

19



OFICINA ESPAÑOLA DE
PATENTES Y MARCAS

ESPAÑA



11 Número de publicación: **2 401 110**

51 Int. Cl.:

C12Q 1/68 (2006.01)

12

TRADUCCIÓN DE PATENTE EUROPEA

T3

96 Fecha de presentación y número de la solicitud europea: **03.03.2005 E 05707697 (8)**

97 Fecha y número de publicación de la concesión europea: **02.01.2013 EP 1761639**

54 Título: **Análisis de ácido nucleico metilado**

30 Prioridad:

18.06.2004 GB 0413688

45 Fecha de publicación y mención en BOPI de la traducción de la patente:
17.04.2013

73 Titular/es:

**NOVARTIS FORSCHUNGSSTIFTUNG,
ZWEIGNIEDERLASSUNG (100.0%)
Friedrich Miescher Institute for Biomedical
Research Maulbeerstrasse 66
4058 Basel, CH**

72 Inventor/es:

**SCHUEBELER, DIRK y
WEBER, MICHAËL PHILIPPE**

74 Agente/Representante:

CARPINTERO LÓPEZ, Mario

ES 2 401 110 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

Análisis de ácido nucleico metilado

Campo técnico

5 La presente invención se refiere, en general, a procedimientos y materiales para uso en el enriquecimiento y análisis de ADN metilado y en la identificación de sitios metilados aberrantemente en una enfermedad.

Técnica antecedente

10 Se han encontrado bases nucleótidas metiladas tanto en procariotas como en eucariotas (Achwal et al., 1983). Las encontradas en eucariotas incluyen 5-metilcitosina, 6-metiladenina y 7-metilguanina en el ADN (Achwal et al., 1983) y 5-metilcitosina (Hernandez-Blazquez et al, 2000) y 7-metilguanosina (Tebib et al., 1997) en el ARN. La metilación de reversible de las citosinas, normalmente en dinucleótidos CpG, es una modificación común del ADN en eucariotas superiores, incluyendo plantas y animales.

15 La metilación del ADN puede conducir a una represión transcripcional y, de esta manera, está implicada en la regulación génica y la impronta genética de mamíferos, tales como aquellos para el factor de crecimiento de insulina y de su receptor, y el gen *Xist*. La metilación del ADN es un regulador epigenético, ya que la modificación no cambia la secuencia del ADN, pero se hereda a través de la división celular. Una metilación aberrante del ADN puede causar una enfermedad. En particular, una metilación aberrante del ADN puede resultar en una mayor expresión de proto-oncogenes o una disminución de la expresión de genes supresores de tumores. De esta manera, una regulación deficiente de la metilación del ADN es una característica fenotípica de muchos cánceres humanos (Jones y Baylin, 2002). La imagen resultante es la de una reducción global de la cantidad de citosina metilada con una hipermetilación coincidente de un subconjunto de promotores, que en algunos casos está ligada a genes supresores de tumores inactivos. Sin embargo, la ubicación genómica de esta hipometilación es desconocida, así como la frecuencia y la especificidad de la metilación aberrante de un promotor.

20

25 Dada la importancia de la metilación del ADN para la función celular normal y anormal y su potencial como objetivo de fármacos y como una herramienta de diagnóstico en oncología, los enfoques técnicos para identificar la metilación del ADN son altamente deseables (Fazzari y Grealley, 2004). El uso de anticuerpos específicos para los ácidos nucleicos metilados se menciona en los documentos WO 02/00842, WO 02/101353 y WO 2004/065625.

30 Frecuentemente, los protocolos actuales disponibles para detectar el ADN metilado requieren el uso de endonucleasas de restricción sensibles a modificación (MSRE) o modificación diferencial de bases que usan productos químicos, por ejemplo, bisulfito, hidrazina o permanganato (Rein et al., 1998) seguido de un análisis de secuencia de ADN. Aunque los procedimientos de modificación diferencial de bases pueden asignar una base metilada a una posición de nucleótido precisa en un tramo de ADN, estos procedimientos son demasiado laboriosos para ser aplicados a un análisis a gran escala (genoma completo). El uso de enzimas de restricción sensibles a metilación puede ser usado para un análisis de genoma completo pero el número de sitios que pueden ser examinados está limitado por el número de sitios de restricción apropiados en el ácido nucleico. Esto significa que dichos procedimientos no pueden asignar la ubicación de una base modificada en un cromosoma, de manera tan precisa. Además, los procedimientos de detección, químicos y enzimáticos, actuales sólo pueden realizarse con un ADN de calidad relativamente alta.

35

De esta manera, puede verse que los procedimientos novedosos para el enriquecimiento o la detección de ácido nucleico metilado, así como la identificación del ADN metilado aberrantemente en una enfermedad, proporcionarían una contribución a la técnica.

40 Divulgación de la invención

Los presentes inventores han demostrado que pueden usarse anticuerpos específicos para nucleósidos metilados en procedimientos para el enriquecimiento y la identificación, de manera eficiente, de ácidos nucleicos metilados específicos en muestras de fragmentos de ácido nucleico. Usando este nuevo enfoque, los presentes inventores han observado un enriquecimiento de las secuencias metiladas superior en hasta 120 veces en relación a un control no metilado, según se detecta mediante una PCR en tiempo real. Los procedimientos son independientes de la secuencia de los fragmentos de ácido nucleico, no requieren una alta calidad de ácido nucleico, y son fácilmente susceptibles a análisis genómicos a gran escala, por ejemplo, cuando se combinan con los procedimientos convencionales de detección de secuencia de ADN. Además de permitir la determinación de qué secuencias en una muestra están metiladas, los presentes inventores han demostrado también que el enriquecimiento mediante procedimientos de la invención, basados en inmunoprecipitación, es dependiente de la dosis y, de esta manera, puede ser usado para cuantificar el grado de metilación de una secuencia.

45

50

Los anticuerpos específicos para bases modificadas han sido usados anteriormente para la detección de la cantidad global y la ubicación general de las bases modificadas. Por ejemplo, se ha demostrado que los anticuerpos específicos

5 para 5-metilcitosina (M^5C) reaccionan con M^5C en ADN de mamífero unido a un papel de nitrocelulosa (Achwal et al, 1983; Achwal & Chandra, 1982). También se ha usado inmunofluorescencia para determinar las regiones cromosómicas con una alta frecuencia de M^5C (Barbin et al., 1994). El anticuerpo monoclonal de ratón contra 5-metilcitosina se ha usado también anteriormente para detectar alteraciones en la excreción urinaria de nucleósidos en pacientes con cáncer (Tebib et al., 1997) y para visualizar la distribución de secuencias metiladas a lo largo de los cromosomas de mamíferos en células normales y malignas (Hernández-Blazquez et al, 2000; Mayer et al, 2000). Sin embargo, dichos anticuerpos no han sido previamente divulgados o sugeridos para el enriquecimiento de ácidos nucleicos metilados en muestras de ácido nucleico.

10 De esta manera, en un primer aspecto, la presente invención proporciona un procedimiento para enriquecer fragmentos metilados de ácido nucleico en una muestra de fragmentos de ácido nucleico, que comprende las etapas de:

(a) poner en contacto la muestra de fragmentos de ácido nucleico con un anticuerpo específico para un nucleósido metilado bajo condiciones adecuadas para la unión del anticuerpo al nucleósido metilado;

(b) seleccionar los fragmentos de ácido nucleico unidos al anticuerpo.

15 Antes de seleccionar los fragmentos de ácido nucleico unidos al anticuerpo específico para un nucleósido metilado, los fragmentos metilados y no metilados pueden ser separados en base a la unión de los fragmentos metilados al anticuerpo.

La presente invención puede comprender además una etapa de separación de las cadenas de cualquier fragmento de ácido nucleico, de doble cadena, en la muestra para formar una muestra de fragmentos de ácido nucleico de cadena simple, antes de poner en contacto la muestra de fragmentos de ácido nucleico de cadena simple con un anticuerpo específico para un nucleósido metilado.

20 En realizaciones preferentes, la invención proporciona un procedimiento para caracterizar o identificar los fragmentos de ácido nucleico metilados a partir de una muestra de fragmentos de ácido nucleico, en el que el procedimiento incluye además la etapa de:

(c) caracterizar uno o más de los fragmentos de ácidos nucleicos metilados.

25 Por "enriquecimiento" se entiende un aumento en la proporción de una categoría particular de fragmento de ácido nucleico en o a partir de una muestra de fragmentos de ácido nucleico. Preferentemente, el enriquecimiento es de al menos 5, 10, 20, 30, 50 ó 100 veces.

En otro aspecto, la invención proporciona la distribución de la metilación del ADN en una enfermedad y, por lo tanto, está dirigida a una intervención terapéutica, así como a diagnósticos, pronósticos y a marcadores indirectos útiles en la lucha contra el cáncer y otras enfermedades.

30 Ahora, se describirán algunas realizaciones preferentes.

Naturaleza del ácido nucleico

Aunque el procedimiento descrito anteriormente puede ser aplicado a una muestra de cualquier tipo de ácido nucleico, preferentemente, el ácido nucleico es ADN.

35 Los ejemplos de nucleósidos metilados incluyen citidina metilada (por ejemplo, 5-metil citidina), adenosina metilada (por ejemplo, 6-metil adenosina) y guanósina metilada (7-metil guanósina). En una realización preferente, el nucleósido metilado es metil citidina. De manera más particularmente preferente, el nucleósido metilado es 5-metil citidina.

Naturaleza de la muestra

La muestra puede ser cualquier muestra que se desee analizar.

40 El requisito poco exigente en relación a la calidad del ácido nucleico a ensayar, hace que este protocolo sea adecuado para el estudio de especímenes fijados en formalina, cuyo ácido nucleico está parcialmente degradado por la formalina. Tal como se expone más adelante, el procedimiento puede ser usado para relacionar cambios en la metilación de los ácidos nucleicos al historial clínico.

45 La persona con conocimientos en la materia puede determinar fácilmente cómo fragmentar el ácido nucleico para producir una muestra de fragmentos de ácido nucleico. Por ejemplo, el ADN genómico puede ser fragmentado usando cizallamiento (por ejemplo, mediante un tratamiento con ultrasonidos) o digestión con enzimas de restricción, tales como *Afl*.

Una vez obtenida, la muestra de fragmentos de ácido nucleico es suspendida, preferentemente, en un líquido (por ejemplo, un tampón adecuado para la unión de anticuerpos).

Desnaturalización del ácido nucleico

La especificidad de los anticuerpos dirigidos contra modificaciones de nucleótidos es mayor si el ácido nucleico es de cadena simple. De esta manera, la eficiencia del enriquecimiento y de la detección de nucleótidos metilados aumenta grandemente si las moléculas de ácido nucleico de la muestra son de cadena simple. Por lo tanto, es deseable separar las cadenas de cualquier molécula de ácido nucleico de cadena doble, presentes en la muestra, tal como se especifica en la reivindicación 1.

La desnaturalización (separación de las cadenas de una molécula de cadena doble) es realizada más fácilmente mediante el calentamiento del ácido nucleico. La persona con conocimientos en la materia puede determinar fácilmente una temperatura y una duración del tiempo de calentamiento adecuados para la desnaturalización del ácido nucleico en el que está interesada. Se ha encontrado que un calentamiento a 95°C durante 10 minutos es eficaz para el ADN para su uso en la presente invención.

Naturaleza del anticuerpo

Los anticuerpos específicos para muchas bases metiladas están disponibles comercialmente. Por ejemplo, un anticuerpo monoclonal de ratón contra M⁵C está disponible en Eurogentec S.A. (Bélgica) y un suero policlonal de conejo está disponible en Megabase Research Products (EE.UU.). Los antisueros policlonales de conejo contra otras bases metiladas (6-metiladenosina y 7-metilguanosina) están disponibles (Megabase Research Products (EE.UU.).

Como alternativa, los anticuerpos específicos para bases metiladas pueden fabricarse usando técnicas convencionales (véase, por ejemplo Roitt et al. en la "Immunology 5ª edición" - Pub. 1997 por Moseby International Ltd, Londres).

Debería interpretarse que el término "anticuerpo", tal como se usa en la presente memoria, cubre cualquier sustancia de unión específica que tenga un dominio de unión con la especificidad requerida. De esta manera, este término cubre fragmentos, derivados, equivalentes funcionales y homólogos de anticuerpos, incluyendo cualquier polipéptido que comprenda un dominio de unión de inmunoglobulina, ya sea natural o sintético. Por lo tanto, están incluidas las moléculas quiméricas que comprenden un dominio de unión a inmunoglobulina, o equivalente, fusionado a otro polipéptido. La clonación y la expresión de anticuerpos quiméricos se describen en los documentos EP-A-0120694 y EP-A-0125023.

Por ejemplo, se ha mostrado que los fragmentos de un anticuerpo completo pueden realizar la función de los antígenos de unión. Los ejemplos de fragmentos de unión son (i) el fragmento Fab, que consiste en dominios VL, VH, CL y CH1; (ii) el fragmento Fd, que consiste en los dominios VH y CH1; (iii) el fragmento Fv, que consiste en los dominios VL y VH de un único anticuerpo, (iv) el fragmento dAb (Ward, E.S. et al, Nature 341,544-546, 1989), que consiste en un dominio VH; (v) regiones CDR aisladas; (vi) fragmentos F(ab')₂, un fragmento bivalente que comprende dos fragmentos Fab unidos (vii) moléculas Fv de cadena simple (scFv), en las que un dominio VH y un dominio VL están unidos por un enlazador peptídico que permite que los dos dominios se asocien para formar un sitio de unión de antígeno (Bird et al, Science, 242,423-426, 1988; Huston et al, PNAS EE.UU., 85,5879-5883, 1988), (viii) dímeros Fv biespecíficos, de cadena simple, (documento PCT/US92/09965) y (ix) "diacuerpos", fragmentos multivalentes o multiespecíficos construidos mediante fusión génica (W094/13804; Holliger et al, Proc. Natl. Acad. Sci. EE.UU. 90 6444-6448, 1993).

Los diacuerpos son multímeros de polipéptidos, en los que cada polipéptido comprende un primer dominio que comprende una región de unión de una cadena ligera de inmunoglobulina y un segundo dominio que comprende una región de unión de una cadena pesada de inmunoglobulina, en los que los dos dominios están enlazados (por ejemplo mediante un enlazador peptídico) pero que no pueden asociarse entre sí para formar un sitio de unión a antígeno: los sitios de unión a antígeno se forman mediante la asociación del primer dominio de un polipéptido dentro del multímero con el segundo dominio de otro polipéptido dentro del multímero (documento W094/13804).

Preferentemente, el anticuerpo es específico para metilcitolina. Más preferentemente, 5-metilcitolina.

Condiciones adecuadas para la unión del anticuerpo específico para el nucleósido metilado

La persona con conocimientos en la materia puede determinar fácilmente las condiciones adecuadas para la unión del primer anticuerpo al nucleósido metilado en una fase líquida. En particular, es importante mantener un equilibrio iónico apropiado en la muestra de manera que el anticuerpo pueda unirse eficazmente al nucleósido metilado. Por ejemplo, el pH de la muestra se puede controlar mediante la adición de tampones adecuados, tales como fosfato de sodio, que mantendrán el pH a aproximadamente 7,0. Pueden añadirse también sales, tales como cloruro de sodio, al tampón y/o la muestra.

Es preferente mantener la muestra a aproximadamente entre 1 y 5°C, mientras se pone en contacto con el ácido nucleico.

La unión del ácido nucleico metilado al primer anticuerpo "marca" el ácido nucleico metilado. Este "marcado" permite que el ácido nucleico metilado sea separado del ácido nucleico no metilado.

Naturaleza de la etapa de separación

Preferentemente, antes de la etapa de selección, los fragmentos de ácido nucleico, metilados y no metilados, se separan en base a la unión del primer anticuerpo al nucleósido metilado. Esto puede realizarse mediante cualquier procedimiento conocido por las personas con conocimientos en la técnica.

- 5 En realizaciones preferentes, la separación se realiza mediante fijación o unión de los anticuerpos a un sustrato o una fase sólida (los términos se usan de manera intercambiable) y separando esta fase sólida de la fase líquida de la muestra. De esta manera, la adición de un sustrato sólido que se une específicamente al primer anticuerpo facilita la separación del ácido nucleico metilado del ácido nucleico no metilado. La unión específica del sustrato sólido al primer anticuerpo puede conseguirse usando un sustrato sólido que comprende un segundo anticuerpo específico para el primer anticuerpo. Por ejemplo, si el primer anticuerpo (es decir, el anticuerpo específico para un nucleósido metilado) es un anticuerpo anti-M⁵C de ratón, un anticuerpo de cabra anti-ratón sería adecuado.
- 10

- 15 Un sustrato sólido en forma de perlas es particularmente útil, ya que esto proporciona una gran área superficial sobre la que puede ocurrir la unión. Las perlas magnéticas, tales como Dynabeads (Dynal Biotech) permiten una separación simple de los ácidos nucleicos metilados y no metilados, ya que las perlas (y, por lo tanto, el ácido nucleico unido a las mismas) pueden ser retiradas fácilmente de la muestra usando un imán. Como alternativa, el sustrato sólido podría ser separado del ácido nucleico no unido usando técnicas tales como centrifugación y/o filtración. La persona con conocimientos en la materia puede determinar fácilmente una manera adecuada para separar el sustrato sólido que está usando del ácido nucleico no unido (es decir no metilado).

Caracterización del ácido nucleico metilado

- 20 Antes de la caracterización de los fragmentos de los ácidos nucleicos metilados, es deseable separar el ácido nucleico metilado del primer anticuerpo (y el sustrato sólido, si se usa). La persona con conocimientos en la materia puede determinar fácilmente dichos procedimientos de separación en los que el ácido nucleico no es dañado durante el procedimiento de separación.

- 25 Por ejemplo, un fragmento de ácido nucleico puede ser separado de un anticuerpo mediante digestión del anticuerpo. Esto puede conseguirse mediante la incubación de los fragmentos de ácido nucleico unidos al primer anticuerpo con una proteínasa, tal como proteínasa K.

- 30 Una ligera alteración del pH alrededor del ácido nucleico unido al primer anticuerpo puede debilitar la unión entre el anticuerpo y el ácido nucleico metilado, facilitando aún más la separación. Esto puede conseguirse mediante la adición de un tampón adecuado (por ejemplo, 50 mM Tris, pH 8,0) al ácido nucleico metilado y al anticuerpo unido al mismo. La persona con conocimientos en la materia puede determinar fácilmente otras formas adecuadas para hacer esto. Pueden añadirse también EDTA (ácido etilendiaminotetraacético) y SDS (dodecil sulfato sódico) al tampón.

- Una vez separado del primer anticuerpo y del sustrato sólido, el ácido nucleico metilado puede ser analizado adicionalmente, por ejemplo, para determinar la cantidad presente, la totalidad o parte de la secuencia del fragmento metilado y/o la secuencia o la posición del sitio de metilación.

- 35 Esta etapa puede estar precedida por un tratamiento adicional del ácido nucleico. Por ejemplo cuando el ácido nucleico metilado es ADN, puede ser extraído (por ejemplo, en fenol y cloroformo) y, posteriormente, puede ser precipitado (por ejemplo con etanol).

- 40 A continuación, se aplican técnicas convencionales de análisis de ácidos nucleicos al ácido nucleico metilado. Por ejemplo, la presencia de las secuencias de interés en el ácido nucleico metilado puede determinarse usando técnicas tales como PCR, transferencia en ranura, micromatrices, etc., tal como conocen bien las personas con conocimientos en la materia.

- 45 Por ejemplo, un análisis puede emplear un sistema de microchip que comprende una micromatriz de oligonucleótidos o secuencias más largas de ADN sobre un soporte de vidrio. El ácido nucleico de la muestra (por ejemplo, marcado fluorescentemente) puede ser hibridado a la matriz de oligonucleótidos y puede detectarse una hibridación específica de secuencia mediante microscopía confocal de barrido y puede analizarse automáticamente (véase Marshall y Hodgson, Nature Biotechnology 16: 27-31,1998; también Nature Cell Biology Agosto 2001 Vol. 3, número 8 pp E190-E195 " Navigating gene expression using microarrays - a technology review" Almut Schulze y Julian Downward). Una lista de las técnicas usadas actualmente en el montaje de micromatrices y la detección de ADN se puede encontrar en el libro "DANA Microarrays: A Molecular Cloning Manual", eds. Bowtell y Sambrook, CSHL 2002.

- 50 Ahora, se expondrán algunos otros aspectos de la invención.

Análisis del genoma

Debido a que los fragmentos de ácido nucleico aislados usando los procedimientos descritos anteriormente pueden ser analizados mediante una PCR estándar o una hibridación de transferencia en ranura, este procedimiento puede ser aplicado a un análisis a gran escala (genoma completo) usando micromatrices.

5 De esta manera, la invención proporciona un procedimiento para caracterizar el estado de metilación de una muestra de ADN (por ejemplo, a partir de un genoma de un organismo) que comprende:

(i) fragmentar el genoma

(ii) realizar un procedimiento de la invención, tal como se ha descrito anteriormente.

10 La expresión "estado de metilación" se refiere a si la secuencia de ácido nucleico está metilada o no, y/o en qué grado. El grado de metilación puede medirse como cuales de los nucleótidos en la secuencia están metilados y/o la proporción de nucleótidos en la secuencia que están metilados.

Procedimientos de comparación de metilación de ácidos nucleicos

15 Tal como se ha descrito anteriormente, en los procedimientos de la presente invención, el enriquecimiento es dependiente de la dosis (es decir, el enriquecimiento es proporcional al número de nucleósidos metilados) (véase el Ejemplo 2 y la Figura 2B). Esto significa que la invención no sólo puede usarse para determinar si un gen está metilado, si no que puede usarse para cuantificar y comparar el grado de metilación de ese gen.

De esta manera, la invención proporciona un procedimiento para comparar la metilación de diferentes ácidos nucleicos, o muestras de ácido nucleico, correspondientes, que comprende:

(i) realizar un procedimiento de la invención, tal como se ha descrito anteriormente, sobre cada ácido nucleico o muestra,

20 (ii) comparar los resultados en la etapa (d).

Los procedimientos pueden ser realizados por separado, o pueden ser multiplexados (siempre que los ácidos nucleicos o las muestras sean distinguibles). Típicamente, los ácidos nucleicos pueden distinguirse por los marcadores o etiquetas de secuencia.

25 En una realización, la invención puede usarse para la detección de alelos metilados de manera diferente en una muestra, por ejemplo de genes con impronta.

"Los genes con impronta" son genes cuyos alelos tienen diferente expresividad o penetrancia dependiendo de si se heredan o no del progenitor macho o hembra. La impronta puede ser tanto específica de la etapa de desarrollo como específica de tejido. Si los alelos maternos y paternos de un gen están metilados de manera diferente, se enriquecerán hasta grados diferentes en una muestra de ácido nucleico sometida a los procedimientos de la presente invención.

30 Un ejemplo de un gen con impronta cuyos alelos están metilados de manera diferente es el *H19* ICR en ratones (véase el Ejemplo 3 y la Figura 2C). Este locus contiene una isla CpG. Las islas CpG son tramos de secuencias de aproximadamente 1 kb de longitud, que se dan, frecuentemente, en los extremos 5' de los genes, que contienen una alta densidad de dinucleótidos CpG. Esta isla CpG no está metilada en el alelo materno, pero está metilada en el alelo paterno (véase el Ejemplo 3 y la Figura 2C). Cuando se aplican a una muestra de fragmentos de ADN genómico de ratón, los procedimientos de la presente invención enriquecerán el alelo paterno pero no el alelo materno. La persona con conocimientos en la materia puede determinar fácilmente una técnica adecuada para determinar si se ha enriquecido el alelo materno o paterno en la muestra. El uso de un "marcador", bien para el alelo materno o bien para el alelo paterno, es particularmente útil. Por ejemplo, el alelo *H19* ICR de *Mus musculus domesticus*. De esta manera, un híbrido *domesticus* x *spretus* tendrá un alelo con el sitio de restricción *SacI* y un alelo sin dicho sitio de restricción. Una amplificación mediante PCR, usando los cebadores para *H19* ICR seguido de un tratamiento del producto de PCR con *SacI* resulta en un único fragmento de 200 pb para el alelo *domesticus* y dos fragmentos de 100 pb para el alelo *spretus*. Por lo tanto, el tamaño de los fragmentos obtenidos a partir de una muestra "enriquecida" muestra si se han enriquecido el alelo materno, el paterno o ambos.

45 Diagnóstico o pronóstico

Tal como se ha descrito anteriormente, una metilación aberrante del ADN puede causar una enfermedad. En particular, una metilación aberrante del ADN puede resultar en una mayor expresión de proto-oncogenes o una disminución de la expresión de genes supresores de tumores, y está asociada con muchos carcinomas humanos.

Los procedimientos de la invención pueden usarse para cribar e identificar sitios de metilación aberrante de ácidos

nucleicos asociados con estados de enfermedad, o para el diagnóstico o el pronóstico o la progresión de la enfermedad, por ejemplo, en el cáncer.

5 Nuevos sitios de ácidos nucleicos de metilación aberrante, asociados con estados de enfermedad, pueden ser identificados mediante la realización del procedimiento de la invención en muestras de ácidos nucleicos procedentes de individuos enfermos y no enfermos y comparando los resultados.

La invención proporciona además un procedimiento de diagnóstico en un individuo con una enfermedad asociada con la metilación de una secuencia específica de ácido nucleico, que comprende:

- (i) realizar un procedimiento de la invención, tal como se ha descrito anteriormente, sobre una muestra de ácido nucleico del individuo para caracterizar si la secuencia específica de ácido nucleico está metilada o no, y,
- 10 (ii) correlacionar el resultado con el estado de la enfermedad del individuo.

La invención permite además la detección de cambios en la metilación de ácido nucleico con el tiempo (por ejemplo, para relacionar esto con el historial clínico y, por lo tanto, el diagnóstico o pronóstico de una enfermedad asociada con alteraciones en la metilación de una secuencia de ácido nucleico).

Dicho un procedimiento puede incluir las etapas de:

- 15 (i) obtener una muestra de fragmentos de ácido nucleico de un paciente en al menos dos puntos temporales.
- (ii) realizar el procedimiento de la invención sobre cada muestra de fragmentos de ácido nucleico para cada punto temporal, para caracterizar si la secuencia de ácido nucleico está metilada o no, y/o en qué grado.

Preferentemente, la muestra de fragmentos de ácido nucleico se obtiene de un paciente usando el protocolo siguiente:

- (a) obtener una muestra de tejido del paciente,
- 20 (b) extraer el ácido nucleico de cada muestra de tejido para proporcionar una muestra de ácido nucleico,
- (c) fragmentar la muestra de ácido nucleico para proporcionar una muestra de fragmentos de ácido nucleico;

El procedimiento para la detección de cambios en la metilación de ácido nucleico con el tiempo puede comprender, además:

- (iii) registrar los síntomas clínicos de una enfermedad observada en el paciente en cada punto temporal, y
- 25 (iv) comparar los síntomas clínicos registrados en cada punto temporal con el estado de metilación de la secuencia de ácido nucleico de interés en cada punto temporal.

30 El procedimiento para la detección de cambios en la metilación de ácido nucleico se puede llevar a cabo en cualquier orden apropiado. Por ejemplo, las etapas de extracción y de análisis pueden llevarse a cabo en cada punto temporal o poco después de cada punto temporal. Como alternativa, los especímenes o muestras pueden ser almacenados y puede realizarse una extracción de ácido nucleico y/o una comparación de los síntomas clínicos registrados con el estado de metilación para una pluralidad de muestras, a la vez. Por ejemplo las muestras de tejido pueden ser congeladas o fijadas en formalina para su almacenamiento.

Preferentemente, la enfermedad asociada con la metilación de una secuencia de ácido nucleico específica o con alteraciones en la metilación de una secuencia de ácido nucleico es el cáncer.

35 Ahora, la invención se describirá adicionalmente con referencia a las Figuras y los Ejemplos no limitativos siguientes.

Cribado para moduladores y procedimientos de tratamiento

40 Una vez que un gen objetivo ha sido identificado, puede usarse para propósitos de cribado de fármacos para tratar de identificar potenciales fármacos contra el cáncer. Dichos cribados pueden implicar la expresión de la proteína codificada por el gen objetivo y poner en contacto agentes químicos con la proteína con el fin de determinar si el agente químico tiene o no un algún efecto sobre la actividad de las proteínas.

Los ensayos para actividades de proteínas de función conocida son conocidos en la técnica. Generalmente, dichos ensayos se denominan ensayos funcionales y pueden ser realizados *in vitro* en un sistema libre de células o en un sistema basado en células. Cuando hay un ensayo funcional disponible, es preferente un ensayo de unión de ligando.

45 Los ensayos para proteínas de función desconocida se basan, típicamente, solo en la evaluación de la unión del ligando, pero otros ensayos basados en la perturbación en los niveles químicos son bien conocidos por las personas con

conocimientos en la materia.

La provisión de productos químicos candidatos para su uso en la presente invención es bien conocida por las personas con conocimientos en la materia. Por ejemplo, pueden sintetizarse y ensayarse fácilmente bibliotecas de compuestos. Esto está bien descrito, por ejemplo, en: Applications of combinatorial technologies to drug discovery, 2. Combinatorial organic synthesis, library screening techniques, and future direction, J. Med. Chem., 1994, 37, 1385-1401. Chem., 1994, 37, 1385-1401.

Para las proteínas de función desconocida, los ensayos de unión de ligando, descritos en la presente memoria, definirán también un grupo de productos químicos candidatos. Sin embargo, es probable que este grupo sea grande, ya que la unión puede producirse en una serie de sitios diferentes en la superficie expuesta de la proteína, y la unión, por sí misma, no predice el efecto de la unión de ligando sobre la actividad de la proteína. Una selección rigurosa entre los productos químicos candidatos para aquellos que tengan una mayor afinidad definirá un conjunto de productos químicos suficientemente pequeño para ser ensayado.

Un procedimiento alternativo o adicional consiste en expresar la proteína objetivo en una célula que ha sido manipulada genéticamente para que contenga un sensor para iones de calcio, el AMP cíclico u otros componentes de vías de señalización celular. Por ejemplo, las líneas celulares permanentes de cualquier origen adecuado pueden ser transfectadas, y las líneas que expresan la proteína permanentemente pueden ser seleccionadas. En muchos casos, la expresión de una proteína desconocida causará un cambio en el nivel de los componentes de señalización celular, lo que será detectado por el sensor y puede leerse, por ejemplo, como una señal fluorescente o luminiscente. La diferencia entre las células que expresan proteínas y las células de control es la base del ensayo. Se evalúan los efectos de las sustancias químicas sobre la diferencia entre las líneas de expresión de proteínas y de control.

Los polipéptidos que codifican ácidos nucleicos según la invención pueden usarse también en terapia génica. En aplicaciones de terapia génica, los genes se introducen en células para conseguir una síntesis in vivo de un producto genético terapéuticamente eficaz, por ejemplo, para el reemplazo de un gen defectuoso. La terapia génica incluye tanto la terapia génica convencional, donde se consigue un efecto duradero mediante un único tratamiento, y la administración de agentes terapéuticos génicos, que implica la administración, una vez o repetidas veces, de un ADN o ARNm terapéuticamente eficaz. Los ARNs y ADNs antisentido se pueden usar como agentes terapéuticos para bloquear la expresión de ciertos genes in vivo. Ya se ha demostrado que los oligonucleótidos antisentido cortos pueden ser importados en las células, donde actúan como inhibidores, a pesar de sus bajas concentraciones intracelulares causadas por su captación restringida por la membrana celular. (Zamecnik et al., Proc. Natl. Acad. Sci. USA, 83: 4143-4146, 1986). Los oligonucleótidos pueden ser modificados para mejorar su captación, por ejemplo, sustituyendo sus grupos fosfodiéster cargados negativamente por grupos no cargados.

Hay una diversidad de técnicas disponibles para introducir ácidos nucleicos en células viables. Las técnicas varían dependiendo de si el ácido nucleico es transferido en células cultivadas in vitro, o in vivo en las células del huésped deseado. Las técnicas adecuadas para la transferencia de ácido nucleico a células de mamífero in vitro incluyen el uso de liposomas, electroporación, microinyección, fusión celular, DEAE-dextrano, el procedimiento de precipitación con fosfato de calcio, etc. Las técnicas preferentes de transferencia in vivo de genes incluyen la transfección con vectores virales (típicamente retrovirales) y transfección mediada por liposomas-proteína con recubrimiento viral (Dzau et al, Trends in Biotechnology, 11; 205-20, 1993). En algunas situaciones, es deseable proporcionar la fuente de ácido nucleico con un agente que tiene como diana las células objetivo, tal como un anticuerpo específico para una proteína de la superficie de la membrana celular o la célula objetivo, un ligando para un receptor en la célula objetivo, etc. Cuando se emplean liposomas, pueden usarse proteínas que se unen a la proteína de la membrana de la superficie celular asociada con la endocitosis, para dirigir y/o facilitar la captación, por ejemplo, proteínas de la cápside o fragmentos de las mismos, para un tipo de célula particular, anticuerpos para proteínas que experimentan internalización en el ciclo, las proteínas que tienen como objetivo la localización intracelular y mejoran la vida media intracelular. La técnica de endocitosis mediada por receptor es descrita, por ejemplo, por Wu et al., J. Biol. Chem., 262: 4429-4432, 1987; Wagner et al., Proc. Natl. Acad. Sci. EE.UU., 87: 3410-3414, 1990). Para una revisión de los protocolos de marcado de genes y de terapia génica, véase Anderson et al, Science, 256: 808-813, 1992.

Descripción de las figuras

Figura 1: Diagrama esquemático de una realización preferente de la invención y una etapa de caracterización posterior. El ADN genómico, de longitud media deseada, (generado mediante digestión con enzimas de restricción o mediante cizalladura) se desnaturaliza y el ADN metilado se aísla mediante incubación con un anticuerpo dirigido contra 5-metilcitosina. El anticuerpo para 5-metilcitosina se une a las secuencias metiladas. Estas se separan de las secuencias no metiladas y, a continuación, pueden ser caracterizadas mediante procedimientos estándar de detección de ADN, tales como PCR o micromatrices.

Figura 2A: Detección de las secuencias metiladas en el genoma del ratón. El enriquecimiento de las secuencias metiladas

(Repetición Terminal Larga IAP, promotor Xist, X19 ICR) en relación a las islas CpG no metiladas (promotores *Actinb* y APRT) y secuencias de control que no contienen CpG (CPGa y CPGb). Los valores se calcularon mediante PCR en tiempo real sobre el ADN del ADNg hembra digerido con *AluI* (izquierda) y ADNg macho sonificado (derecha) sometidos a los procedimientos de la presente invención. IAP = Partícula A intracisternal. ICR = Región de control de impronta. APRT = adenina fosforibosiltransferasa.

Figura 2B: Correlación positiva entre el enriquecimiento y el número de citosinas metiladas sobre 4 fragmentos de restricción *AluI* en la secuencia *H19* ICR.

Figura 2C: Detección específica del alelo paternal metilado del *H19* ICR con impronta. El ensayo se realizó en ADNg de híbrido ratón (*Mus musculus domesticus* x *spretus*), y los alelos parentales de ICR fueron identificados mediante PCR usando un sitio *SacI* de restricción polimórfico específico para el alelo *spretus*. Los círculos llenos y abiertos representan CpGs metilado y no metilado, respectivamente. ICR = Región de control de impronta. IP = muestras "enriquecidas". IN = Muestras no "enriquecidas".

Figura 3: Validación de nuevos objetivos para la metilación aberrante en el cáncer de colon. A. Se diseñaron cebadores para PCR para los clones positivos identificados en el análisis de micromatrices como hipermetilados en células SW48. La metilación del ADN se controló mediante una PCR de un solo gen en muestras metiladas enriquecidas preparadas a partir de fibroblastos WI38 primarios y células SW48 de cáncer de colon según el procedimiento descrito anteriormente. IN = ADN genómico de entrada, M = ADN metilado enriquecido. Como un control separado, los presentes inventores analizaron muestras preparadas a partir de colon normal correspondiente (N) y tumor (T) de colon a partir de tres pacientes. Anteriormente, se ha descrito que MLH1 y RASSF1A están metilados aberrantemente en células SW48 y en algunos tumores de colon. La secuencia *H19* ICR con impronta sirve como un control positivo para la metilación. B. Control del estado de metilación mediante restricción sensible a metilación. El ADN genómico se digirió con la enzima *HpaII* sensible a la metilación o no se digirió y se usó como molde de PCR con cebadores que abarcaban fragmentos de PCR *HpaII* en tres clones positivos seleccionados aleatoriamente (parte superior) y clones negativos (parte inferior). El número de sitios *HpaII* dentro del amplición de PCR se indica entre paréntesis. La presencia de un producto de PCR después de la digestión con *HpaII* refleja la metilación del ADN en la muestra y en cada caso confirma el análisis de enriquecimiento descrito anteriormente. C. Reactivación de los genes silenciados en células SW48 mediante tratamiento 5-aza-dC. Se realizó una RT-PCR en la preparación de ADNc a partir de fibroblastos WI38 y células SW48 tratadas (+) o no tratadas (-) con 5 μ m de 5-aza-dC durante 4 días. El gen que actúa en beta se usó como control.

Ejemplos

Ejemplo 1

Preparación de muestras

El ADN genómico de ratón macho (*Mus musculus domesticus*) se fragmentó mediante sonicación usando un sonificador digital Branson y el ADN genómico de ratón hembra (*Mus musculus domesticus*) se fragmentó mediante digestión con *AluI* (New England Biolabs, EE.UU.) usando las condiciones recomendadas por el fabricante.

Enriquecimiento

Se diluyeron 4 μ g de ADN genómico de ratón, digerido con *AluI* o sonificado, en 450 μ l de TE (10 mM Tris-HCl, pH 7, 5,1 mM EDTA) para preparar una suspensión de ADN y se calentó a 95°C durante 10 minutos para desnaturalizar el ADN.

Se añadieron a la suspensión 51 μ l de tampón 10x IP (100 mM fosfato de Na, pH 7,0, 1,4 M NaCl, 0,5% Triton X-100) y 10 μ l de anticuerpo monoclonal de ratón contra 5-metilcitosina (Eurogentec, #MMS-900P-B). A continuación, la suspensión se incubó durante dos horas adicionales a 4°C con agitación rotatoria.

Se pre-lavaron 30 μ l de Dynabeads M-280 Sheep IgG anti-ratón (DynaL Biotech, #112.01) en PBS-BSA 0,1% (salino-albúmina de suero bovino con tampón fosfato) y se añadieron a la suspensión. La suspensión se incubó durante 2 horas adicionales a 4°C con agitación rotatoria.

Las perlas se lavaron tres veces con 700 μ l de 1x tampón IP (10 mM fosfato de Na, pH 7,0, 0,14 M NaCl, 0,05% de Triton X-100) y se resuspendieron en 250 μ l de tampón de digestión (Tris 50 mM, pH 8,0, EDTA 10 mM, 0,5% de SDS).

Se añadieron 7 μ l de proteinasa K (10 mg/ml) a la suspensión de perlas y la suspensión de perlas se incubó a 50°C durante 3 horas con agitación horizontal.

Se extrajo el ADN de la suspensión de perlas mediante extracción orgánica seguida de precipitación con etanol. Esto se realizó como se indica a continuación:

1. Extracción con 1 volumen de fenol.

2. Extracción con 1 volumen de cloroformo.
3. La fase acuosa restante se ajustó a 300 mM NaCl y se añadieron 2 volúmenes de etanol.
4. La precipitación se realizó mediante centrifugación a 14.000 rpm a temperatura ambiente.
5. El precipitado de ADN resultante se lavó con 200 µl de 70% de etanol y posteriormente se disolvió en 50 µl de TE.

5 Detección de la abundancia de secuencias metiladas

La abundancia de secuencias metiladas (Repetición Terminal Larga IAP, promotor *Xist*, *H19* ICR), con relación a las islas CpG no metiladas (promotores *Actinb* y *APRT*) y las secuencias de control que no contienen CpG (CpGa y CpGb) se analizó usando PCR en tiempo real.

10 Los resultados para ADN genómico de ratón hembra digerido con *AluI* (izquierda) o ADN genómico de ratón macho sonificado (derecha) se proporcionan en la Figura 2A. Usando este novedoso enfoque se observó un enriquecimiento de secuencias metiladas de hasta 120 veces con respecto a un control no metilado.

Ejemplo 2

El ADN genómico de ratón (*Mus musculus domesticus*) se fragmentó mediante digestión con *AluI*. 4 µg del ADN fragmentado se sometieron a enriquecimiento, tal como se ha descrito en el Ejemplo 1.

15 La abundancia de 4 fragmentos de restricción en el *H19* ICR que contiene diversas cantidades de CpGs metilado se calculó mediante una PCR en tiempo real con respecto a un control negativo que no contiene CpG.

El resultado en la Figura 2B muestra una correlación lineal positiva entre el enriquecimiento y la cantidad de CpGs metilado en el fragmento de restricción.

Ejemplo 3

20 El ADN genómico de ratón híbrido (*Mus musculus domesticus* x *Mus spretus*) se fragmentó mediante sonicación.

4 µg del ADN fragmentado se diluyeron en 450 µl de TE (10 mM Tris-HCl pH 7,5, 1 mM EDTA) para preparar una suspensión de ADN y se calentó a 95°C durante 10 minutos para desnaturalizar el ADN.

La suspensión se dividió en dos muestras (IN e IP). La muestra IP se sometió a enriquecimiento, tal como se ha descrito en el Ejemplo 1. La muestra IN no se sometió a enriquecimiento.

25 Detección de alelos maternos y paternos

30 Ambas muestras IN e IP se amplificaron mediante PCR usando cebadores para el alelo *H19* ICR que resultan en un producto de PCR de 200 pb. El alelo *H19* ICR de *Mus spretus* contiene un sitio de restricción *SacI* polimórfico que no está presente en el alelo *H19* ICR de *Mus musculus domesticus*. El tratamiento del producto de PCR del alelo *domesticus* con *SacI* deja el fragmento de 200 pb sin cortar, mientras que el tratamiento del producto de PCR del alelo *spretus* con *SacI* proporciona dos fragmentos de 100 pb.

Cada uno de los productos de PCR IN e IP se dividió en dos sub-muestras. Las cuatro sub-muestras se indican como IN-, IN+, IP-, IP+. IN+ e IP+ se trataron con *SacI* después de la PCR. IN- e IP- no se trataron con *SacI*.

35 La Figura 2C es una fotografía de un gel de agarosa con bromuro de etidio que muestra los fragmentos de ADN encontrados en cada sub-muestra. Antes del enriquecimiento, tanto el alelo paterno (*spretus*) como el alelo materno (*domesticus*) están presentes en la muestra. Después del enriquecimiento, sólo está presente el alelo paterno. Esto demuestra que sólo se enriquece el alelo paterno (*spretus*) con este procedimiento. Sólo el alelo *H19* ICR paterno está metilado y, de esta manera, el procedimiento de enriquecimiento usado es específico para el ADN metilado.

Ejemplo 4

Identificación de nuevos objetivos de metilación aberrante en el cáncer de colon

40 La línea celular SW48 de cáncer de colon (ATTC, Rockville, MD) se enriqueció para el ADN metilado, tal como se ha descrito anteriormente y las muestras resultantes se sometieron a hibridación a una micromatriz que representa aproximadamente 12.000 muestras isla CpG (UHN Microarray Centre, Ontario) tal como describe el fabricante, en comparación con HFL-1 de fibroblasto pulmonar humano (ATTC, Rockville, MD) y WI-38 (ATCC, Rockville, MD). Para la hibridación de la matriz de islas CpG, 2 µg de ADN sonificado de entrada fueron marcados con Cy5-dCTP y el producto de un ensayo de enriquecimiento con Cy3-dCTP. El marcado se realizó mediante cebado aleatorio usando el kit de marcado

45

5 Bioprime (Invitrogen), 120 μ M de cada dATP, dGTP, dTTP, 60 μ M dCTP y 60 μ M Cy5-dCTP o Cy3 dCTP. Mediante este procedimiento, los presentes inventores identificaron las regiones de ADN hipermetilado exclusivamente en las células de cáncer de colon. En este grupo de 193 clones, 108 podrían ser identificados sin ambigüedad en base a la anotación de la secuencia. De éstos, sólo 31 corresponden a secuencias únicas, mientras que 77 representan ADN ribosomal. Se ha informado acerca de dicha hipermetilación del ADN ribosomal en relación con el envejecimiento y la neoplasia, sin embargo, su papel fisiológico sigue sin estar claro. De entre las secuencias únicas, 3 clones representan islas CpG intergénicas, mientras que las 28 restantes se asignan a 26 genes diferentes. Con la excepción de dos genes, todos están localizados en la región promotora.

10 Para validar los resultados de la micromatriz mediante una PCR de un único gen sobre el ADN metilado, los presentes inventores diseñaron cebadores específicos para 22 de estos genes candidatos. Estos controles confirmaron la metilación específica de SW48 en el 70% de todos los genes. La restricción sensible a la metilación se usó como un enfoque independiente separado y verificó la metilación diferencial en tres genes seleccionados aleatoriamente. Finalmente, usando una RT-PCR, los presentes inventores demostraron para un subconjunto de estos genes una regulación transcripcional a la baja en células SW48 y desrepresión mediante tratamiento con el agente de desmetilación 5-aza-dC.

15 Esta reactivación sugiere que la metilación detectada ejerce directamente una represión de la actividad del gen unido. De esta manera, el procedimiento de la presente invención con la hibridación en una micromatriz de islas CpG permite la identificación de genes silenciados epigenéticamente en las células cancerosas.

Tratamiento con 5-aza-DC y RT-PCR

20 Células SW48 (1×10^6) se sembraron en medio de cultivo y se mantuvieron durante 24 h antes del tratamiento. A continuación, las células se trataron con 5 μ M 5-aza-dC (Sigma) durante 4 días. El medio que contenía 5-aza-dC se intercambié 24 h después del inicio del tratamiento. Las células de control se manipularon de la misma manera sin la adición de 5-aza-dC. El ARN total se preparó usando el Mini Kit RNeasy (Qiagen) y la síntesis de ADNc se realizó en 2 μ g de ARN total usando el sistema Superscript de síntesis de primera cadena (Invitrogen) y cebadores oligo-dT. Las reacciones de PCR se realizaron en 1/20 de la preparación de ADNc. Todos los controles sin la enzima RT fueron negativos.

25

Cebadores para PCR en muestras MeDIP (s = sentido, as = antisentido)

KIAA0789 s	ATTCAAGGCGCACACTATCCC
KIAA0789 as	TGCTGCAGTGGCTTTAAGGAA
FOXF1 s	TGCATTTCGGAAGCCACTGT
FOXF1 as	AAGAGGCTGAAGCGAAGGAAG
ADAM12 s	TGGATCCATTTACAGGCCT
ADAM12 as	AAAAGTTTCCCCCGTGTGT
MGC48625 s	CCTTTCCCATCTTAAGCTCCG
MGC48625 as	GCGTCCCAGCGACTTTTTT
SHH s	TACCTTTGAGGCCACAGAGCC
SHH as	GCGGTTGGTTCTTAAGCCCTA
PAX6 s	AACAATTCGGCGCTTTTCGT
PAX6 as	TTCTTAAATTCTCCCCGGCC
FLJ25439 s	GCTTACAGACTTGCCGCAGAA
FLJ25439 as	TCTGATCTCTCAAACCTCCCGGA
TAZ s	CAAGCCCCGAGTGCAGTTATT
TAZ as	ATAATTGCCCGCCTGGAGA

Digestiones con HpaII

2 µg de ADN genómico fueron digeridos con *Xba*I y *Hpa*II o solo con *Xba*I. Las reacciones de PCR se realizaron sobre 25 ng de ADN digerido usando cebadores que se extendían sobre fragmentos que contienen varios sitios de restricción *Hpa*II. Las secuencias de los cebadores y las condiciones de PCR están disponibles bajo petición.

Nuevos objetivos de metilación aberrante en el cáncer de colon:

- 5 Entre los genes objetivo identificados usando la matriz de islas CpG, sólo se había informado anteriormente de que el gen PAX6 homeobox, nº de acceso NM_000280 estaba metilado en las células SW48. Se había informado anteriormente acerca de que el gen GATA3, aunque no se ha estudiado previamente en el cáncer de colon, estaba metilado aberrantemente en las células de cáncer de mama. Los genes restantes representan nuevos objetivos para la hipermetilación aberrante en el cáncer.
- 10 Estos genes están implicados en una amplia diversidad de funciones biológicas que incluyen regulación de la transcripción (FOXF1 nº de acceso NM_001451-, PAX6, TAZ nº de acceso NM_015472-, GATA3 nº de acceso NM_001002295-), progresión del ciclo celular (TGFB2 nº de acceso NM_003238-), interacciones célula-matriz (ADAM12 nº de acceso NM_003474-) y apoptosis (DAP nº de acceso NM_004394-). Algunos de ellos RASL11A nº de acceso NM_206827-, FOXF1, TGFB2 y SHH nº de acceso NM_000193-.
- 15 Para evaluar la relevancia de los hallazgos de los presentes inventores para la biología del cáncer, los presentes inventores determinaron el estado de metilación para este conjunto de genes en adenocarcinoma primario y tejido de colon normal coincidente de tres pacientes (Figura 3A). Sólo uno de los genes (AXL4) está metilado en cierto grado en los tres tejidos de colon normal, lo que sugiere una posible metilación específica de colon. Para todos los genes restantes, la metilación en las células SW48 no refleja una metilación específica de tejido ya que los mismos no están metilados en el colon normal o están metilados en sólo una (MGC48625 nº de acceso NM_182609-) o dos (LOC283514 nº de acceso NM_198849-) de las muestras. Curiosamente, la metilación para estos últimos genes no es uniforme en el colon normal. Dicha acumulación diferencial de metilación con la edad ha sido observada para otros genes y podría predisponer a la formación de cáncer. En resumen más de la mitad de los genes ensayados, identificados como metilados en la línea celular SW48, están también metilados en al menos un tumor, lo que demuestra que los presentes inventores han
- 20 identificado nuevos objetivos para la hipermetilación aberrante in vivo.
- 25

Documentos citados

1. Hernandez-Blazquez, F. J., Habib, M., Dumollard, J. M., Barthelemy, C., Benchaib, M., de Capoa, A., y Niveleau, A. (2000). Evaluation of global DNA hypomethylation in human colon cancer tissues by immunohistochemistry and image analysis. *Gut* 47, 689-693.
- 30 2. Mayer, W., Niveleau, A., Walter, J., Fundele, R. y Haaf, T. (2000). Demethylation of the zygotic paternal genome. *Nature* 403, 501-502.
3. Tebib, J. G., Reynaud, C., Cedoz, J. P., Letroublon, M. C. y Niveleau, A. (1997). Relationship between urinary excretion of modified nucleosides and rheumatoid arthritis process. *Br J Rheumatol* 36, 990-995.
4. Achwal, C. W., Iyer, C. A. y Chandra, H. S. (1983) *FEBS Lett.* 158, 353-358
- 35 5. Achwal, C. W. y Chandra, H. S. (1982) *FEBS Lett.* 150, 469-472
6. Barbin, A., Montpellier, C., Kokalj, V. N., Gibaud, A., Niveleau, A., Malfoy, B., Dutrillaux, B. y Bourgeois, C. A. (1994) *Hum. Genet.* 94, 684-692
7. Rein, T., DePamphilis, M. L. and Zorbas, H. (1998). *Nucleic Acids Research.* 26, 2255-2264.
8. Jones, P. A. y Baylin, S. B. (2002). *Nat Rev Genet* 3, 415-428.
- 40 9. Fazzari, M. J. y Grealley, J. M. (2004). *Nat Rev Genet* 5, 446-455.
10. Bowtell y Sambrook (eds.) (2002). *DNA Microarrays: A Molecular Cloning Manual.* CSHL.
11. Roitt et al. (1997) en 'Immunology' 5ª Edición. Moseby International Ltd., London
12. Hollinger, P. et al. (1993) *Proc. Natl. Acad. Sci. USA.* 90: 644-648.
13. WO94/13804 (CAMBRIDGE ANTIBODY TECH and HOLLIGER, K. P.). Published: 1994-06-23.
- 45 14. Marshall & Hodgson (1998) *Nature Biotechnology* 16: 27-31.
15. Schulze, A. y Downward, J. (2001). *Nature Cell Biology* August 2001, volumen 3, número 8, pp E190 - E195

"Navigating gene expression using microarrays - a technology review".

REIVINDICACIONES

1. Un procedimiento para enriquecer fragmentos de ácido nucleico metilados en una muestra de fragmentos de ácido nucleico, que comprende las etapas de:

5 (a) poner en contacto la muestra de fragmentos de ácido nucleico con un anticuerpo específico para un nucleósido metilado en condiciones adecuadas para la unión del anticuerpo al nucleósido metilado;

(b) seleccionar los fragmentos de ácido nucleico unidos al anticuerpo específico para un nucleósido metilado.

caracterizado porque:

antes de la etapa (a): las cadenas de los fragmentos de ácido nucleico de doble cadena en la muestra son separadas.

10 2. Procedimiento según la reivindicación 1, que comprende además la etapa adicional de (c) caracterizar uno o más de los fragmentos de ácidos nucleicos metilados.

3. El uso del procedimiento según una cualquiera de las reivindicaciones anteriores para la detección de alelos metilados de manera diferente en una muestra de fragmentos de ácido nucleico.

15 4. Procedimiento según una cualquiera de las reivindicaciones anteriores, en el que la proporción de fragmentos de ácidos nucleicos metilados en, o recogidos de, la muestra de fragmentos de ácido nucleico es aumentada al menos 5 veces, al menos 10 veces, al menos 20 veces, al menos 30 veces, al menos 50 veces o al menos a 100 veces entre las etapas (a) y (b).

5. Procedimiento según una cualquiera de las reivindicaciones anteriores, en el que los fragmentos de ácido nucleico son fragmentos de ADN.

20 6. Procedimiento según una cualquiera de las reivindicaciones anteriores, en el que el nucleósido metilado es metilcitosina.

7. Procedimiento según una cualquiera de las reivindicaciones anteriores, en el que el nucleósido metilado es 5-metilcitosina.

25 8. Procedimiento según una cualquiera de las reivindicaciones anteriores, en el que la selección de los fragmentos de ácido nucleico unidos al anticuerpo se realiza fijando o uniendo los anticuerpos a un sustrato sólido y separando este sustrato sólido de la fase líquida de la muestra.

9. Procedimiento según la reivindicación 8, en el que el sustrato sólido se une específicamente al anticuerpo específico para un nucleósido metilado.

10. Procedimiento según la reivindicación 9, en el que el sustrato sólido comprende un segundo anticuerpo específico para el anticuerpo específico para un nucleósido metilado.

30 11. Procedimiento según una cualquiera de las reivindicaciones 8 a 10, en el que el sustrato sólido está en forma de perlas.

12. Procedimiento según una cualquiera de las reivindicaciones 8 a 11, en el que el sustrato sólido es magnético.

13. Procedimiento según una cualquiera de las reivindicaciones anteriores, que comprende además separar los fragmentos de ácidos nucleicos metilados del anticuerpo específico para el nucleósido metilado.

35 14. Procedimiento según la reivindicación 13, en el que la separación de los fragmentos de ácidos nucleicos metilados del anticuerpo específico para el nucleósido metilado comprende la incubación de los fragmentos de ácidos nucleicos unidos al anticuerpo con una proteínasa.

15. Procedimiento de caracterización del estado de metilación de una muestra de ADN genómico, que comprende:

(i) fragmentar la muestra de ADN genómico para proporcionar una muestra de fragmentos de ácido nucleico, y

40 (ii) llevar a cabo el procedimiento según una cualquiera de las reivindicaciones 2 a 14 sobre la muestra de fragmentos de ácidos nucleicos obtenidos en (i).

16. Procedimiento para comparar el estado de metilación de al menos dos muestras de fragmentos de ácido nucleico, que comprende:

(i) llevar a cabo el procedimiento según una cualquiera de las reivindicaciones 2 a 14 sobre cada muestra de

fragmentos de ácido nucleico, y

(ii) comparar los resultados obtenidos en (i) de una muestra de ácido nucleico con los de al menos otra muestra de ácido nucleico.

5 17. Procedimiento de diagnóstico o pronóstico de una enfermedad asociada con la metilación de un fragmento de ácido nucleico específico en un individuo, que comprende:

(i) llevar a cabo el procedimiento según una cualquiera de las reivindicaciones 2 a 14 sobre una muestra de fragmentos de ácido nucleico del individuo,

(ii) correlacionar el resultado obtenido en (i) con el estado de la enfermedad del individuo.

10 18. Procedimiento para la detección de cambios en la metilación de ácido nucleico en un paciente, con el tiempo, que comprende:

(i) tomar una muestra de tejido obtenida del paciente en un punto temporal,

(ii) repetir la etapa (i) al menos para un punto temporal adicional;

(iii) extraer el ácido nucleico de cada muestra de tejido para proporcionar una muestra de ácido nucleico para cada punto temporal, y

15 (iv) llevar a cabo el procedimiento según una cualquiera de las reivindicaciones 2 a 14 sobre cada muestra de ácido nucleico para cada punto temporal, para caracterizar si la secuencia de ácido nucleico está metilada, y/o en qué grado.

19. Procedimiento para correlacionar los cambios en la metilación de ácido nucleico con los síntomas clínicos de una enfermedad, que comprende las etapas según la reivindicación 18, que comprende además:

20 (a) registrar los síntomas clínicos de una enfermedad, observados en el paciente en cada punto temporal, y

(b) comparar los síntomas clínicos registrados en cada punto temporal con los resultados obtenidos en la etapa (iv).

20. Procedimiento según la reivindicación 18 o la reivindicación 19, que comprende además el almacenamiento de cada muestra de tejido y llevar a cabo la etapa (ii) para una pluralidad de muestras al mismo tiempo.

21. Procedimiento según una cualquiera de las reivindicaciones 17 a 20, en el que la enfermedad es cáncer.

25

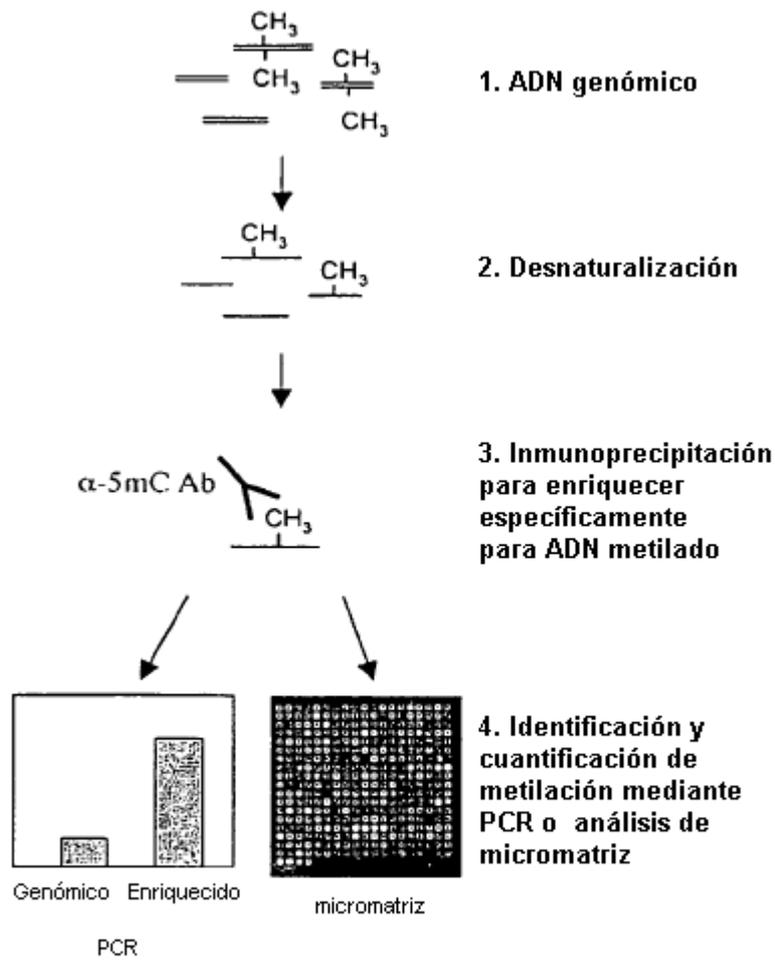


Fig. 1

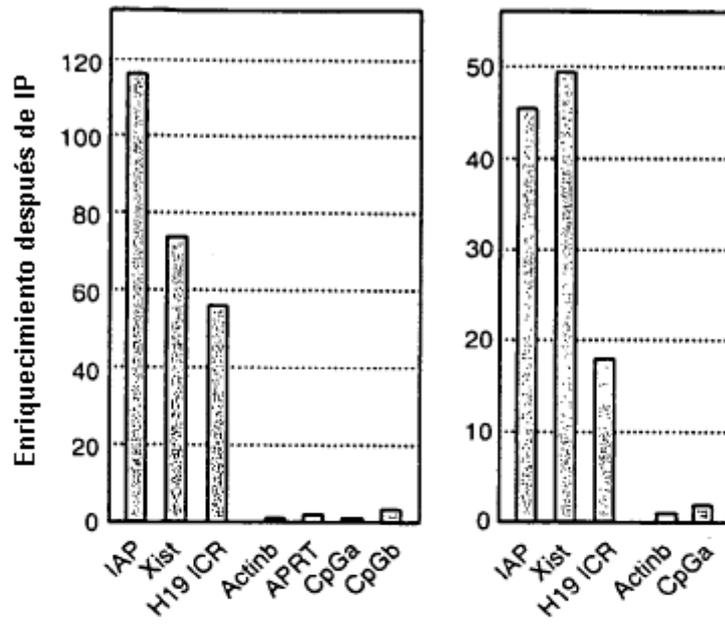


Fig. 2a

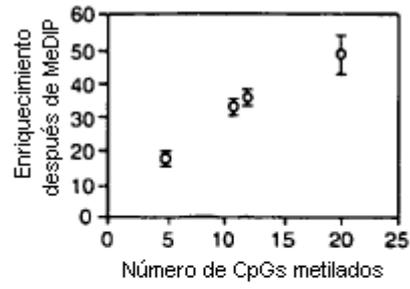


Fig. 2b

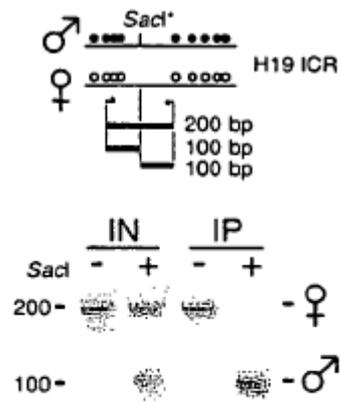


Fig. 2c

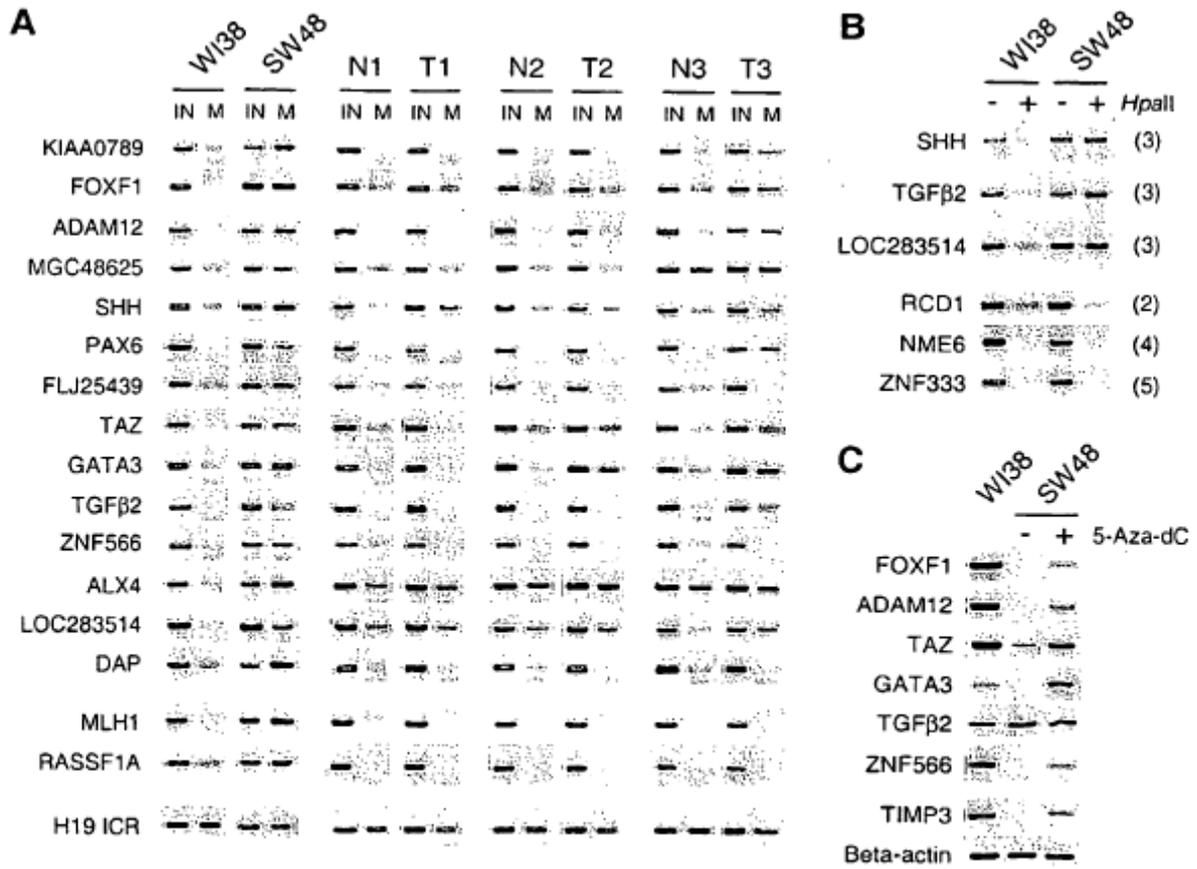


Fig. 3