no se trata.

A continuación, el ADN digerido en la primera población se amplifica y la cantidad del locus amplificado se mide en función del número de ciclos. Cuanto mayor sea el número de medio sitios metilados en el locus de interés en un fragmento de ADN dado dentro de la población estudiada, mayor será la probabilidad de que *McrBC* corte entre los cebadores de PCR y, por tanto, se requerirá un mayor número de ciclos de amplificación para lograr la concentración idéntica de locus de PCR amplificado. Alternativamente, si se usa una mezcla de enzimas de restricción sensibles a la metilación, cuanto mayor sea el número de sitios de restricción metilados en el locus de interés en un fragmento de ADN dado dentro de la población estudiada, menor será la probabilidad de que la mezcla sensible a la metilación de enzimas corte entre los cebadores de PCR. Por tanto, se requerirá un menor número de ciclos de amplificación para lograr la concentración idéntica de locus de PCR amplificado.

Para determinar si el locus de interés dentro de la primera población está metilado se hace una comparación entre la cinética de los perfiles de la reacción de amplificación de las poblaciones tratadas y sin tratar. Alternativamente, para determinar la densidad de metilación dentro del tejido en el locus de interés, la cinética de los perfiles de la reacción de amplificación se compara con la obtenida de un conjunto de muestras de metilación generado *in vitro* conocido, es decir, una curva de metilación patrón.

Ejemplo 4: Medida de la densidad de metilación en un locus de interés dentro de un tejido con análisis del punto final de la amplificación

Se obtiene ADN de una única fuente, y se divide en una serie de dos o más porciones.

Esta serie se expone a una cantidad creciente de digestión parcial por la enzima de restricción dependiente de la metilación *McrBC*. La primera porción de fragmentos de ADN no se trata, la segunda porción es ligeramente digerida con *McrBC*, y poblaciones posteriores son digeridas más completamente (pero menos de completamente) con *McrBC*. El intervalo de digestiones parciales se obtiene mediante la manipulación de condiciones de reacción tales como la valoración de cantidades de enzima, tiempos de digestión, temperaturas, reactivos, tampones u otros componentes requeridos.

A continuación, el ADN de las series de las porciones se amplifican y la cantidad de locus de PCR amplificados se mide después de un número fijo de ciclos. Cuanto mayor sea el número de medio sitios metilados en el locus de interés en un fragmento de ADN dado dentro de la primera porción tratada con *McrBC*, mayor será la probabilidad de que *McrBC* corte fragmentos de la primera parte entre los cebadores de PCR, y se requerirá mayor número de ciclos de amplificación para detectar una cierta concentración de locus de PCR amplificados en la primera porción.

Para determinar si el locus de interés dentro de la población de prueba está más o menos metilado se comparan los resultados obtenidos de las series de porciones y el análisis paralelo del conjunto de muestras patrón (véase el Ejemplo 1).

Ejemplo de referencia 5: Cuantificación de la metilación usando componentes isoesquiméricos de detección de la metilación y PCR cuantitativa

Se recoge ADN de dos fuentes: una población de prueba (enferma) y una población de control (normal). Cada

población se divide en grupos de dos o más porciones.

5 Cada grupo se expone a una cantidad creciente de digestión parcial por una enzima de restricción sensible a la metilación (por ejemplo, *HpaII*, *Mbol* (A)). La primera porción de fragmentos de ADN no se trata, la segunda porción es ligeramente digerida con la enzima de restricción sensible a la metilación, y poblaciones posteriores son más completamente digeridas (pero menos que a completitud) con la enzima. El intervalo de digestiones parciales se obtiene mediante la manipulación de condiciones de reacción tales como la valoración de cantidades de enzima, tiempos de digestión, temperaturas, reactivos, tampones u otros componentes requeridos.

10 El segundo grupo de porciones es similarmente digerido con un componente isoesquimérico de una clase de detección de metilación diferente de la enzima usada para tratar el primer grupo de porciones (por ejemplo, *MspI* y *Sac3AI* (A), respectivamente). Alternativamente, el segundo grupo de porciones sigue sin tratar.

A continuación, todas las porciones en los grupos se amplifican y se obtiene el perfil de reacción cinético de cada amplificación. Alternativamente se usa análisis del punto final después de un número fijo de ciclos.

15 Para determinar si el locus de interés dentro de la población de prueba está más o menos metilado se hace una comparación entre los perfiles de reacción cinéticos entre los grupos (grupo frente a grupo). Adicionalmente, para determinar si el locus de interés entre los dos tejidos está más o menos metilado se hace una comparación entre los perfiles de reacción cinéticos entre las poblaciones (grupos enfermos frente a grupos normales).

Ejemplo de referencia 6: Cuantificación de la densidad de metilación de un locus de interés usando una mezcla de enzimas sensibles a la metilación

20 Se obtiene ADN de una única fuente y se divide en grupos de dos o más porciones. Alternativamente, se recoge ADN de dos fuentes: una población de prueba (enferma) y una población de control (normal), y se divide en grupos de dos o más porciones uniformes.

Los grupos de porciones uniformes se tratan con un número fijo de unidades de una mezcla de una o más enzimas de restricción sensibles a la metilación (por ejemplo, *HpaII*, *HaeIII*) durante periodos variados de tiempo.

25 A continuación, todas las porciones en los grupos se amplifican y se obtiene el perfil de reacción cinético de cada amplificación. Alternativamente se usa análisis del punto final después de un número fijo de ciclos.

30 Para determinar si el locus de interés dentro de la población de prueba está más o menos metilado se hace una comparación entre los perfiles de reacción cinéticos entre los grupos (grupo frente a grupo). Adicionalmente, para determinar si el locus de interés entre los dos tejidos está más o menos metilado se hace una comparación entre los perfiles de reacción cinéticos entre las poblaciones (grupos enfermos frente a grupos normales). Finalmente, la cantidad global de metilación puede determinarse comparando estos resultados con los obtenidos del conjunto de muestras patrón (véase el Ejemplo 1).

Ejemplo 7: Cuantificación de la densidad de metilación de una pequeña población de alelos metilados en presencia de una gran población de alelos sin metilar

35 Se obtiene ADN de una única fuente y se divide en dos porciones. Alternativamente, se recoge ADN de dos fuentes: una población de prueba (enferma) y una población de control (normal), y cada población se divide en dos porciones.

40 Para discriminar entre alelos metilados y sin metilar, una porción de cada población se trata con bisulfito de sodio, que convierte los residuos de citosina sin metilar en uracilo, dejando sin convertir los residuos de citosina metilados. La porción tratada con bisulfito se divide en dos subporciones iguales. Alternativamente, una porción de cada población se digiere con una mezcla de una o más enzimas de restricción sensibles a la metilación (por ejemplo, *HpaII*, *HhaI*, etc.), quedando la porción restante sin tratar. La porción digerida se divide similarmente en dos subporciones iguales.

45 Una de las subporciones tratadas con bisulfito se digiere completamente con la enzima *McrBC*, mientras que la subporción restante no se trata. Alternativamente, una de las subporciones tratadas con enzima de restricción sensible a la metilación se digiere completamente con la enzima *McrBC*, mientras que la subporción restante no se trata.

50 Uno o ambos de los cebadores de amplificación se diseñan para parecerse a la secuencia convertida con bisulfito que solapa al menos un residuo de citosina metilada. De esta forma, sólo aquellos fragmentos que pertenecen al subconjunto de fragmentos que se metilaron en ese cebador en la población de prueba tienen la posibilidad de amplificarse, mientras que aquellos fragmentos en el subconjunto de fragmentos que siguieron sin metilar en el locus de interés no se amplificarán. Alternativamente, si se usan enzimas sensibles a la metilación para discriminar entre alelos metilados y sin metilar, entonces se usan cebadores diseñados para la secuencia nativa y sólo los alelos que se metilaron en los sitios de reconocimiento siguen intactos y se amplificarán.

A continuación, el ADN de tanto las porciones sin tratar con *McrBC* como tratadas con *McrBC*, junto con los

controles relevantes, se amplifican y la cantidad de locus de PCR amplificados se mide en función del número de ciclos.

5 Para determinar si el locus de interés dentro de la primera población está metilado se hace una comparación entre la cinética de los perfiles de la reacción de amplificación de las poblaciones tratadas y sin tratar. Para determinar la densidad de metilación dentro del tejido en el locus de interés, la cinética de los perfiles de la reacción de amplificación se compara con la obtenida de un conjunto de muestras de metilación generado *in vitro* conocido, es decir, una curva de metilación patrón.

10 Alternativamente, este ejemplo también podría realizarse invirtiendo el orden de la conversión con bisulfito de sodio y las etapas de digestión con *McrBC* descritas anteriormente (es decir, la digestión con *McrBC* tiene lugar antes de la conversión con bisulfito de sodio).

Según la invención, la digestión parcial usando *McrBC* se usa en tanto una subporción como una serie de subporciones, en lugar de digestión completa.

Ejemplo de referencia 8: Demostración de la sensibilidad de detección

15 Se obtuvo ADN placentario masculino humano y se metiló *in vitro* usando *M.SssI*, que metiló citosinas (5mC) cuando las citosinas van seguidas de guanosina (es decir, motivos GC). Entonces, el ADN metilado *in vitro* resultante se mezcló en ADN placentario masculino sin metilar a relaciones conocidas, produciéndose así un conjunto de mezclas, comprendiendo cada una un porcentaje diferente de copias totales que estaban metiladas.

20 Entonces, las diversas mezclas se dividieron en tres porciones: una porción sin cortar; una parte digerida con *HhaI*, una enzima de restricción sensible a la metilación que es sensible a 5mC y que tiene la secuencia de reconocimiento GCGC, en la que los nucleótidos subrayados están sin metilar; y una parte digerida con tanto *HhaI* como *McrBC*. *McrBC* es una enzima de restricción dependiente de la metilación que se escinde en la proximidad de su secuencia de reconocimiento metilada. Las secuencias digeridas se amplificaron posteriormente usando los cebadores específicos para una región en la dirección 5' del gen CDKN2A (p16) en el genoma humano [nº ID de genes de Ensembl ENSG00000147889]. Se determinó que esta región está sin metilar en ADN placentario masculino humano que no ha sido metilado *in vitro*. Las secuencias del cebador fueron:

Cebador directo 5'- CGGGGACGCGAGCAGCACCAGAAT- 3' (SEQ ID Nº: 2),

Cebador inverso 5' CGCCCCACCCCCACCACCA -3' (SEQ ID Nº: 3)

y se usaron condiciones de PCR estándar:

1 ciclo [a 95°C durante 3 minutos]

30 seguido de 49 ciclos [a 95°C durante 30 s, 65°C durante 15 segundos y 68°C durante 15 segundos, una lectura de placas (68°C) y luego otra lectura de placas a 83°C].

35 La segunda lectura de placas a 83°C se realizó para eliminar la contribución de la fluorescencia de dímeros de cebadores al perfil de reacción. Se realizó una curva de fusión, que mide la fluorescencia en función de la temperatura, entre 80°C y 95°C al final de los ciclos y se determinó la especificidad de producto. El locus de interés tiene 181 pb de longitud y tiene una temperatura de fusión de aproximadamente 89°C. La acumulación de productos de amplificación se determinó usando el colorante intercalante SYBR Green™ Dynamo Kit de MJ Research que fluoresce cuando se une a ácidos nucleicos bicatenarios, y las reacciones se ciclaron y la intensidad fluorescente se monitorizó usando máquina de en tiempo real PCR MJ Opticon II.

40 Se determinó un umbral al que la señal de los productos de amplificación podría detectarse por encima de la referencia empíricamente a partir de un análisis paralelo de una curva patrón de dilución del molde. El umbral se ajustó para maximizar el ajuste de la curva de regresión (Ct frente a log [ADN]), según protocolos de determinación del umbral convencionales familiares a aquellos expertos en la materia, tales como aquellos descritos en, por ejemplo, Fortin y col., Anal. Biochem. 289: 281-288 (2001). Una vez establecido, el umbral se fijó y los umbrales de ciclos (Ct) para cada reacción se calcularon por el software (MJ Research Opticon II Monitor V2.02). Como era de esperar, los umbrales de ciclos derivados aumentaron a mayores diluciones de ADN metilado con respecto a sin metilar (Figura 1). También mostrado en la Figura 1, el cambio (o “desplazamiento”) en el umbral de ciclos (ΔCt) entre ADN sin cortar y ADN tratado con *HhaI* se correspondió con el esperado (E) para las diluciones, demostrando que el desplazamiento del umbral de ciclos puede usarse para predecir con exactitud la proporción relativa de copias que están metiladas en la muestra del número total de copias en la muestra.

50 La Figura 1 también ilustra que la adición de *HhaI* (una enzima de restricción sensible a la metilación) y *McrBC* (una enzima de restricción dependiente de la metilación) altera adicionalmente Ct en comparación con las muestras tratadas con *HhaI* sola. La degradación en el número de copias intactas y el desplazamiento de Ct resultante a un valor de Ct mayor después del tratamiento con la enzima de restricción dependiente de la metilación y la enzima sensible a la metilación confirma además la evaluación de que las copias intactas presentes después del tratamiento

con la enzima de restricción sensible a la metilación sola están de hecho metiladas. En otras palabras, esta digestión doble proporciona un control contra la posibilidad de que no se añadiera *HhaI*, fuera inactivo, fuera parcialmente activo o de otro modo no produjera una digestión completa. La adición de la enzima de restricción dependiente de la metilación y su capacidad para destruir moldes metilados confirma los resultados observados después del tratamiento con sólo la enzima de restricción sensible a la metilación y proporciona un control interno para evaluar la completitud de la reacción de la enzima de restricción sensible a la metilación.

La Figura 2 representa el perfil cinético de cuatro porciones a tres diluciones de ADN metilado con respecto a ADN sin metilar. En cada una de las tres diluciones, las cuatro porciones se digirieron primero con la enzima de restricción sensible a la metilación *HhaI*. Las dos primeras porciones en cada dilución se digirieron con *McrBC*, y las dos segundas porciones en cada dilución estuvieron sin tratar con respecto a *McrBC*. Entonces, todas las porciones se amplificaron bajo condiciones idénticas y se midieron las intensidades de fluorescencia. Pueden hacerse tres observaciones. Primera, las reacciones por duplicado tienen valores de Ct casi idénticos, demostrando que los ensayos son altamente reproducibles. Segundo, el cambio decreciente en Ct entre porciones tratadas y sin tratar en función de la dilución creciente de las copias metiladas muestra que, como las copias de genes metilados se vuelven más raras, hay menos diferencia entre los valores de Ct observados entre las porciones tratadas con *McrBC* y sin tratar. Esto sugiere que las reacciones de *HhaI* y *HhaI* + *McrBC* convergerán y que en algún punto los inventores no podrán monitorizar la densidad de metilación o podrán identificar la presencia o ausencia de copias metiladas. Se producirá una extinción teórica de la detección a un ΔCt de cero. Usando un análisis de regresión, los inventores resolvieron la función de extinción en su sistema y encontraron que la dilución en la que $\Delta Ct = 0$ es 1:20.000 copias metiladas con respecto a copias sin metilar, respectivamente. Este análisis de regresión se detalla en la Figura 4.

La Figura 2 muestra el perfil cinético fluorescente de una serie de porciones todas diluidas a 1:2.000 copias metiladas con respecto a copias sin metilar, respectivamente. Mientras que la fluorescencia global obtenida de las reacciones 1:2.000 no es ideal, puede verse una diferencia entre las reacciones de *HhaI* y *HhaI* / *McrBC*. Obsérvese que la digestión con *McrBC* destruye la acumulación de fluorescencia, y la curva del punto de fusión en la Figura 3 muestra un pico específico a 89°C, que es la temperatura de fusión predicha para el amplicón específico de 181 pb. Aquí, los inventores están detectando claramente únicamente 1,4 equivalentes celulares de ADN metilado diluido en un total de 2.762 equivalentes celulares de ADN.

Como se muestra en la Figura 4, se detectaron 1,4 equivalentes celulares (EC) de un total de 2.764 EC en el tubo que tenía un total de 20 ng de ADN genómico. Cada equivalente celular tiene aproximadamente 7,9 pg de ADN genómico por célula. Por tanto, si se usan 50 ng de ADN genómico, una copia metilada en presencia de 10.000 copias sin metilar debe ser detectable. Este principio se ilustra en la Figura 4. La Figura 5 proporciona una descomposición de este análisis. Obsérvese que este límite de detección puede reducirse adicionalmente (i) usando una sonda basada en FRET optimizada, en vez de un colorante intercalante, para detectar productos amplificados, (ii) optimizando adicionalmente el diseño de cebadores de PCR, o (iii) optimizando adicionalmente las condiciones de reacción de PCR.

Ejemplo 9: Detección de la densidad de metilación

Este ejemplo demuestra la determinación de la densidad de metilación promedio (es decir, el número promedio de nucleótidos metilados) dentro de un locus. Como se proporciona en la Figura 6, es probable que en muchas enfermedades la metilación de uno o más locus pase por una progresión de aumento de la densidad de metilación correspondiente a la progresión de enfermedad. Las técnicas de detección de la metilación previamente descritas implican detectar la presencia o ausencia de metilación en uno o más nucleótidos particulares, pero no proporciona análisis de la densidad a través de un locus. A diferencia, la presente invención proporciona procedimientos para detectar el número promedio de acontecimientos de metilación dentro de un locus.

Como se ilustra en las Figuras 11-12, los procedimientos que detectan metilación en sólo secuencias cortas específicas (que normalmente se basan en la hibridación de cebadores o sondas) pueden evitar cambios en la metilación (véase la Figura 11) que pueden detectar los presentes procedimientos de detección de densidad de metilación (que examinan metilación relativa a través de un locus entero) (véase la Figura 12).

Este descubrimiento trabaja tratando un locus con la enzima de restricción dependiente de la metilación *McrBC* en condiciones de forma que al menos algunas copias de posibles sitios de escisión por enzimas de restricción en el locus sigan estando sin escindir. Estas condiciones se consiguen permitiendo la digestión parcial de una muestra.

5 Como se ha tratado anteriormente, cuando se satisfacen dos complejos de *McrBC*, se produce restricción, normalmente dentro de ~32 pb de cualquier medio sitio (es decir, en una de las cuatro regiones). Véase la Figura 7. La restricción no se produce si los medio sitios están más próximos de 20 pb.

10 Como *McrBC* corta aleatoriamente 5' o 3' del par reconocido de medio sitios, la probabilidad de cortar en un locus (atravesado por los cebadores en el caso de PCR) es función del número de medio sitios metilados presentes en o próximos al locus. Para una concentración de enzima y tiempo de incubación fijos, cuanto más sitios de metilación haya dentro de un locus, mayor será la probabilidad de que *McrBC* corte en el locus (o entre los cebadores en el caso de PCR). Sin embargo, bajo circunstancias ideales y número suficiente de copias de ADN, la probabilidad de que *McrBC* corte cada copia de un locus es baja debido a que algunas veces cortará a una distancia fuera del locus, dejando así el locus intacto. Por tanto, el número de locus intactos es inversamente proporcional al número promedio de nucleótidos metilados dentro del locus. El número de locus intactos es inversamente proporcional al valor de Ct para una muestra dada. Por tanto, el valor de Ct es proporcional al número promedio de nucleótidos metilados dentro de un locus. Por tanto, la comparación del valor de Ct de ADN tratado con *McrBC* amplificado en comparación con el valor de Ct de ADN sin tratar amplificado permite la determinación de la densidad de metilación del locus.

20 Dos alícuotas de ADN de BAC que contienen el locus p16 se metilaron *in vitro* a diferentes densidades. La primera alícuota se metiló densamente con *M.Sssl*. Hay 20 sitios de metilasa *M.sssl* dentro del amplicón de PCR, 11 de los cuales también son medio sitios de *McrBC*. La segunda alícuota se metiló escasamente con *M.HhaI*. Hay cuatro sitios de metilasa *M.HhaI* dentro del amplicón de PCR, siento también los cuatro medio sitios *McrBC*. Dentro del amplicón de PCR también hay 4 sitios de restricción para *HhaI*. Cuatro de estos sitios de restricción *HhaI* son sitios de metilasa para tanto *M.sssl* como *M.HhaI*, de forma que el tratamiento completo con cualquier metilasa protegerá los cuatro sitios *HhaI* de la restricción. Se usó un número diferente de unidades de *McrBC* durante un periodo de tiempo fijo (cuatro horas) para generar una serie de digestiones progresivamente más parciales para identificar una cantidad de enzima que permitiera mejor distinguir resultados de ADN escasamente y densamente metilado. Como se muestra en las Figuras 8 y 9, los valores de Ct fueron proporcionales a la concentración de *McrBC* usada en secuencias tanto escasamente como densamente metiladas. La Figura 10 demuestra resultados de valoración de diferentes cantidades de *McrBC* para potenciar la resolución entre secuencias escasamente y densamente metiladas para distinguir entre las dos. En la Figura 10, "1x" es igual a 0,8 unidades de *McrBC* como se define por New England Biolabs.

35 La diana densamente metilada tiene medio sitios *McrBC* 2,75 veces más metilados que la diana escasamente metilada ($11/4=2,75$). Por tanto, tras el tratamiento con *McrBC* y posterior amplificación, los inventores esperan ver una diferencia entre el Ct de las reacciones de aproximadamente 1,46, como $2^{\Delta Ct} = 2,75$. Resolviendo para ΔCt , $\Delta Ct = \log(2,75)/\log(2) = 1,46$. Los inventores observaron que ΔCt (escaso - denso y 1x *McrBC*) era $1,51 \pm 0,05$. Por tanto, la densidad de metilación de un locus se determinó usando este procedimiento.

Ejemplo 10: Determinación de la densidad de metilación acoplada con bisulfito

40 Este ejemplo demuestra la capacidad para determinar la densidad de metilación de un locus mediante tratamiento con tanto bisulfito como una enzima de restricción dependiente de la metilación, seguido de amplificación por PCR y cuantificación de los productos amplificados.

45 Dos muestras de ADN, una purificada de glóbulos sanguíneos humanos y la otra purificada de un línea celular de glioma, se trataron con bisulfito. Entonces, las muestras se fraccionaron cada una en dos porciones, una porción de cada una se digirió con *McrBC*, mientras que la otra porción se dirigió con vector vacío (es decir, no se digirió con *McrBC*). Como la metilación (5mC) se protege de la conversión con bisulfito, todos los sitios *McrBC* siguen estando intactos en el ADN convertido.

50 De cada una de las cuatro porciones, 1 μ l, 2,5 μ l y 5 μ l, respectivamente, se utilizaron como molde para la amplificación por PCR, resultando 12 reacciones de PCR. También se analizaron un control negativo de no molde y un control positivo tratado con bisulfito. Los cebadores de PCR, que se diseñaron para hibridarse con la secuencia convertida con bisulfito de un locus de interés, y los reactivos de PCR se usaron en las 12 reacciones de PCR y en las reacciones de control positivo y negativo. La amplificación por PCR del locus se realizó durante varios ciclos que se determinó que eran limitantes y se evaluaron alícuotas de volúmenes iguales de las amplificaciones con electroforesis en gel de agarosa.

55 Los carriles marcados "sin tratar" en la imagen del gel de agarosa en la Figura 14 representan ADN convertido con bisulfito de glioma (izquierda) y sangre (derecha) que no se digirieron con *McrBC*. Los carriles marcados "*McrBC*" en la imagen del gel de agarosa en la Figura 14 representan ADN convertido con bisulfito de glioma (izquierda) y sangre (derecha) que se digirieron con *McrBC*. El tratamiento con *McrBC* produjo una disminución en la señal del amplicón de PCR de ambas muestras, sugiriendo que ambas muestras contienen al menos algún 5mC.

Adicionalmente, la señal del amplicón de PCR de las alícuotas de sangre tratadas con *McrBC* fue superior a la señal del amplicón de PCR de las alícuotas de glioma tratadas con *McrBC*, sugiriendo que la densidad de *McrBC* en la muestra de glioma fue superior a la densidad de *McrBC* en la muestra de sangre.

5 Para determinar independientemente la densidad de metilación en las muestras, la secuenciación con bisulfito se realizó en aproximadamente diez y treinta amplicones de PCR clonados a partir de las muestras de glioma y sangre tratadas con bisulfito, respectivamente. El análisis de secuencias se realizó para tabular el porcentaje de metilación en cada CpG en el locus de interés para cada una de las muestras. Las posiciones de CpG en el locus están indicadas como tic en la línea superior en la Figura 14, y la segunda fila de gráficas en la Figura 14 representa la densidad de metilación de cada CpG en cada muestra. Las barras (rojas en la gráfica de glioma y verdes en la gráfica de sangre) ilustran el porcentaje de tiempos que cada CpG se secuenció a medida que se metilaba (es decir, se secuenció como "C" en vez de "T" siguiendo el tratamiento con bisulfito, amplificación y clonación y secuenciación). La densidad de metilación absoluta determinada por secuenciación con bisulfito fue del 92% en células de glioma y del 7% en glóbulos sanguíneos normales. La confirmación independiente y los resultados de PCR con bisulfito acoplada a *McrBC* concordaron con lo anterior.

15 Ejemplo 11: Determinación de la densidad de metilación

Este ejemplo demuestra la capacidad de enzimas de restricción dependientes de la metilación y sensibles a la metilación para distinguir diferentes densidades de metilación en un locus.

20 Se amplificó una porción de 703 pb del promotor de p16. La porción se metiló *in vitro* en un transcurso de tiempo con *M.SssI* en condiciones que promovían la metilación estocástica. La porción se ilustra en la Figura 15. A partir de la gran reacción de metilación en diferentes momentos de tiempo, los volúmenes de tiempo fijados (20 μ l) se eliminaron y las reacciones de metilación se detuvieron con calor (65°C). Los inventores pararon una reacción antes de que empezara (T= 1 es 0 minutos de metilación, es decir, el control sin metilar; T=2 se detuvo a 2 minutos; T=3 se detuvo a 5 minutos; y T=4 se detuvo a 60 minutos, un tiempo al que el producto de PCR en la reacción debería de haberse metilado completamente.

25 Las reacciones se purificaron y cada amplicón se diluyó luego más de 1 millón de veces en tampón TE, y se añadió de nuevo al genoma humano a una relación que debería aproximarse a un equilibrio de copias normal (es decir, dos copias por 7,9 picogramos). El genoma humano usado fue homocigótico para una delección del gen p16. La línea celular de delección es CRL-2610. Esto permitió que los inventores añadieran una cantidad fija del genoma humano (es decir, control de la complejidad del genoma en la reacción de los inventores).

30 Las muestras de ADN se escindieron con *Aci I* (una enzima de restricción sensible a la metilación), *McrBC* (una enzima de restricción dependiente de la metilación), o ambas como digestiones dobles, y la porción se amplificó. Los amplicones se detectaron con el sistema de PCR en tiempo real con SYBR Green MS_p16(207). Veinte nanogramos de ADN de entrada (genoma + amplicón) son iguales a ~2764 equivalentes celulares/por reacción de PCR. Cada conjunto de cuatro digestiones se enrasó en sales de restricción con BSA y GTP de forma que pudiera fraccionarse en cuatro tubos (~ 4 μ g). Cada uno de los cuatro tubos de digestión (~ 1 μ g) tuvieron 100 μ l de volumen total de forma que 2 μ l pudieron añadirse a reacciones de PCR, añadiéndose así 20 ng de ADN. Se dejó que las digestiones avanzaran durante cuatro horas y se destruyeron por calor durante 20 minutos. Las condiciones de PCR:

CAGGGCGTCCAGGAGGAGGTCTGTGATT = Cebador directo (SEQ ID N°: 4)

40 GGCGCTGCCCAACGCACCGAATAGTTACGG= Cebador inverso (SEQ ID N°: 5)

Tampón Dynamo MJ qPCR, hibridación a 65°C, PCR de dos ciclos (95°C 30 s, 65°C 20 s), se cicló 49 veces y se monitorizó con un sistema de PCR cuantitativa MJ opticon II.

Los inventores han planteado como hipótesis que si la tecnología está monitorizando la densidad:

- 45 a) La escisión con *McrBC* debe demostrar Δ Ct mayor para cada muestra en una progresión de Δ Ct 0 para T=1, hasta un Δ Ct máximo a T=4 (60 minutos)
- b) Las reacciones con *Aci I* deben demostrar la relación inversa.
- c) Las digestiones tratadas con vector vacío y dobles deben ser puntos de referencia fijos

50 Como se ilustra en la Figura 16, los inventores observaron las tendencias explicadas resumidamente anteriormente. La curva de *McrBC* se mueve opuestamente de la curva de la *Aci I*, y el movimiento está en proporción con el contenido de metilación creciente en el locus. Las digestiones sin tratar y dobles indican los límites del campo de ensayo. El sistema resuelve la diferencia entre cada una de las reacciones a lo largo del transcurso de tiempo, de forma que cada representación gráfica que muestra las diversas reacciones temporales es diferente. El momento en el que el perfil interseca con la línea del umbral de rayas indica el momento en el que se compara la información.

Otra forma de visualizar los datos es representando el cambio en valores umbral de ciclo (Δ Ct). Véase la Figura 17.

La Figura 17 muestra el ΔCt para tratado con *McrBC* en comparación con sin tratar en cada momento de tiempo en la reacción de metilación parcial, y el ΔCt correspondiente para las digestiones con *Aci I* (*Aci I* en comparación con sin tratar). Como es de esperar, las líneas de ΔCt de *McrBC* y *Aci I* proporcionan un patrón inverso intersecante. La gráfica *Aci I* muestra una forma maciza debido a que sus locus de corte están fijos, mientras que *McrBC* muestra una distribución continua suave, reflejando su capacidad para cortar más o menos aleatoriamente tras el reconocimiento del sitio. La frecuencia de corte es proporcional al cambio esperado en la ocupación de metilación basándose en el transcurso de tiempo. Se indican las barras de error asociadas a las mediciones en tiempo real. Si no se visualizan, están dentro del punto de datos.

Ejemplo 12: Monitorización de la metilación de ADN de una secuencia diana presente en múltiples localizaciones en el genoma

Este ejemplo demuestra la capacidad de la presente tecnología para determinar la metilación de una secuencia diana que está presente en un genoma más de una vez (es decir, más de una copia) usando un ensayo que monitoriza una secuencia repetida en la agrupación de genes kafirina en *Sorghum bicolor*.

Se anotaron once genes kafirina de la secuencia públicamente disponible de un clon de BAC AF527808 de *Sorghum bicolor*. Los cebadores de PCR se diseñaron para amplificar un amplicón de 247 pb de los 11 genes kafirina (las secuencias del cebador se conservaron en los 11).

El cebador directo fue 5' CTCCTTGCGCTCCTTGCTCTTTC 3' (SEQ ID N°: 6)

El cebador inverso fue 5' GCTGCGCTGCGATGGTCTGT 3' (SEQ ID N°: 7)

ADN genómico de sorgo aislado de hoja de planta de semillero se dividió en 6 porciones iguales. Las seis porciones se trataron del siguiente modo: i) sin tratar (tratadas con vector vacío), ii) digeridas con *HhaI*, iii) digeridas con *McrBC*, iv) digeridas con *HhaI* y *McrBC*, v) digeridas con *PstI* y vi) digeridas con *PstI* y *McrBC*. Alícuotas de volumen igual de las seis porciones se amplificaron usando los cebadores de PCR anteriores del siguiente modo:

Los parámetros de ciclado por PCR en tiempo real de SYBR Green fueron 95°C durante 3 minutos, seguido de 50 ciclos de PCR de 2 etapas a 95°C durante 30 s, 56°C durante 30 segundos con el kit Dynamo de MJ Research (Boston, MA). Los inventores utilizaron tanto una lectura de placas a baja temperatura (70°C) como a alta temperatura (82°C). La entrada de ADN genómico fue 10 ng por reacción de PCR. El umbral se fijó usando un control patrón de la dilución del molde.

Los perfiles cinéticos para las 6 reacciones de PCR se representan en la Figura 19. El inserto en la Figura 19 representa la curva patrón de la dilución del molde usada para fijar el umbral de ciclos para el experimento. Cada conjunto de 6 digestiones se realizó tres veces, y cada una de las 18 digestiones tuvo cuatro repeticiones de PCR. Se determinó que las reacciones de PCR eran altamente reproducibles. En la Figura 19, la cinética de la reacción de amplificación por PCR para cada una de las seis digestiones se representa con diferentes colores: Rojo = tratado con vector vacío, Azul = digerido con *McrBC*, Naranja = digerido con *HhaI* y Verde = digestión doble con *HhaI* + *McrBC*, Rosa = *PstI* y Azul celeste = digestión doble con *PstI* + *McrBC*. Se hicieron comparaciones entre los umbrales de ciclos de las seis digestiones amplificadas y se determinó la densidad de CNG y la metilación de CG en la secuencia diana repetida.

En los 11 genes kafirina, todos los sitios *PstI* en la secuencia diana repetida se metilaron (en CNG) y la digestión con *PstI* se bloqueó ya que la muestra tratada con *PstI* (rosa) tenía el mismo umbral de ciclos (Ct) que la muestra tratada con vector vacío (rojo). Este resultado se soporta por la muestra digerida con *McrBC* (azul), que tiene un Ct significativamente mayor que el control de ADN tratado con vector vacío (rojo), demostrando adicionalmente que la metilación de CNG existe debido a que *McrBC* pudo cortarse, reduciéndose así el número de copias intactas de la secuencia diana. Todos, o casi todos, los sitios *PstI* están metilados debido a que la digestión doble con *PstI* + *McrBC* (azul claro) tiene el mismo Ct que *McrBC* sola (azul). Obsérvese que la digestión con *McrBC* con y sin *PstI* da el mismo Ct, mientras que *HhaI* con *McrBC* (verde) da un mayor Ct en promedio; sugiriendo que no todos los sitios *HhaI* se metilaron y que *HhaI* pudo reducir el número de copias intactas de la secuencia diana. Estos resultados indican que cada secuencia diana tiene una alta metilación de CNG que cubre todos los sitios *PstI*, mientras que algunos sitios *HhaI*, pero no todos, están metilados, que indica la metilación de CG parcial de sitios *HhaI* en la secuencia diana. La especificidad de cada reacción se confirmó usando análisis de curvas de fusión.

Para los genes kafirina, la diferencia promedio en Ct entre las digestiones individuales con *McrBC* y dobles con *HhaI* + *McrBC* es 2,46 ciclos ($22,08 \pm 0,34$ *HhaI* + *McrBC* - $19,62 \pm 0,19$ *McrBC*). Los inventores compararon los umbrales de ciclos de ADN genómico que se habían sometido a diversos tratamientos y dedujeron ocupación de la metilación mediante los cambios en Ct mediados por los tratamientos. El Ct de cualquier locus es una función del número de copias presentes dentro del tubo de ensayo. Cada uno de los once genes se rompió en trozos de ~1,5 kb que se alinearon para crear un ensamblaje de kafirina consenso (Figura 18). La secuencia de kafirina consenso se examinó y se seleccionaron cebadores de PCR que amplifican un amplicón de 247 pb (véase anteriormente).

Al igual que para la metilación de CG, la muestra digerida con *HhaI* (naranja) tiene la misma Ct que el control tratado con vector vacío (rojo); sin embargo, la digestión doble con *HhaI* + *McrBC* (verde) tiene un Ct que es 2,46 ciclos mayor que *McrBC* sola (azul), que indica que algunos sitios *HhaI* no deben modificarse. Una diferencia de umbral de ciclos de 2,46 indica que hay $2^{2.46}$, o aproximadamente 5,5 veces, menos ADN en la muestra digerida doble con *HhaI* + *McrBC*. Esto sugiere que 2 de los 11 genes tienen algunos sitios *HhaI* sin metilar.

Para confirmar independientemente la presencia de metilación en la secuencia diana repetida se generó una 1x secuencia de sorgo del genoma del sorgo filtrado con metilo (véase la publicación de patente de EE.UU. n° 20010046669, Bedell y col., PLOS en prensa). Se determinó que el 95% de los genes en el genoma del sorgo estaban representados en el conjunto de secuencias filtrado con metilo. Sin embargo, en la agrupación de genes kafirina, sólo 2 de los 11 genes del clon de BAC AF527808 se representaron en el conjunto de secuencias filtrado con metilo, sugiriendo que la mayoría o todos ellos pueden estar metilados y, por tanto, están representados por disminución en la secuencia filtrada con metilo. Diez de los genes están expuestos en tándem en un conjunto y comparten un promedio del 99,1% de identidad de secuencias, mientras que el onceavo gen se localiza a 45 kb y está más separado (76,2% de identidad en promedio). Se seleccionó una región de 247 pb para PCR próxima al extremo 5' debido a su identidad próxima a través de los 11 genes y debido al alto contenido de CG y CNG (véase la Figura 18). La confirmación independiente de la metilación en la secuencia diana guardó relación con la determinación de la metilación hecha por análisis de la reacción cinética del ADN digerido amplificado.

Los ejemplos anteriores se proporcionan para ilustrar la invención pero no para limitar su alcance. Otras variantes serán rápidamente evidentes para un experto en la materia y están englobadas por las reivindicaciones adjuntas.

20

REIVINDICACIONES

1. Un procedimiento para cuantificar la densidad de metilación en un locus de ADN genómico en comparación con un control, procedimiento que comprende
 digerir parcialmente ADN genómico con *McrBC* en el que dicha digestión no se lleva a cabo hasta completitud;
- 5 cuantificar copias intactas del locus por amplificación cuantitativa, produciéndose así un producto de amplificación; y
 comparar la cantidad de copias intactas del locus con un valor de control que representa la cantidad de metilación de ADN de control, cuantificándose así la densidad de metilación en el locus en comparación con la densidad de metilación del ADN de control.
- 10 2. El procedimiento de la reivindicación 1, en el que la cantidad de producto de amplificación se compara con una curva patrón.
3. El procedimiento de la reivindicación 1, en el que el valor de control representa la cantidad de un producto de amplificación de una muestra de ADN que tiene un número conocido o predicho de nucleótidos metilados.
4. El procedimiento de la reivindicación 1, en el que
 15 el procedimiento comprende además poner en contacto el ADN genómico con un agente que modifica citosina sin metilar antes de la etapa de amplificación, y
 al menos uno de los dos cebadores de oligonucleótidos distingue entre ADN sin metilar y metilado modificado en el ADN genómico.
5. El procedimiento de la reivindicación 4, en el que el agente es bisulfito de sodio.
- 20 6. El procedimiento de la reivindicación 1, en el que el valor de control se genera poniendo en contacto ADN que comprende un locus de control con *McrBC*; amplificar el locus de control; y determinar la cantidad de producto de amplificación.
7. El procedimiento de la reivindicación 6, en el que el locus de control se sabe o se predice que está sin metilar.
8. El procedimiento de la reivindicación 1, en el que el valor de control comprende un número conocido de nucleótidos metilados.
- 25 9. Un procedimiento de cálculo de la densidad de metilación relativa para un locus diana en una muestra de ADN en comparación con un control, procedimiento que comprende,
- i. digerir parcialmente la muestra de ADN con *McrBC* en el que dicha digestión no se lleva a cabo hasta completitud;
- 30 ii. amplificar cuantitativamente copias intactas del locus en la muestra de ADN después de las etapas de puesta en contacto;
- iii. identificar el valor umbral de ciclos (Ct) para la porción amplificada de la muestra de ADN; y,
- iv. determinar la densidad de metilación relativa para el locus diana calculando la diferencia (ΔCt) entre Ct de la muestra de ADN y un valor de Ct de control, en el que $2^{-\Delta Ct}$ es proporcional a la densidad de metilación relativa entre la muestra de ADN y el control.

35

FIG. 1

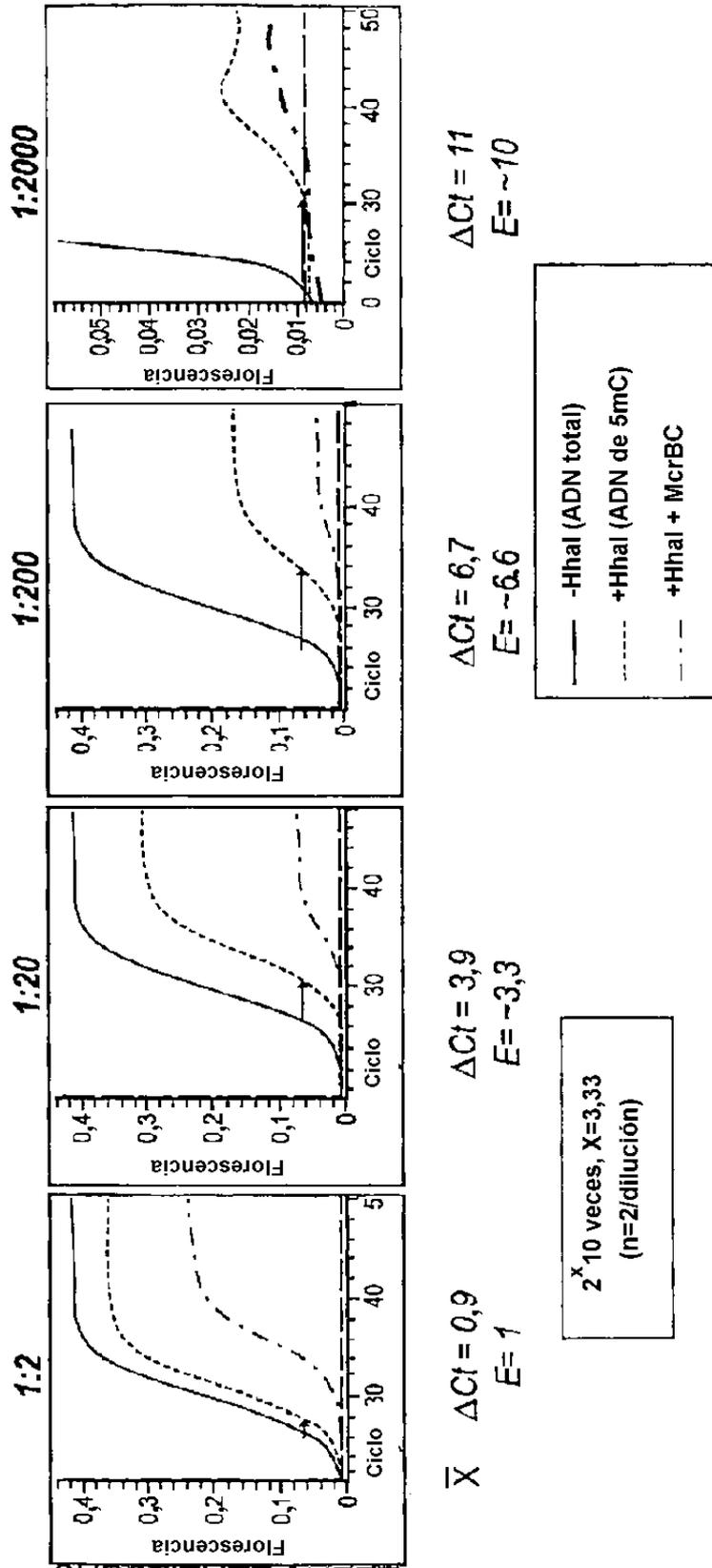


FIG. 2

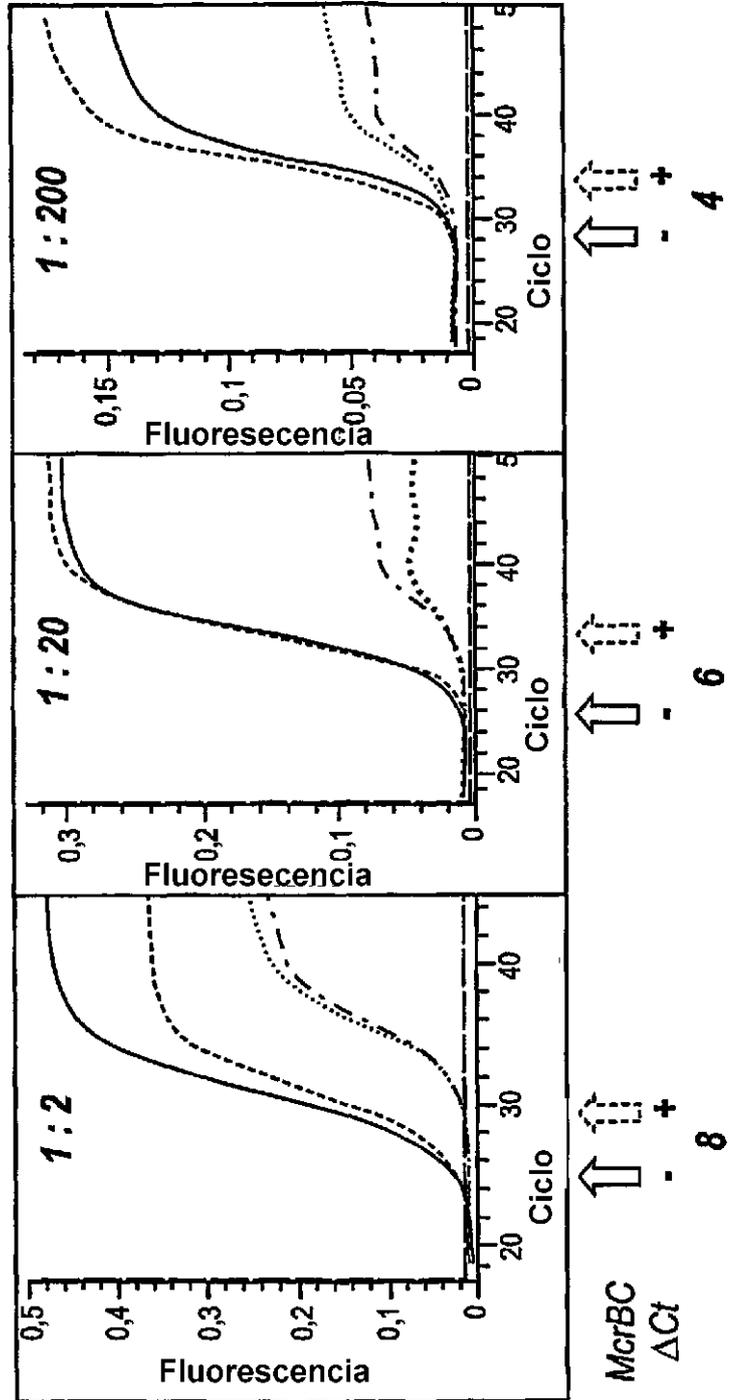
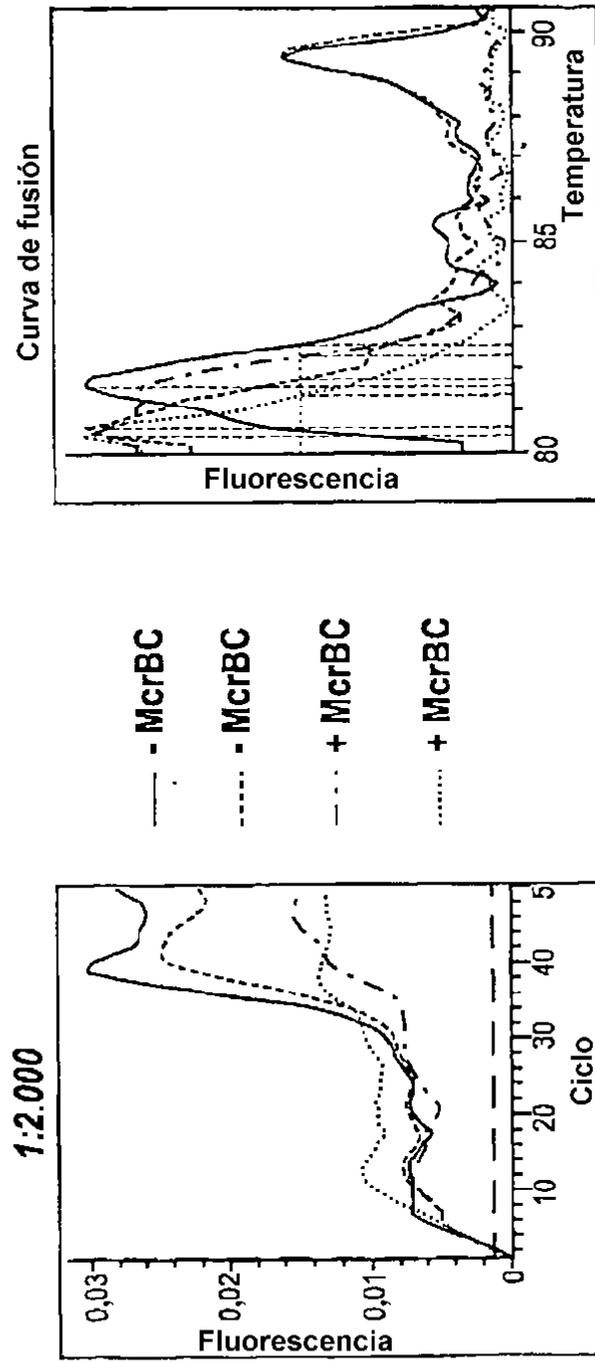


FIG. 3

Dilución 1:2000: metilación densa,
ADN digerido con HhaI (entrada de 20 ng)



Sensibilidad de 1:2.000 confirmada por curva de fusión

FIG. 4

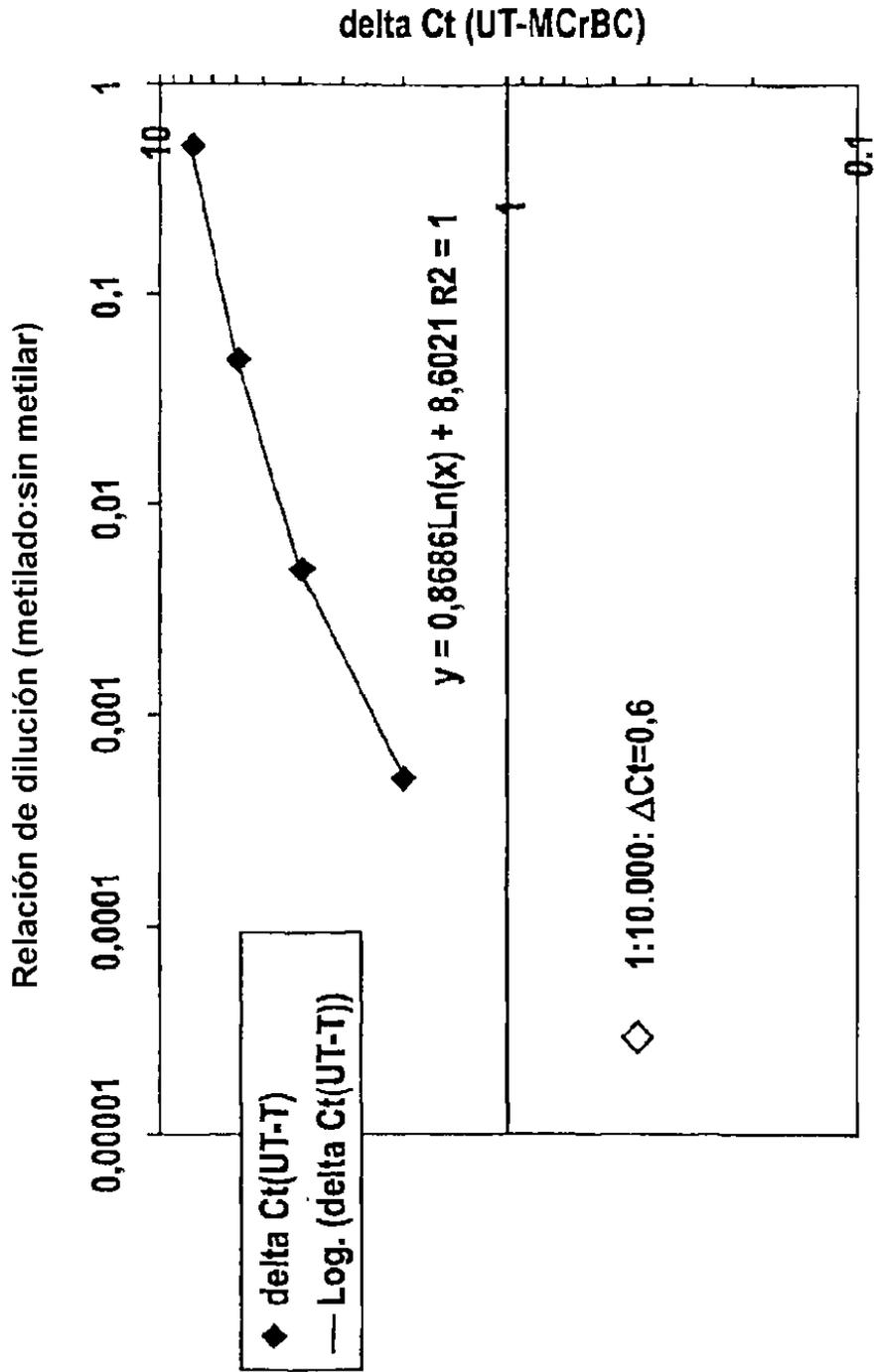


FIG. 5

- ¿Cuántas células equivalentes encontraron los inventores?
- 20 ng de ADN genómico total es ~2.764 equivalente celulares
- El rendimiento de un núcleo de biopsia típico ~ 1 µg

<u>Dilución</u>	<u>EC metilados</u>	<u>EC sin metilar</u>	<u>EC totales</u>
1:2	~1.400	1.364	2,764
1:20	~140	2.624	2,764
1:200	~14	2.750	2,764
1:2.000	~1.4	2.762	2,764

FIG. 6

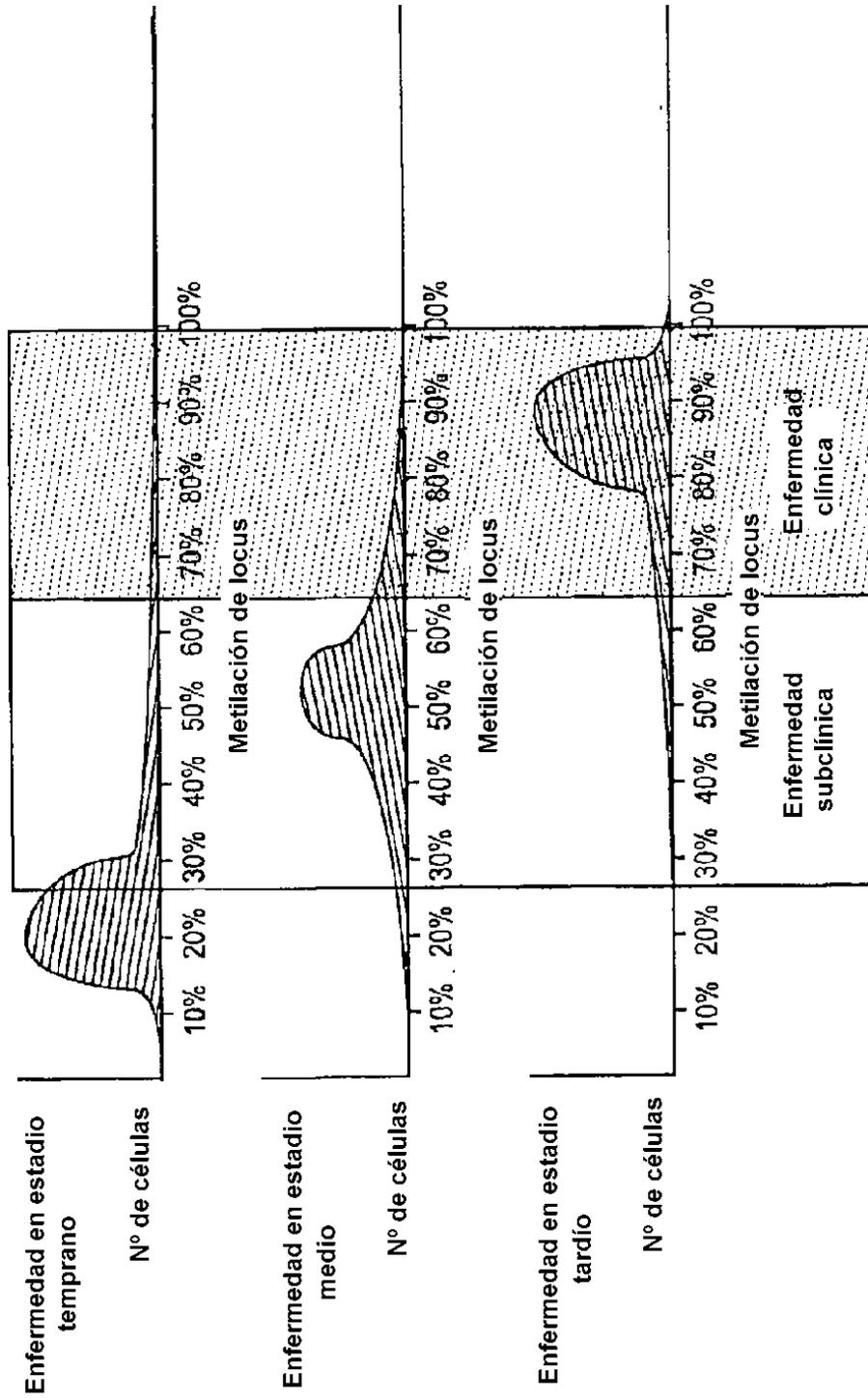


FIG. 7

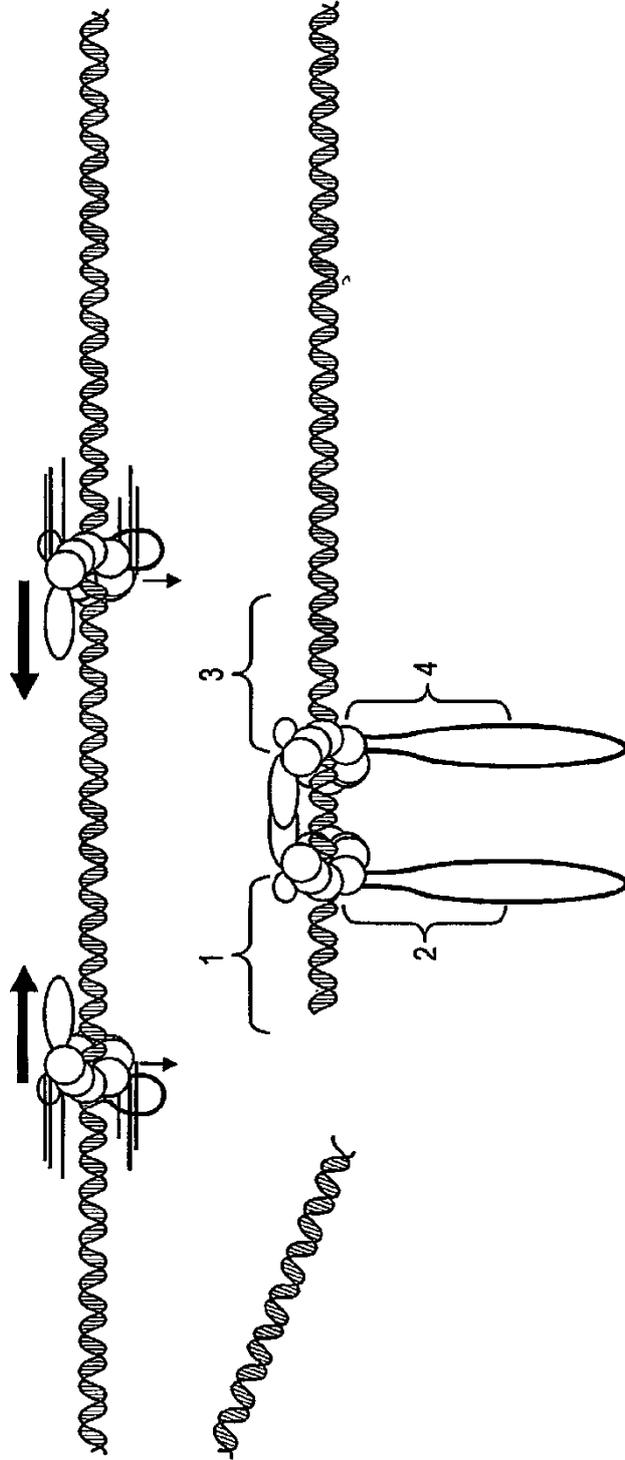
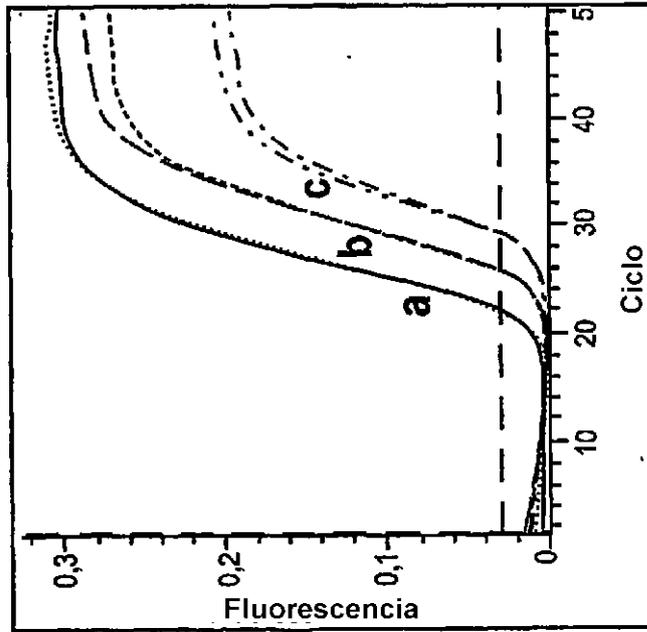


FIG. 8

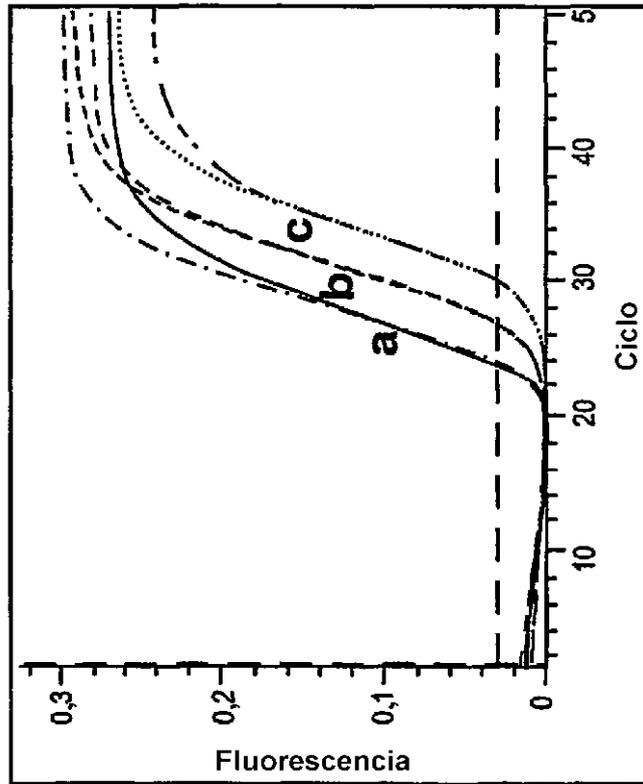


a) BAC con metilación escasa
-Digerido con Hha
- 1 x *McrBC*
- qPCR de biomarcador

b) BAC con metilación escasa
-Digerido con Hha
- 5 x *McrBC*
- qPCR de biomarcador

c) BAC con metilación escasa
-Digerido con Hha
- 25x *McrBC*
- qPCR de biomarcador

FIG. 9



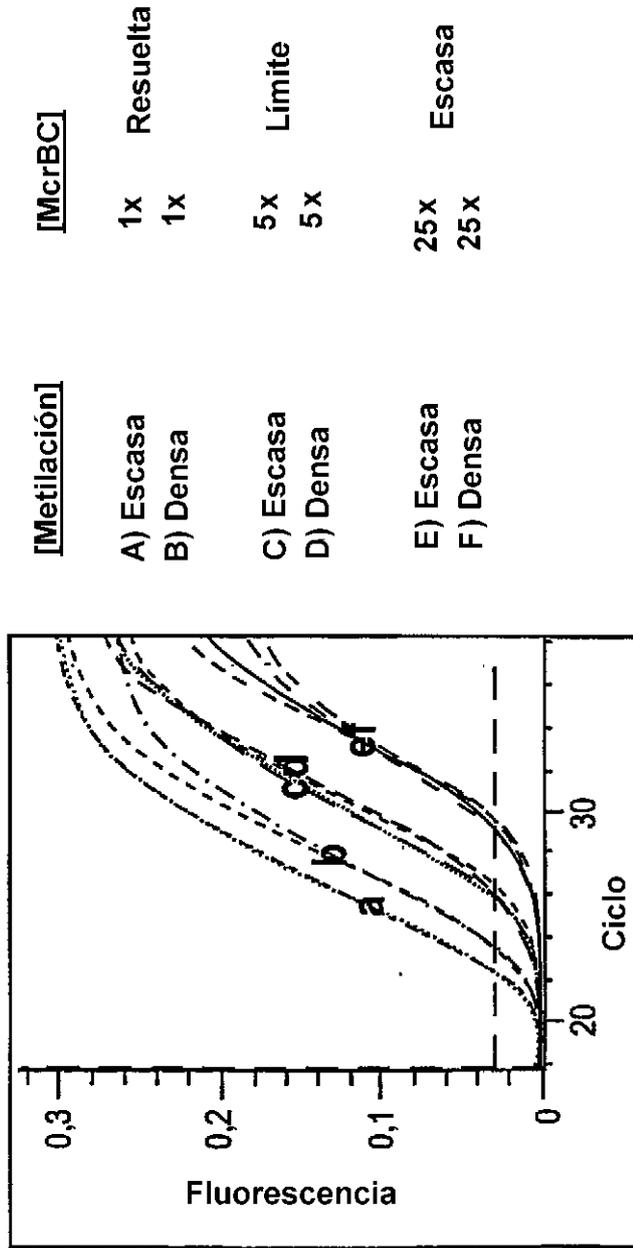
a) BAC con metilación escasa
- Digerido con Hha
- 1 x *McrBC*
- qPCR de biomarcador

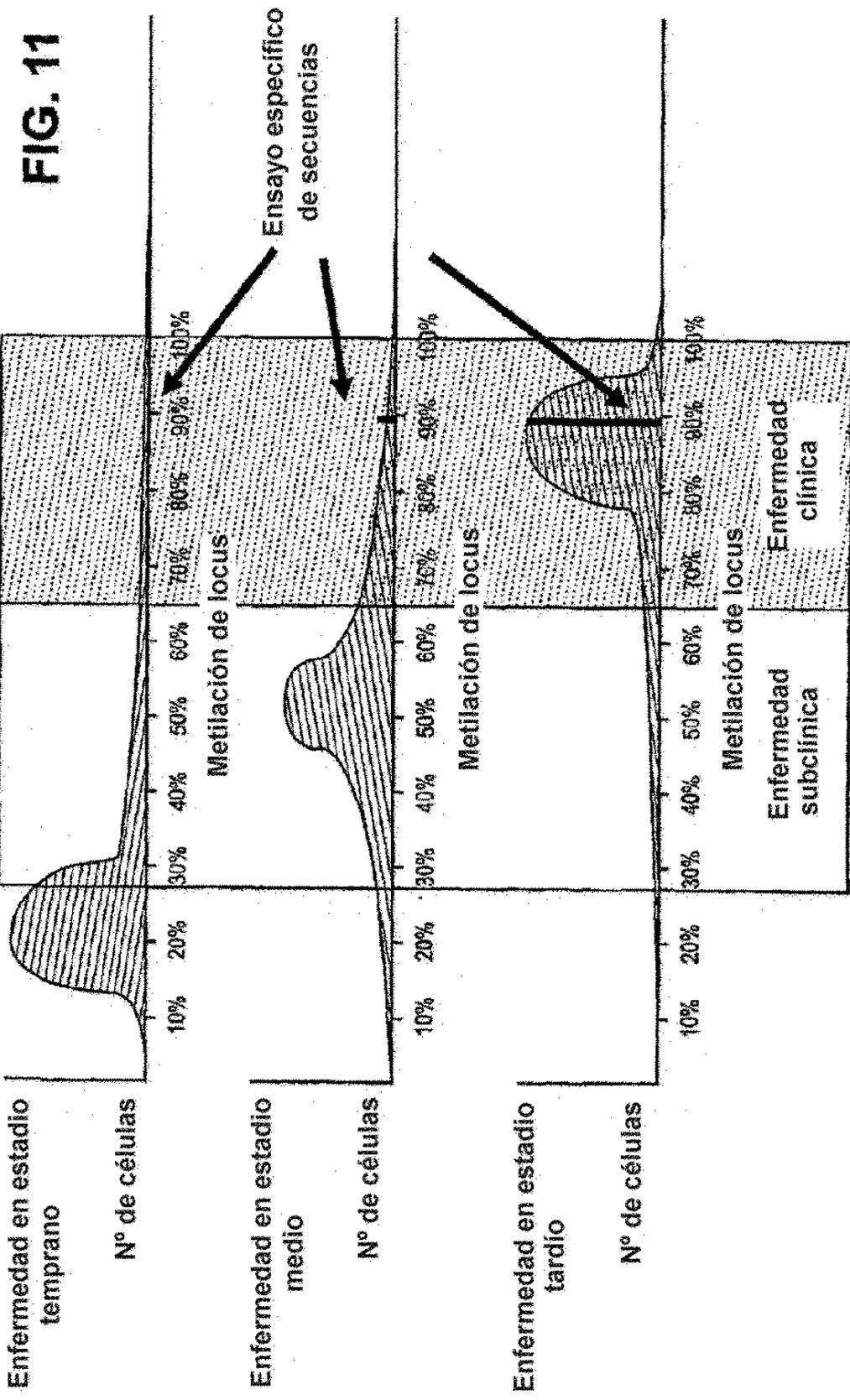
a) BAC con metilación escasa
- Digerido con Hha
- 5 x *McrBC*
- qPCR de biomarcador

a) BAC con metilación escasa
- Digerido con Hha
- 25x *McrBC*
- qPCR de biomarcador

FIG. 10

M.SssI 0,8U McrBC





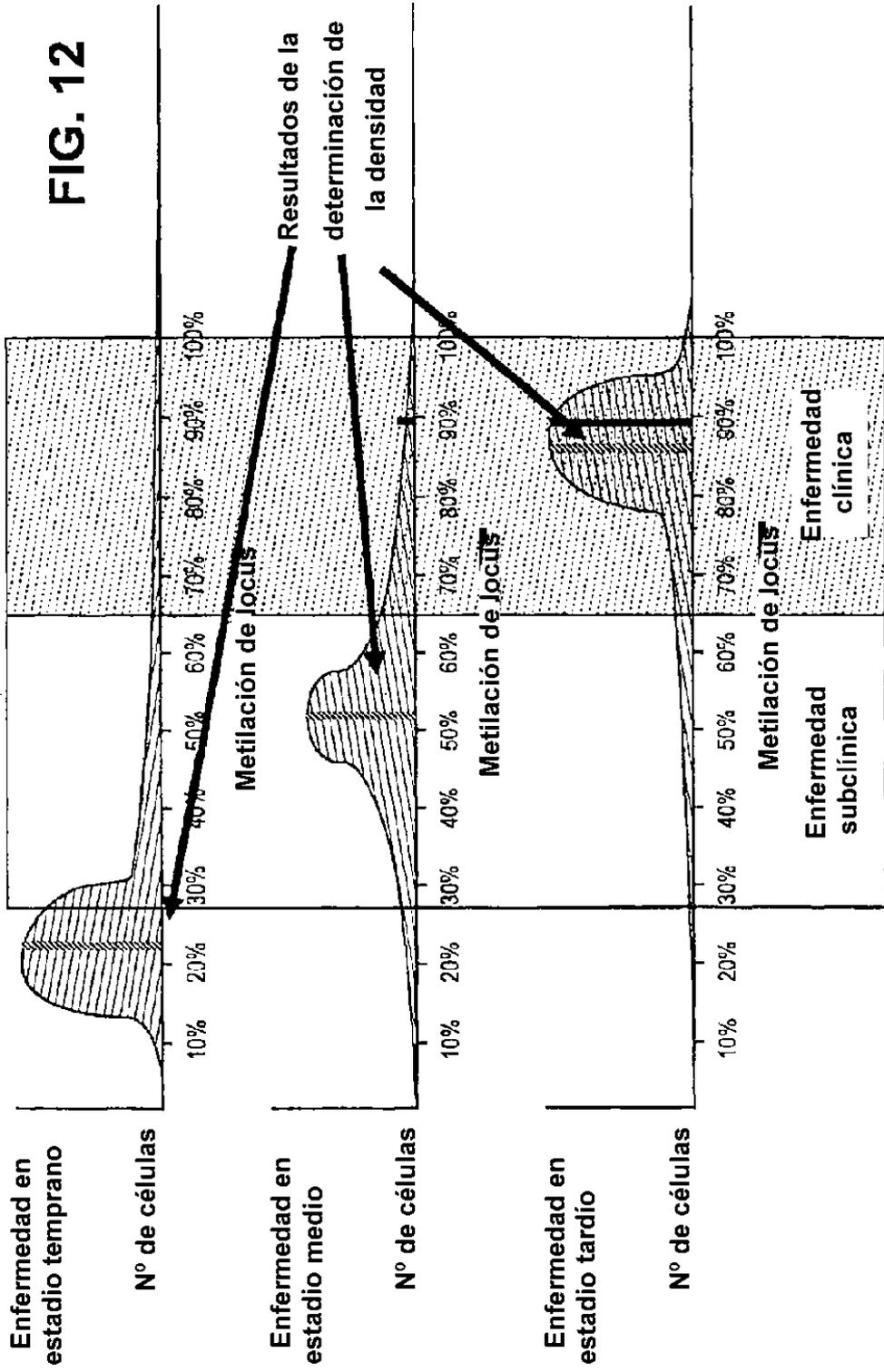


FIG. 13

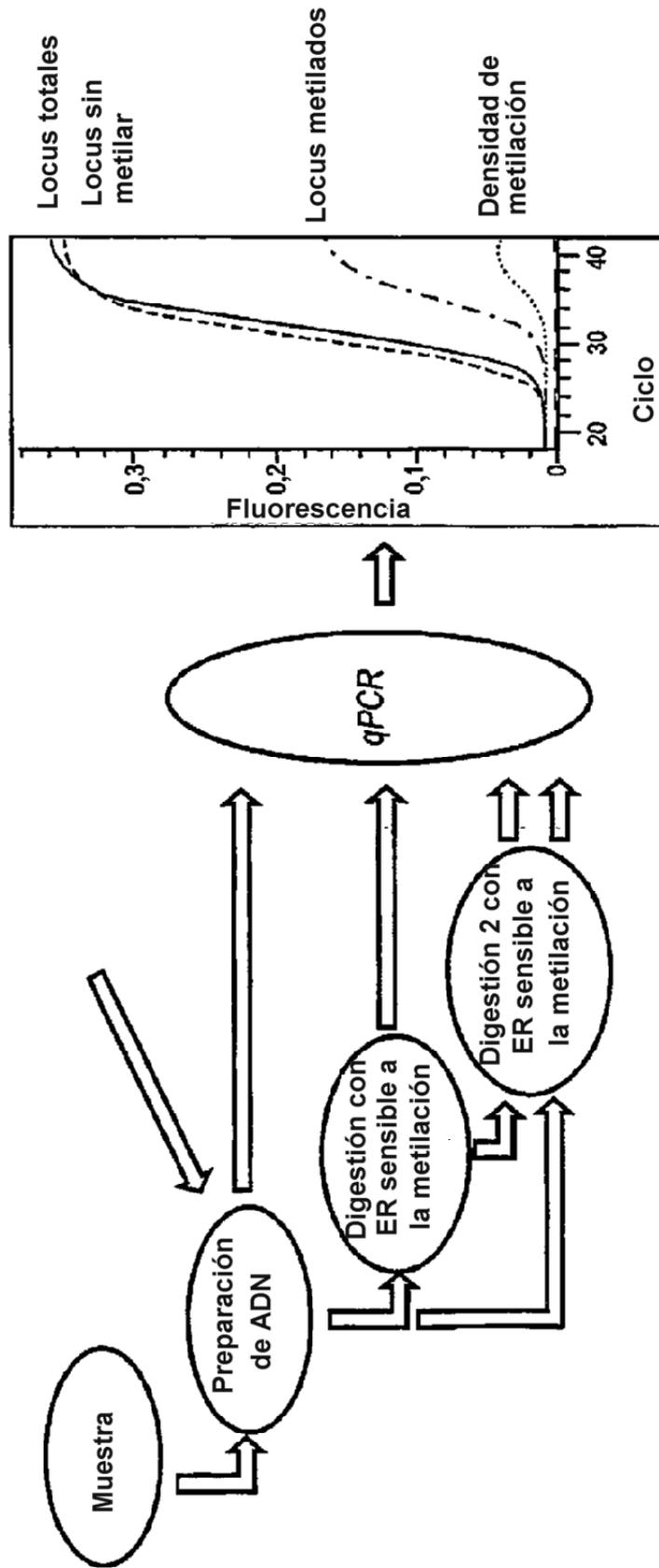


FIG. 14

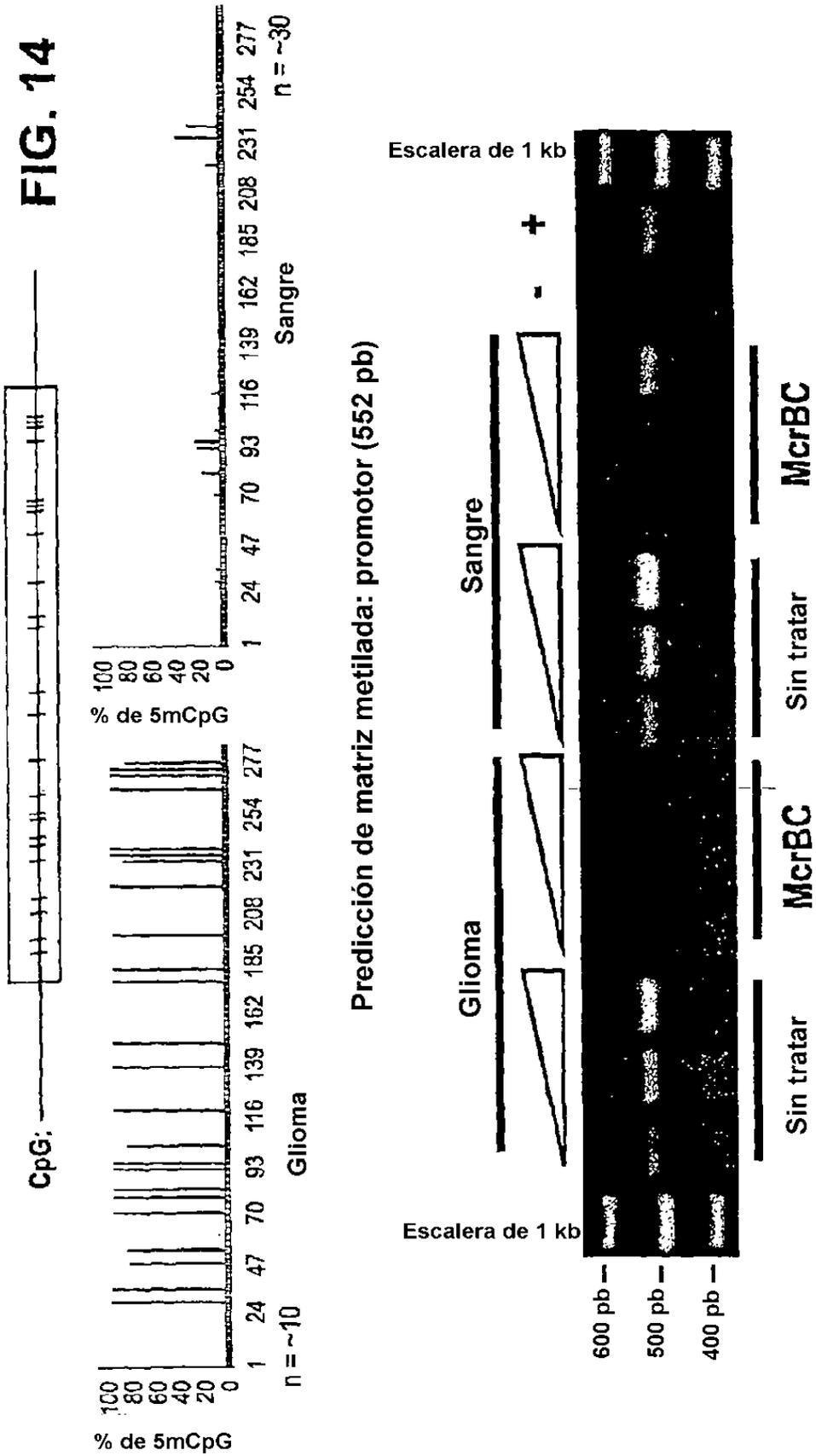
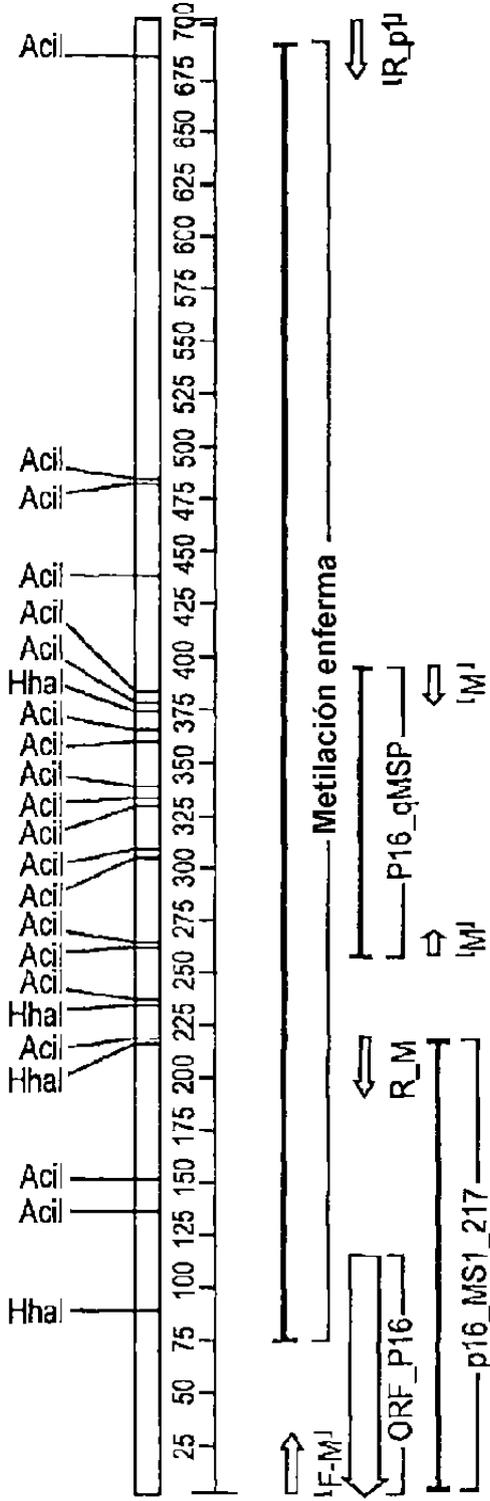


FIG. 15

H.s. CDKN2A



P16_qMD_Test_Amp.seq
 CAGGGCGTCCGAGGAGGTTCTGTGATTACAAACCCCTTCTGAAAACCTCCCCAGGAGCCCTCCCTTTTCCCGG
 AGAATCGAAGCGTACTGATTCCAATTCCTGCAAACTTCGTCCCTCCAGAGTCGCCCGCCATCCCTGCTCCCG
 CTGCAGACCTCTACCCACCTGGATCGGCTCCGACCGTAACTATTGGTGGTTGGCAGCGCCCGCCCTCCAG
 CAGGCCCGCACCTCCTATACCGACCCCGGCCGCTGGCCAGCCAGTCAGCCGAAGGCTCCATGCTGCTC
 CCGGCCCGGTCATGCTGCTCCCGCCCGCTGCTCTMCCCCCTCCGACGCCCGCCAGCCGACCGG
 GTCCGCCACCTCTGGTGACCAAGCCAGCCCTCTTCTTCTCCGCTGGCGGAGAGCCCTCCGAC
 CCTGTCCCTCAAATCCTTGGAGGACCGGGTATCTTCCAGGCAAGGGACGCYGTGAGCGAGTGTCTGGAGGA
 GGTGCTATTAACTCCGAGCACTTAGGCAATGTGGCACCCCTGAAGTCGCCCCAGGTTGGGTCTCCCGGGGGCAC
 CAGCCGGGAGCGCCCTCGCCAGAGCCAGCGTTGGCAAGGAGGAGGACTGGGCTCCTCCCACTGCCCCCA
 CCGCCCTCCGGCCTCCCTG

FIG. 16

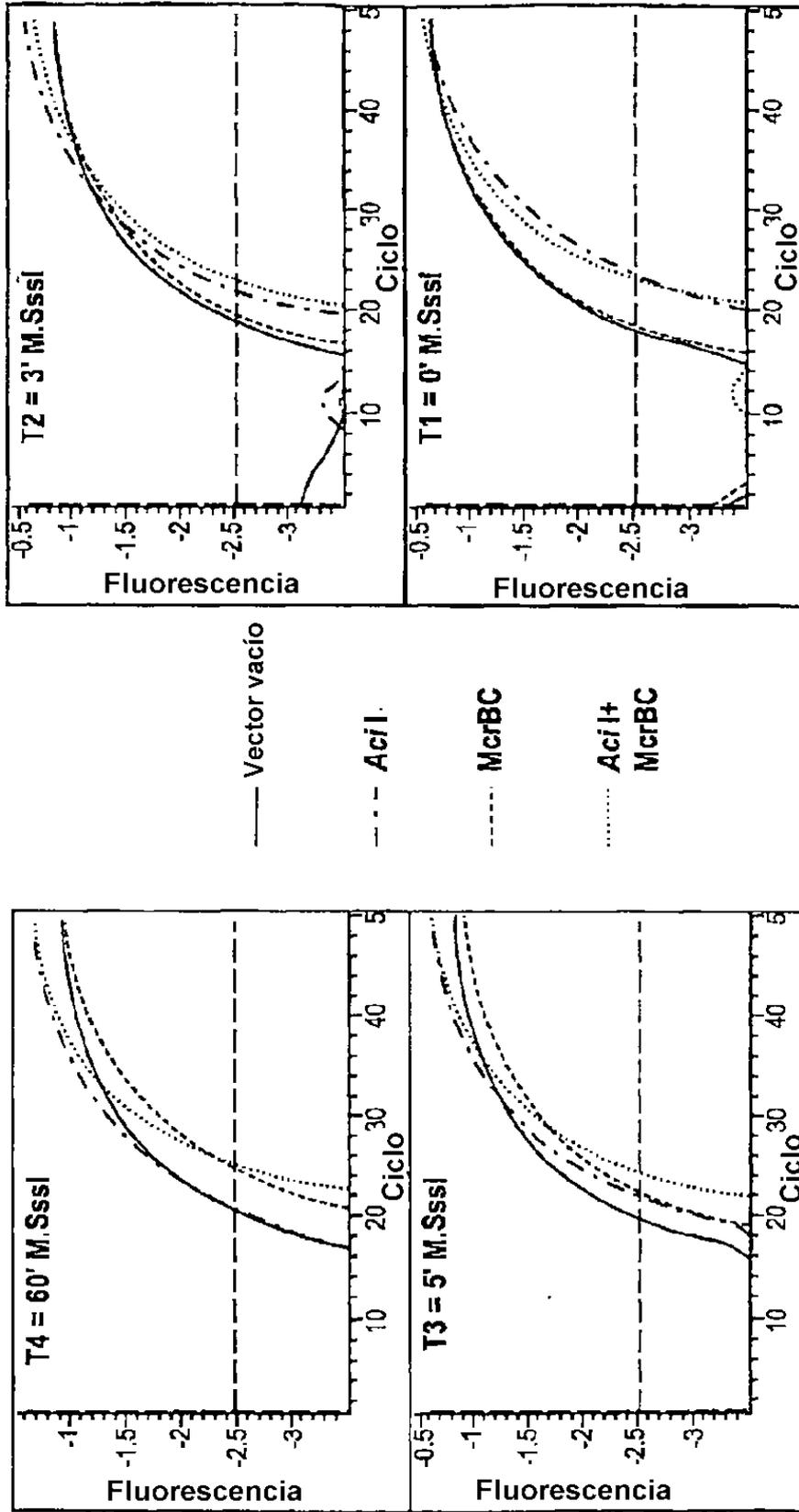


FIG. 17

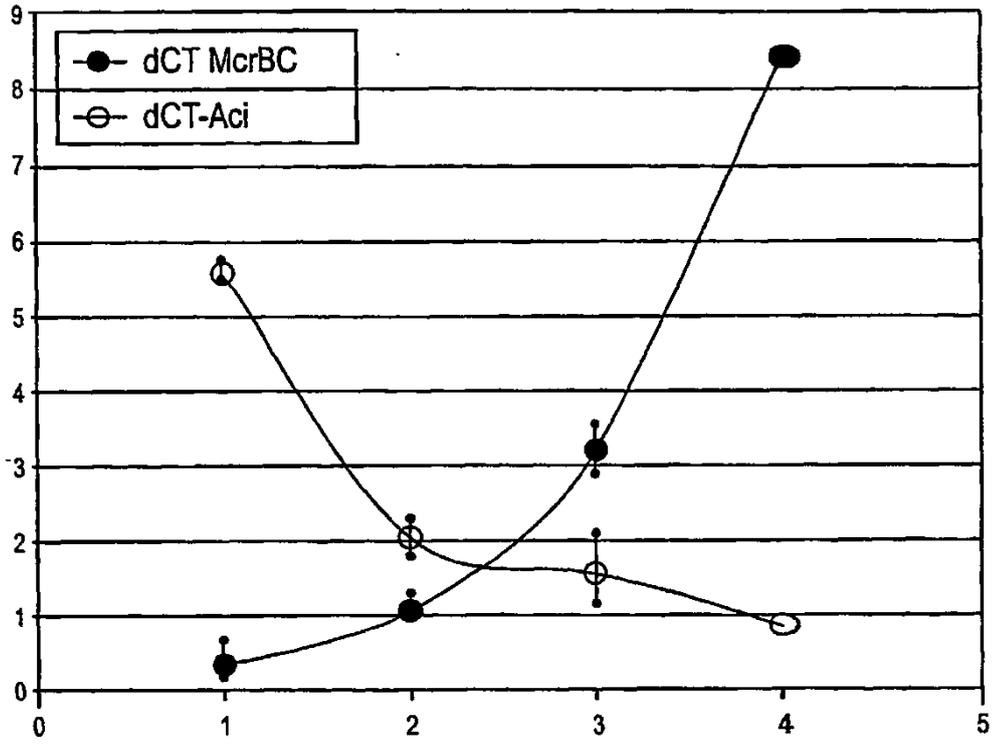


FIG. 18

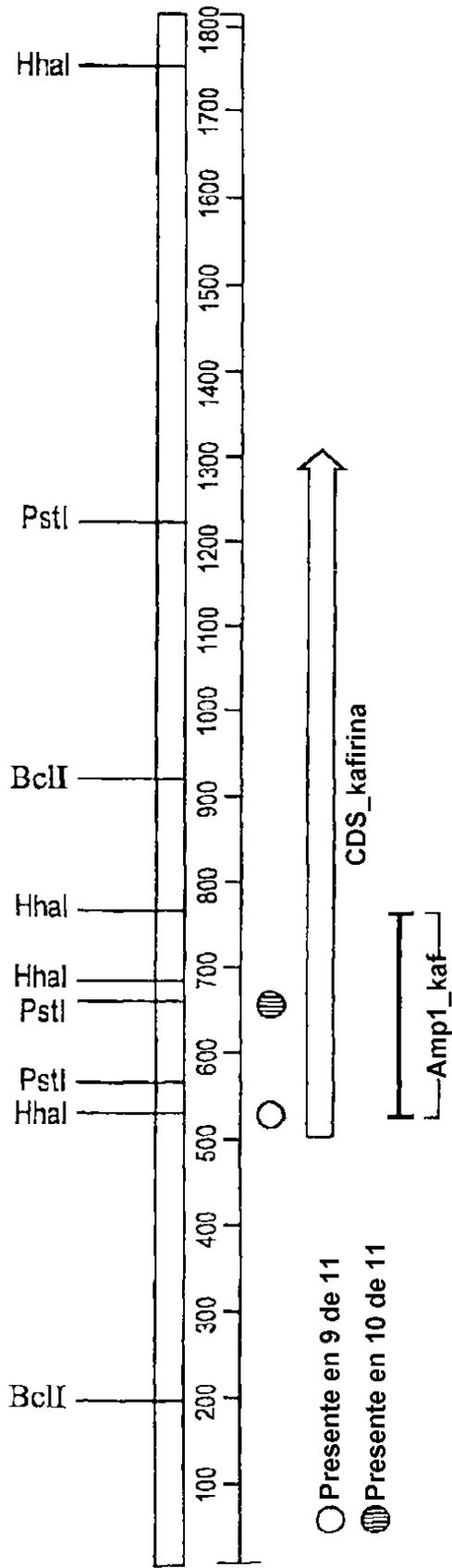


FIG. 19

