

19



OFICINA ESPAÑOLA DE
PATENTES Y MARCAS

ESPAÑA



11 Número de publicación: **2 538 214**

51 Int. Cl.:

C12Q 1/68 (2006.01)

12

TRADUCCIÓN DE PATENTE EUROPEA

T3

96 Fecha de presentación y número de la solicitud europea: **01.08.2007 E 07786495 (7)**

97 Fecha y número de publicación de la concesión europea: **06.05.2015 EP 2049684**

54 Título: **Un método para el análisis de metilación de ácido nucleico**

30 Prioridad:

08.08.2006 EP 06090132

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

18.06.2015

73 Titular/es:

**EPIGENOMICS AG (100.0%)
Geneststrasse 5
10829 Berlin, DE**

72 Inventor/es:

**TETZNER, REIMO y
LEWIN, JÖRN**

74 Agente/Representante:

LAZCANO GAINZA, Jesús

ES 2 538 214 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

Un método para el análisis de metilación de ácido nucleico

5 Campo de la invención

La invención se refiere generalmente a métodos nuevos y sustancialmente mejorados para el análisis de metilación de ácido nucleico sensible. Particularmente se refiere a la detección sensible y/o cuantitativa específica de posiciones metiladas o no metiladas.

10

Antecedentes de aspectos de la invención

Se conoce bien en la técnica que el ADN así como el ARN pueden metilarse. La base 5-metilcitosina es la base modificada covalentemente más frecuente encontrada en el ADN de las células eucarióticas. La metilación del ADN juega un importante papel biológico en, por ejemplo, la regulación de la transcripción, la impronta genética, y la tumorigénesis (para revisión ver, *por ejemplo*, Millar y otros: Five not four: History and significance of the fifth base; en *The Epigenome*, S. Beck and A. Olek (eds.), Wiley-VCH Publishers, Weinheim 2003, págs. 3-20). La identificación de la 5-metilcitosina es de particular interés en el área del diagnóstico del cáncer. Pero la identificación de la metilación es difícil. La citosina y la 5-metilcitosina tienen el mismo comportamiento de apareamiento de base, lo que hace a la 5-metilcitosina difícil de detectar por medio del uso de métodos particulares estándar. Los métodos de análisis de ADN convencionales basados en hibridación, por ejemplo, no son aplicables. Adicionalmente, la información de la metilación se pierde completamente por la amplificación por medio de PCR.

15

20

25

Por consiguiente, los métodos actuales para el análisis de la metilación de ADN se basan en dos enfoques diferentes. El primer enfoque usa enzimas de restricción específicas de metilación para distinguir el ADN metilado, en base al clivaje del ADN específico de metilación. El segundo enfoque comprende la conversión química selectiva (*por ejemplo*, tratamiento con bisulfito; ver *por ejemplo* documento WO 2005/038051) de citosinas no metiladas a uracilo mientras las citosinas metiladas permanecen sin cambio. El uracilo tiene el mismo comportamiento de apareamiento de bases que la timina. Por lo tanto forma pares de bases con la adenina. En su lugar, la 5-metilcitosina hibrida con guanina aún después del tratamiento con bisulfito. Es con ello posible diferenciar entre citosinas metiladas y no metiladas. El ADN pretratado enzimáticamente o químicamente generado en estos enfoques típicamente se pre-amplifica y analiza en diferentes formas (ver, *por ejemplo*, documento WO 02/072880 págs. 1 ff; Fraga y Estella: DNA methylation: a profile of methods and applications; *Biotechniques*, 33:632,634,636-49,2002). La pre-amplificación del ADN pretratado químicamente conduce a un aumento de la sensibilidad de la reacción de detección posterior.

30

35

Diferentes métodos de PCR se conocen en la técnica para analizar las posiciones de citosina convertida y no convertida. La amplificación selectiva sólo de posiciones de citosina no convertida (metilada) o con el enfoque inverso, convertida (no metilada) se logra por medio del uso de iniciadores específicos de metilación en los presuntos métodos de PCR específicos de metilación (MSP), o por medio del uso de 'bloqueadores' en los métodos "HeavyMethyl™" (ver, *por ejemplo*, Herman y otros.: Methylation specific PCR: a novel PCR assay for methylation status of CpG islands. *Proc Natl Acad Sci U S A*. 93:9821-6, 1996; Cottrell y otros: A real-time PCR assay for DNA-methylation using methylation specific blockers. *Nucl. Acids Res.*, 32:e10, 2004). Por otra parte, es posible amplificar el ADN en una manera específica por no metilación, y analizar los amplificados por medio de sondas específicas de metilación (ver, *por ejemplo*, Trinh y otros: DNA methylation analysis by MethyLight technology. *Methods*, 25:456-62, 2001). Métodos especiales basados en PCR además se aplican como variantes de PCR 'en tiempo real', lo que hace posible detectar el estado de metilación directamente en el curso de la PCR, sin necesidad de un análisis posterior de los productos (MethyLight™; documento WO 00/70090; Estados Unidos 6,331,393; y Trinh y otros 2001, *supra*).

40

45

50

La cuantificación del grado de metilación del ADN se requiere en muchas aplicaciones que incluyen, pero sin limitarse a, clasificación de tumores, obtención de información pronóstica, o para predecir efectos/respuestas al fármaco. Diferentes métodos para tal cuantificación se conocen en la técnica, tales como 'análisis de punto final' y 'análisis del valor umbral'.

55

Análisis de punto final: En alguna medida, el ADN se pre-amplifica, como por ejemplo en el método Ms-SNuPE, para la hibridación en microensayos, para ensayos de hibridación en solución o para secuenciación con bisulfito directa (ver, *por ejemplo*, Fraga y Estella 2002, *supra*). Un problema con tal "análisis de punto final" (donde la cantidad del amplificado se determina al final de la amplificación) es que la amplificación puede ocurrir de manera no uniforme debido a, *entre otros*, obstrucción del producto, inestabilidad de la enzima y/o una disminución en la concentración de los componentes de la reacción. La correlación entre la cantidad de amplificado, y la cantidad de ADN utilizado es, por lo tanto, no siempre adecuada, y la cuantificación es así sensible a error (ver, *por ejemplo*, Kains: The PCR plateau phase - towards an understanding of its limitations. *Biochem. Biophys. Acta* 1494:23-27,2000).

60

Análisis de valor umbral: Por contraste, el análisis de valor umbral, que se basa en una PCR en tiempo real, determina la cantidad de amplificado en la fase exponencial de la amplificación, en vez de al final de la amplificación. Tales

métodos umbral , tiempo real, suponen que la eficiencia de amplificación es constante en la fase exponencial. El valor umbral reconocido de la técnica 'Ct' es una medida correspondiente, dentro de una reacción de PCR, al primer ciclo de PCR en que la señal en la fase exponencial de la amplificación es mayor que la señal de fondo. La cuantificación absoluta después se determina por medio de una comparación del valor Ct del ADN investigado (prueba) con el valor Ct de un estándar (ver, *por ejemplo*, Trinh y otros 2001, *supra*; Lehmann y otros: Quantitative assessment of promoter hypermethylation during breast cancer development. Am J Pathol., 160:605 -12, 2002). Un problema sustancial de tal análisis basado en el valor Ct es que cuando se usan altas concentraciones de ADN, sólo se puede lograr una pequeña resolución. Este problema además se aplica cuando se determinan altos grados de metilación a través de los valores de PMR (para la discusión de los valores de PMR ver, *por ejemplo*, Eads y otros, CANCER RESEARCH 61:3410-3418, 2001.) Además, las amplificaciones de un gen de referencia (*por ejemplo*, el de la β -actina) se requiere además para este tipo de análisis de Ct (ver, *por ejemplo*, Trinh y otros 2001, *supra*). (Una visión general de la PCR en tiempo real basada en la cuantificación puede obtenerse dedocumento WO 2005/098035; Real-Time PCR: An Essential Guide, Horizon Bioscience, Kirstin Edwards, Julie Logan and Nick Saunders, May 2004 ISBN: 0-9545232-7X; Real-time PCR, M. Tevfik Dorak, Taylor & Francis, abril 2006), ISBN: 041537734X; Mackay IM, Arden KE, Nitsche A. Real-time PCR in virology. Nucleic Acids Res. 2002 Mar 15;30(6):1292-305;Bernard PS, Wittwer CT. Real-time PCR technology for cancer diagnostics. Clin Chem. 2002 ago;48(8): 1178-85; Bernhard Kaltenboeck and Chengming Wang. Advances in real-time PCR: Application to clinical laboratory diagnostics. Advances in Clinical Cancer, 2005; 40:219-259).

Un parámetro crítico para el análisis de metilación es la sensibilidad. La razón para esto es el problema de que las muestras a analizar por lo general comprenden ADN heterogéneo. El ADN es de la misma secuencia pero tiene una metilación diferente. De ese modo, ADN con un buscado patrón de metilación sólo está presente en cantidades bajas. Un ejemplo es el diagnóstico de tumor de fluidos corporales. La muerte de células tumorales resulta en una liberación de ADN del tumor en los fluidos corporales como la sangre. Pero además el ADN de las células sanas muertas se encuentra en la sangre. Varios niveles de ADN del tumor se encuentran además del ADN no tumoral en dependencia del tamaño y la progresión de la enfermedad de cáncer. Debido a razones obvias, es favorable una detección de un tumor tan temprano como sea posible. Esto significa que la más pequeña cantidad de ADN del tumor se tiene que detectar de manera que sea fiable y analizarla correctamente durante el análisis de metilación. Tanto más sensible es un método para el análisis de metilación, más temprano se puede detectar el ADN del tumor y un tumor se puede diagnosticar.

Otro ejemplo es la detección de un tipo de célula por detección de su metilación específica en una muestra de biopsia que comprende diversos tipos de células. De ese modo, la presencia o ausencia de dicho tipo de célula puede ser indicativo de una enfermedad o una probable respuesta al tratamiento. Además en este caso la más pequeña cantidad de ADN específico del tipo de célula se tiene que detectar de manera fiable y analizarla correctamente por análisis de metilación

Por lo tanto existe una preocupación muy importante en el campo de la técnica por mejorar la sensibilidad de los métodos conocidos para el análisis de metilación o por proporcionar nuevos métodos con una sensibilidad tan alta como sea posible.

El método para el análisis de metilación con la más alta especificidad hasta el momento es el método QM en tiempo real (método de metilación cuantitativa; documento WO 2005/098035). Aquí se realiza una amplificación específica de conversión, específica por no metilación del ADN objetivo. Los amplificadores se detectan por medio de hibridación de dos sondas de PCR en tiempo real específicas de metilación diferentes. De ese modo una de las sondas es específica para el estado metilado, mientras que la otra sonda es específica para el estado no metilado. Las dos sondas portan dos tintes fluorescentes diferentes. Una cuantificación del grado de metilación se obtiene dentro de ciclos de PCR específicos que emplean la relación de intensidades de señal de las dos sondas. Por otra parte, los valores Ct de dos canales fluorescentes además se pueden usar para la cuantificación de la metilación.

Debido a razones obvias, existe otra preocupación importante en la técnica en proporcionar métodos de análisis de metilación que garanticen una sensibilidad tan alta como sea posible. Esto significa por ejemplo que tanto como sea posible todas las muestras derivadas a partir de individuos que tienen cáncer se detectan dentro de un grupo de muestras derivadas a partir de individuos que tienen cáncer o no.

El método para el análisis de metilación con la especificidad más alta hasta el momento es una modalidad del método anteriormente mencionado HeavyMethyl™ en que bloqueadores específicos de metilación y sondas se usan en PCR en tiempo real. De ese modo el bloqueador es específico para cierta posición(es) de citosina no metilada mientras que la sonda es específica para la misma posición(es) de citosina a ser metilada, o viceversa.

Actualmente el solicitante no tiene conocimiento de ningún método con una mayor especificidad que el método QM o una mayor sensibilidad que el método HM.

Descripción detallada de aspectos de la invención

Para lograr diversos objetos técnicos, aspectos particulares de la invención enseñan y proporcionan un método para el análisis de metilación del ácido nucleico, que comprende

- 5
- proporcionar ácido nucleico de hebra doble,
 - convertir dicho ácido nucleico de tal manera que la 5-metilcitosina se mantiene sin cambio,
 - mientras que la citosina no metilada se convierte a uracilo u otra base que se caracteriza por citosina en su comportamiento de apareamiento de bases, dicha reacción conduce a dos hebras de ADN convertidas diferentes que ya no son complementarias entre sí, y

10

 - analizar ambas hebras de ácido nucleico convertido en una reacción de detección para la presencia o ausencia de metilación de CpG en la misma posición, en donde
 - a) se analiza la presencia en una o más posiciones de CpG de una hebra convertida y la ausencia de metilación en la misma o más posiciones de CpG de la otra hebra convertida; o
 - b) se analiza la presencia o ausencia de metilación en la misma o más posiciones de CpG de ambas hebras convertidas.

15

Aspectos particulares de la invención enseñan y proporcionan un método para el análisis de metilación de ácido nucleico caracterizado por alta sensibilidad. De ese modo una de las hebras de ácido nucleico convertido se analiza con respecto a la presencia de metilación de una o más posiciones de citosina mientras que la otra hebra convertida se analiza con respecto a la ausencia de metilación de la misma o más posiciones. Aspectos particulares de la invención enseñan y proporcionan un método para el análisis de metilación de ácido nucleico caracterizado por alta especificidad. De ese modo, cualquiera de ambas hebras de ácido nucleico convertido se analiza con respecto a la presencia de metilación de una o más posiciones de citosina o con respecto a la ausencia de metilación. Aspectos particulares de la invención enseñan y proporcionan un método para el análisis de metilación de ácido nucleico caracterizado porque el número de copias de las posiciones analizadas se considera simultáneamente. De ese modo una de las dos hebras de ácido nucleico convertido se analiza con respecto a la presencia o ausencia de metilación. La otra hebra convertida se analiza específicamente para no metilación en una región correspondiente. Aspectos particulares de la invención enseñan y proporcionan un método para el análisis de metilación de ácido nucleico caracterizado porque la normalización a una región de referencia ocurre simultáneamente. De ese modo una de las dos hebras de ácido nucleico convertido se analiza con respecto a la presencia o ausencia de metilación. La otra hebra convertida se analiza específicamente para no metilación en una región de referencia no correspondiente.

20

25

30

Aspectos particulares de la descripción enseñan un estuche para el análisis de metilación de ácido nucleico. Aspectos particulares de la descripción enseñan el uso de lo enseñado en la presente descripción y proporciona métodos así como el estuche enseñado en la presente descripción.

35

Ventajas de aspectos de la invención.

Aspectos particulares de la invención se caracterizan porque tienen una sensibilidad mejorada en comparación con los métodos convencionales para el análisis de metilación. La sensibilidad mejorada se basa en que la presencia de metilación y la ausencia de metilación se detectan simultáneamente por el uso de la misma molécula de ácido nucleico de hebra doble. En contraste, los métodos convencionales para el análisis de metilación de ADN como por ejemplo Ms-SNuPE, MSP, HeavyMethyl™, MethyLight™, o QM también comienzan con una molécula de hebra doble, pero consideran después de la conversión con bisulfito sólo una de las dos hebras convertidas. De ese modo sólo se detecta la presencia de metilación o la ausencia de metilación (Gonzalvo y otros "Rapid quantitation of methylation differences at specific sites using methylation-sensitive single nucleotide primer extension (Ms-SNuPE)". Nucleic Acids Research, 1997,25 (12), 2529-2531; Herman y otros: *supra*; Cottrell y otros: *supra*; Trinh y otros: *supra*; documento WO 2005/098035). Esto está en claro contraste con los aspectos de la invención, en donde se analiza simultáneamente la presencia de metilación y la ausencia de metilación.

40

45

50

El método de la invención muestra una sensibilidad mejorada, en comparación con el método QM, el método con la sensibilidad mejor conocida hasta ahora (ver el Ejemplo 1). El método de la invención, en contraste al método QM, es capaz de resolver de manera fiable los resultados de la metilación por debajo del 10 % de metilación o no metilación y por encima del 90 % de no metilación o metilación. Es aun capaz de detectar de manera fiable la metilación o no metilación en el intervalo de 0 -1 % y 99-100 %, respectivamente (ver las Figuras 3 - 6).

55

Aspectos particulares de la invención se caracterizan porque tienen una especificidad mejorada en comparación con los métodos convencionales para el análisis de metilación. La especificidad mejorada se basa en que la presencia de metilación se detecta simultáneamente para ambas hebras convertidas de la molécula de ácido nucleico de hebra doble proporcionada. Por supuesto también la ausencia de metilación se detecta consecuentemente. En contraste, los métodos convencionales para el análisis de metilación del ADN tales como Ms-SNuPE, MSP, HeavyMethyl™,

60

MethyLight™, o QM también comienzan con una molécula de hebra doble, pero consideran después de la conversión con bisulfito sólo una de las dos hebras convertidas (Gonzalzo y otros: *supra*; Herman y otros: *supra*; Cottrell y otros: *supra*; Trinh y otros: *supra*; documento WO 2005/098035). Sólo documento WO 99/28498 sugirió considerar ambas hebras (documento WO 99/28498 párrafo de crédito p22-23). Sin embargo no como el método de la invención en una reacción de detección que conduce a un resultado sino más bien en dos reacciones separadas, en donde un resultado es un control independiente del otro. Este tiene el efecto de que la varianza de los resultados se minimizan. Pero no tiene influencia en la especificidad.

Aspectos particulares de la invención se caracterizan porque los resultados de la metilación se normalizan simultáneamente al número de copias de las posiciones analizadas. Esta normalización simultánea se logra por el análisis de la metilación de posiciones en una hebra de la molécula de ácido nucleico de hebra doble y el número de copias de dichas posiciones en la otra hebra. Métodos convencionales como Ms-SNuPE, MSP, HeavyMethyl™, MethyLight™, o QM en contraste no consideran simultáneamente el número de copias de las posiciones analizadas (Gonzalzo y otros: *supra*; Herman y otros: *supra*; Cottrell y otros: *supra*; Trinh y otros: *supra*; documento WO 2005/098035). De hecho, la detección del número de copias ocurre en un experimento separado diferente. La normalización ocurre posterior a las reacciones de detección.

Aspectos particulares de la invención se caracterizan porque los resultados de la metilación se normalizan simultáneamente a una región de referencia. Esta normalización simultánea se logra por el análisis de la metilación de posiciones en una hebra de la molécula de ácido nucleico de hebra doble y una región de referencia en la otra hebra. Métodos convencionales como Ms-SNuPE, MSP, HeavyMethyl™, MethyLight™, o QM en contraste no consideran simultáneamente una región de referencia (Gonzalzo y otros: *supra*; Herman y otros: *supra*; Cottrell y otros: *supra*; Trinh y otros: *supra*; documento WO 2005/098035). De hecho, la detección de una región de referencia ocurre en un experimento separado diferente. La normalización ocurre posterior a las reacciones de detección.

Aspectos particulares de la invención tienen la ventaja de que una cantidad reducida de ácido nucleico es necesaria en comparación con métodos convencionales como Ms-SNuPE, MSP, HeavyMethyl™, MethyLight™, o QM. De acuerdo con la invención ambas hebras del ácido nucleico de hebra doble proporcionado se analizan adicionalmente. En contraste a eso, de acuerdo con métodos convencionales sólo una hebra después de la conversión con bisulfito se analiza en una reacción. Cantidades extra de ADN son necesarias ya sea para la normalización del número de copias de la posición o posiciones analizadas o a una región de referencia, o para la confirmación de los resultados de la metilación. Muchas veces la cantidad de ácido nucleico que está disponible para el análisis es muy limitado. Este es especialmente el caso cuando el ácido nucleico se aísla a partir de fluido corporales o biopsias particularmente material fijado con formalina.

Aspectos particulares de la invención tienen la ventaja de que consumen menos tiempo en comparación con los métodos convencionales. De acuerdo con la invención ambas hebras del ácido nucleico de hebra doble proporcionado se analizan simultáneamente en una reacción. Por lo contrario, de acuerdo con los métodos convencionales, la metilación se analiza en un experimento (Ms-SNuPE, MSP, HeavyMethyl™, MethyLight™, o QM). Una confirmación o normalización de los resultados sólo se puede lograr por experimentos adicionales que se tienen que realizar separadamente. Esto consume tiempo con respecto al tiempo de trabajo así como al tiempo de ejecución de las máquinas.

Aspectos particulares de la invención tienen la ventaja que reducen al mínimo el esfuerzo de manipulación en comparación con los métodos convencionales. De acuerdo con la invención ambas hebras del ácido nucleico de hebra doble proporcionado se analizan simultáneamente en una reacción. Por lo contrario, de acuerdo con los métodos convencionales, la metilación se analiza en un experimento (Ms-SNuPE, MSP, HeavyMethyl™, MethyLight™, o QM). Una confirmación o normalización de los resultados sólo se puede lograr por experimentos adicionales que se tienen que realizar separadamente. Esto resulta en un esfuerzo de manipulación más grande que el necesario para el método de la invención.

Debido a dichas ventajas, el método de la invención es particularmente adecuado para procedimientos de alta capacidad de procesamiento. Es además adecuado para la implementación manual así como automática.

Método de aspectos de la invención.

Aspectos de la presente invención se refieren a un método para el análisis de metilación. El método de la invención comprende proporcionar un ácido nucleico de hebra doble; su conversión, por lo cual las bases no metiladas se llegan a distinguir en su comportamiento de apareamiento de bases a partir de las bases metiladas; y el análisis de ambas hebras del ácido nucleico convertido. El método es un método para la detección de la presencia de una o más bases citosina metilada o no metilada. Las citosinas a ser analizadas de ese modo pueden ser o no co-metiladas. Una persona con experiencia en la técnica conoce como patrón de metilación una sola citosina o múltiples citosinas co-metiladas o no. El método de la invención permite el análisis no sólo con respecto a una molécula de ácido nucleico de hebra doble pero además con respecto a una pluralidad de moléculas. De ese modo uno o más patrones de metilación se detectan

así como se cuantifican. Así, es determinable el grado de metilación y/o el porcentaje de moléculas con un cierto patrón de metilación. Esto por ejemplo se indica para el análisis de ADN derivado a partir de muestras de tejido o fluidos corporales, que comprenden no sólo células tumorales pero además células benignas. El método de la invención después es capaz de detectar y cuantificar un patrón de metilación específico para el tumor dentro de la mezcla de ADN del tumor y benigno.

El método de la invención es un método para el análisis de metilación de ácido nucleico, que comprende proporcionar ácido nucleico de hebra doble, convertir dicho ácido nucleico de tal manera que la 5-metilcitosina se mantiene sin cambio, mientras que la citosina no metilada se convierte a uracilo u otra base que se caracteriza por citosina en su comportamiento de apareamiento de bases, dicha reacción conduce a dos hebras de ADN convertidas diferentes que ya no son complementarias entre sí, analizar ambas hebras de ácido nucleico convertido, en una reacción de detección para la presencia o ausencia de metilación de CpG en la misma posición, en donde.

a) se analiza la presencia en una o más posiciones de CpG de una hebra convertida y la ausencia de metilación en la misma o más posiciones de CpG de la otra hebra convertida; o
b) se analiza la presencia o ausencia de metilación en la misma o más posiciones de CpG de ambas hebras convertidas.

En una modalidad preferida, el proporcionar ácido nucleico de hebra doble comprende al menos uno de los siguientes: obtener una muestra de tejido o fluido corporal a partir de un individuo; aislar una molécula de ácido nucleico de hebra doble a partir de dicha muestra; purificar un ácido nucleico de hebra doble; y fragmentar un ácido nucleico de hebra doble por medios biológicos, químico o físico como por ejemplo pero sin limitarse a digestión enzimática o sonificación. En una modalidad preferida, la digestión enzimática comprende la digestión con cualquiera de las enzimas específicas de no metilación, enzimas específicas de metilación, o ambas.

En una modalidad preferida las dos hebras de ácido nucleico convertido se analizan en una reacción específica por metilación. De ese modo dicha reacción específica por metilación es por ejemplo pero sin limitarse a una amplificación específica de metilación. Esta modalidad se ilustra en la Figura 1.

En una modalidad preferida cualquiera de a) se analiza la presencia o ausencia de uno o más patrones de metilación de ambas hebras convertidas; o b) se analiza la presencia o ausencia de uno o más patrones de metilación de una hebra convertida y se analiza la presencia o ausencia de un otro o más patrones de metilación de otra hebra convertida.

En una modalidad preferida cualquiera de a) se analiza la presencia de metilación en una o más posiciones de CpG de una hebra convertida y la ausencia de metilación en una misma o más posiciones de CpG de la otra hebra convertida; o b) se analiza la presencia o ausencia de metilación en una misma o más posiciones de CpG de ambas hebras convertidas.

Una modalidad preferida comprende el análisis de metilación de al menos una posición de CpG en ambas hebras del ácido nucleico convertido. De ese modo el análisis de metilación significa la presencia o ausencia de metilación de citosina. En otras palabras, dos conjuntos de dinucleótidos CpG se analizan, cada conjunto que comprende al menos un dinucleótido CpG. De ese modo cada conjunto está situado en una de las dos hebras complementarias del ácido nucleico de hebra doble proporcionado. Dos dinucleótidos CpG cada uno de un conjunto son parte de una posición de CpG y están situados opuestos uno a otro.

Una modalidad preferida particular comprende la detección de citosina metilada convertida en una posición de CpG en una hebra convertida y la detección de citosina no metilada convertida en la misma posición de CpG en la otra hebra. En otras palabras, sólo una posición de CpG se analiza. Los dos dinucleótidos CpG respectivos de dicha posición de CpG se sitúan opuestos uno a otro, cada dinucleótido en una de las dos hebras complementarias del ácido nucleico de hebra doble proporcionado. La metilación de una citosina y la no metilación de la otra citosina correspondiente se determina, particularmente se cuantifica el grado de metilación y no metilación. Por consiguiente, además dos o más posiciones de CpG son analizables. Esta modalidad tiene la ventaja de que es muy sensible. Es aproximadamente 100 veces más sensible que los métodos convencionales comparables conocidos por aquellos con experiencia en la técnica.

Una modalidad preferida particular comprende la detección de citosina metilada convertida en la misma posición de CpG en ambas hebras convertidas. En otras palabras, los dos dinucleótidos CpG analizados se sitúan opuestos uno a otro, cada uno en una de las dos hebras complementarias del ácido nucleico de hebra doble proporcionado. Se determina la metilación de otra de las citosinas correspondientes, particularmente se cuantifica el grado de su metilación. Por consiguiente, además dos o más posiciones de CpG son analizables. Esta modalidad tiene la ventaja de que es altamente específica.

Una modalidad preferida particular comprende la detección de citosina no metilada convertida en la misma posición de CpG en ambas hebras convertidas. En otras palabras, los dos dinucleótidos CpG analizados se sitúan opuestos uno a

otro, cada uno en una de las dos hebras complementarias del ácido nucleico de hebra doble proporcionado. Se determina la no metilación de otra de las citosinas correspondientes, particularmente se cuantifica el grado de su metilación. Por consiguiente, además dos o más posiciones de CpG son analizables. Esta modalidad tiene la ventaja de que es altamente específica.

5 Una modalidad preferida comprende el análisis de metilación de al menos una posición de CpG en una de las hebras de ácido nucleico convertido y el análisis de metilación de al menos una posición de CpG diferente en la otra hebra convertida. De ese modo el análisis de metilación significa la presencia o ausencia de metilación de citosina. En otras palabras, dos conjuntos de posiciones de CpG se analizaron, cada uno que comprende dos dinucleótidos CpG que están ubicados opuestos, cada uno en una de las hebras. Sólo uno de dichos dinucleótidos CpG por posición de CpG se analiza, por lo cual se forman dos conjuntos de dinucleótidos CpG. Los dinucleótidos CpG de los dos conjuntos no se sitúan opuesto uno al otro. Pero cada conjunto está situado en una de las dos hebras complementarias del ácido nucleico de hebra doble proporcionado. Esta modalidad tiene la ventaja de que patrones de metilación diferentes son analizables simultáneamente e independientes el uno del otro.

15 En una modalidad preferida cualquiera de a) se analiza la presencia o ausencia de metilación de una o más posiciones de CpG de ambas hebras convertidas; o b) se analiza la presencia o ausencia de metilación de una o más posiciones de CpG de una hebra convertida y se analiza la presencia o ausencia de metilación de una o más posiciones de CpG de la otra hebra convertida.

20 En una modalidad preferida cualquiera de a) se analiza la presencia de uno o más patrones de metilación en una hebra convertida y la presencia de uno o más patrones de metilación inversos en la otra hebra convertida; o b) se analiza la presencia o ausencia de uno o más patrones de metilación en ambas hebras convertidas.

25 En una modalidad preferida una de las dos hebras convertidas se analiza en una reacción específica de metilación y la otra hebra se analiza en una reacción inespecífica de metilación. Preferentemente se analiza la presencia o ausencia de uno o más patrones de metilación. Preferentemente se analiza la presencia o ausencia de metilación de una o más citosinas.

30 Una modalidad preferida comprende un análisis de metilación de una hebra convertida y un análisis de no metilación de la otra hebra convertida. De ese modo un análisis de no metilación es por ejemplo pero sin limitarse a un análisis del número de copias o un análisis de SNP. Un análisis de metilación es el análisis de la presencia o ausencia de uno o más patrones de metilación o la presencia o ausencia de metilación de una o más citosinas.

35 Una modalidad preferida comprende un análisis de metilación de una hebra convertida y un análisis de no metilación de la otra hebra convertida. De ese modo el análisis de metilación y el análisis de no metilación cubre las correspondientes secciones superpuestas o adyacentes en las hebras del ácido nucleico de hebra doble proporcionado. En cualquier caso se consideran dos secciones, una en cada hebra. Dos secciones son correspondientes, en donde ambas secciones son complementarias inversas entre sí antes de la conversión. Pero ya no son complementarias inversas después de la conversión. Dos secciones son secciones superpuestas, en donde ambas secciones son parcialmente complementarias inversas entre sí antes de la conversión. Pero ya no son complementarias inversas después de la conversión. Dos secciones son secciones adyacentes, en donde una sección es inversa complementaria a una sección en la otra hebra respectiva, por lo cual dicha sección complementaria inversa está situada inmediatamente antes de o después de la otra sección considerada. Secciones adyacentes no son ni antes ni después de la conversión complementaria inversa entre sí. Esta modalidad tiene la ventaja que los resultados del análisis de metilación de una sección se normalizan simultáneamente al número de copias de la otra sección superpuesta o adyacente correspondiente.

40 Una modalidad preferida comprende un análisis de metilación de una hebra convertida y un análisis de no metilación de la otra hebra convertida. De ese modo el análisis de metilación y el análisis de no metilación cubre diferentes secciones en las hebras del ácido nucleico de hebra doble proporcionado. Dos secciones son diferentes, en donde ambas secciones no son complementarias inversas entre sí antes de la conversión y en donde la sección complementaria inversa de una sección no está situada inmediatamente antes o después la otra sección considerada. Secciones diferentes no son ni antes ni después de la conversión complementarias inversas entre sí. Esta modalidad tiene la ventaja de que los resultados del análisis de metilación de una sección se normalizan simultáneamente a una sección diferente como una región de referencia.

45 En una modalidad preferida, el ácido nucleico es ADN, ADN genómico o ARN.

50 Una modalidad preferida, comprende el análisis de metilación de ADN. Este ADN puede ser ADN genómico o ADN no-genómico metilado. Preferentemente el ADN analizado es ADN genómico. Una modalidad preferida comprende el análisis de metilación de ARN. Una modalidad preferida comprende el análisis de metilación de PNA artificialmente metilado. Una modalidad preferida comprende el análisis de metilación de ADN metilado, ARN o análogos de PNA.

ES 2 538 214 T3

- En una modalidad preferida, el análisis de ambas hebras convertidas comprende el análisis de SNP.
- 5 Una modalidad preferida, comprende el análisis de mutaciones, de delección o amplificación de uno o más nucleótidos adyacentes, o de número de copias. Preferentemente tal análisis ocurre en un reactivo inespecífico de metilación.
- En una modalidad preferida, la conversión de ácido nucleico comprende un reactivo químico, bisulfito, una enzima, o una citidina-desaminasa.
- 10 En una modalidad preferida, la conversión de ácido nucleico comprende un reactivo químico o enzima, preferentemente comprende bisulfito o una citidina-desaminasa.
- 15 Una modalidad preferida comprende una conversión con bisulfito. Una conversión con bisulfito comprende un tratamiento con un bisulfito, un disulfito o una solución de hidrógenosulfito. Como se conoce por aquellos con experiencia en la técnica y de acuerdo con la invención, el término "bisulfito" se usa indistintamente para "hidrógenosulfito" o "disulfito". Varios protocolos de laboratorio se conocen en la técnica (por ejemplo: Frommer y otros (1992) A genomic sequencing protocol that yields a positive display of 5-methylcytosine residues in individual DNA strands. Proc Natl Acad Sci U. S. A.; 89(5): 1827-1831). Preferentemente una conversión con bisulfito se realiza como está descrita esencialmente en Olek A. y otros (Olek y otros "A modified and improved method for bisulphite based cytosine methylation analysis", Nucl. Acids Res. 24, 5064-5066, 1996), documento WO 01/98528, documento WO 03/038121, documento WO 04/067545, documento WO 05/038051, documento WO 06/040187, documento WO 06/039563, PCT/EP2006/003193, oPCT/US2006/014667.
- 20 Se prefiere que el tratamiento con bisulfito se realice en un bloque de agarosa. Se prefiere que el tratamiento con bisulfito se lleve a cabo en presencia de un disolvente desnaturizante tal como, pero sin limitarse al n-alquilenglicol, particularmente dietilenglicol dimetil glicol éter (DME), o en presencia de derivados de dioxano o dioxano. Preferentemente, los disolventes desnaturizantes se usan en concentraciones de entre 1 % y 35 % (v/v). También se prefiere que la reacción de bisulfito se lleve a cabo en presencia de secuestradores tales como, pero sin limitarse a derivados de cromano, por ejemplo, ácido 6-hidroxi-2,5,7,8-tetrametilcromana 2-carboxílico o ácido trihidroxibenzoico y derivados del mismo, por ejemplo, ácido gálico. La conversión con bisulfito se lleva a cabo preferentemente a una temperatura de reacción entre 30 °C y 70°C, de manera que la temperatura se aumenta a más de 85°C durante períodos cortos de tiempo durante la reacción. El ADN que se trata con bisulfito se purifica preferentemente antes de la cuantificación.. Esto puede llevarse a cabo por cualquier medio que se conozca en la técnica, tal como pero sin limitarse a la ultrafiltración, que se lleva a cabo, preferentemente por medio de columnas Microcon™ (fabricadas por Millipore™).
- 25 La purificación se lleva a cabo de acuerdo con un protocolo del fabricante modificado, por ejemplo, pero sin limitarse a, ver documento WO 05/038051. Preferentemente muestras de fluidos corporales o muestras archivadas se pre-tratan, se tratan con bisulfito y se purifican como está descrito en PCT/US2006/014667 o documento WO 06/039563.
- 30 Preferentemente, la conversión con bisulfito se lleva a cabo como está descrita enOlek y otros "A modified and improved method for bisulphite based cytosine methylation analysis", Nucl. Acids Res. 24, 5064-5066,1996), documento WO 01/98528, documento WO 03/038121, documento WO 04/067545, documento WO 05/038051, documento WO 06/040187, documento WO 2006/039563, PCT/EP20061003193, oPCT/US2006/014667.
- 35 En una modalidad preferida, la conversión de ácido nucleico comprende una o más enzimas de conversión de ácido nucleico. Preferentemente, pero sin limitarse a, tales enzimas son citidina-desaminasas. La citidina-desaminasa convierte la citidina metilada más rápido a citidina no metilada. Una enzima apropiada se describe por Bransteitter y otros, (Bransteitter y otros: "Activation-induced cytidine deaminase deaminates deoxycytidine on single-stranded ADN but requires the action of Rnase". PNAS 2003, 100(7): 4102-4107; documento WO 2005/005660).
- 40 En una modalidad preferida, analizar ambas hebras de ácido nucleico convertido comprende el análisis de las correspondientes secciones superpuestas o adyacentes o diferentes de las hebras del ácido nucleico proporcionado originalmente.
- 45 En una modalidad preferida, analizar ambas hebras del ácido nucleico convertido comprende el análisis de al menos uno de los siguientes: los mismos genes o regiones genómicas, genes asociados o regiones genómicas, genes independientes o regiones genómicas, genes cometilados o regiones genómicas, o genes no cometilados o regiones genómicas.
- 50 En una modalidad preferida, analizar ambas hebras del ácido nucleico convertido comprende el análisis de una o más posiciones de CpG situadas en una hebra convertida y el análisis de una sección correspondiente situada en la otra hebra convertida.
- 55
- 60

Una modalidad preferida, comprende el análisis de uno o más patrones de metilación en una hebra convertida y el análisis de una o más secciones correspondientemente situadas en la otra hebra convertida.

5 En una modalidad preferida, analizar ambas hebras del ácido nucleico convertido comprende el análisis de uno o más posiciones de CpG situadas en una hebra convertida y el análisis de una sección no correspondiente situada en la otra hebra convertida.

10 Una modalidad preferida, comprende el análisis de uno o más patrones de metilación en una hebra convertida y el análisis de una o más secciones no correspondientemente situadas en la otra hebra convertida.

15 En una modalidad preferida, analizar ambas hebras del ácido nucleico convertido comprende la cuantificación de la metilación o no-metilación de una o más posiciones de CpG, la cuantificación de ácido nucleico convertido, la cuantificación de ácido nucleico no convertido, o combinaciones de los mismos. La cuantificación de ácido nucleico convertido o no convertido ocurre por la cuantificación de una hebra después de la conversión. La cuantificación de ácido nucleico convertido en las correspondientes secciones de superposición, adyacentes o diferentes de las dos hebras convertidas se indica para la normalización de uno o más patrones de metilación. La cuantificación de ácido nucleico no convertido se indica para controlar la conversión del ácido nucleico. La cuantificación de metilación o no metilación de una o más posiciones de CpG se indica para la identificación y/o detección de uno o más patrones de metilación.

20 En una modalidad preferida, la cuantificación de la metilación o no metilación de una o más posiciones de CpG, la cuantificación del ácido nucleico convertido, o la cuantificación del ácido nucleico no convertido comprende estándares, algoritmos de cuantificación de PCR en tiempo real, o ambos. Aquellos con experiencia en la técnica conocen los métodos adecuados. Preferentemente, tiene lugar una cuantificación como se describe en PCT/EP2005/003 793; Real-Time PCR: An Essential Guide, Horizon Bioscience, Kirstin Edwards, Julie Logan and Nick Saunders, mayo 2004 ISBN: 0-9545232-7X; Real-time PCR, M. Tevfik Dorak, Taylor & Francis, abril 2006, ISBN: 041537734X; Mackay IM, Arden KE, Nitsche A. Real-time PCR in virology. Nucleic Acids Res. 2002 mar 15;30(6):1292-305; Bernard PS, Wittwer CT. Real-time PCR technology for cancer diagnostics. Clin Chem. 2002 ago;48(8):1178-85; o Bernhard Kaltenboeck y Chengming Wang. Advances in real-time PCR: Application to clinical laboratory diagnostics. Advances in Clinical Cancer, 2005; 40:219-259. La cuantificación además es posible en relación entre sí, por ejemplo, pero sin limitarse a, la cantidad de ácido nucleico convertido es "x"-veces la cantidad de ácido nucleico no convertido o el grado de metilación de la posición de CpG "y" es "x"-veces más alto que el grado de metilación de la posición de CpG "z".

35 En una modalidad preferida analizar ambas hebras de ácido nucleico convertido comprende al menos una seleccionada a partir del grupo que comprende: método de amplificación, método de PCR, método de amplificación isotérmica, método NASBA, método LCR, método de amplificación específica de metilación, método MSP (PCR específica de metilación), método MSP anidado, método HeavyMethyl™, método de detección, método de detección específica de la metilación, método de secuenciación con bisulfito, detección por medio de microarreglos, detección por medio de microarreglos de oligonucleótidos, detección por medio de enzimas de restricción, método de detección y amplificación específica de metilación simultánea, PCR en tiempo real, método de PCR en tiempo real HeavyMethyl™, método MSP MethyLight™, método MethyLight™, método MethyLight™ Algo™, método QM, método Headloop MethyLight™, método HeavyMethyl™ MethyLight™, método Heavy-Methyl™ Scorpion™, método MSP Scorpion™, método Headloop Scorpion™, extensión del iniciador sensible de metilación, y método Ms-SNuPE (extensión del iniciador de un sólo nucleótido sensible de metilación).

45 Preferentemente, el análisis de las dos hebras de ácido nucleico después de la conversión comprende al menos un método seleccionado a partir del grupo que comprende: método de amplificación, método de PCR, método de amplificación isotérmica, método NASBA, método LCR, método de amplificación específica de metilación, método MSP (PCR específica de metilación), método MSP anidado, método HeavyMethyl™, método de detección, método de detección específica de la metilación, método de secuenciación con bisulfito, detección por medio de microarreglos, detección por medio de microarreglos de oligonucleótidos, detección por medio de enzimas de restricción, método de detección y amplificación específica de metilación simultánea, PCR en tiempo real, método de PCR en tiempo real HeavyMethyl™, método MSP MethyLight™, método MethyLight™, método MethyLight™ Algo™, método QM, método Headloop MethyLight™, método HeavyMethyl™ MethyLight™, método Heavy-Methyl™ Scorpion™, método MSP Scorpion™, método Headloop Scorpion™, extensión del iniciador sensible de metilación, y método Ms-SNuPE (extensión del iniciador de un sólo nucleótido sensible de metilación).

60 De acuerdo con una modalidad, el método de amplificación puede ser cualquier método de amplificación. Una persona con experiencia en la técnica tiene conocimiento de métodos de amplificación adecuados. De acuerdo con una modalidad preferida, el método de amplificación es un método de PCR. Una persona con experiencia en la técnica conoce métodos de PCR adecuados que se pueden usar de acuerdo con la invención. De acuerdo con una modalidad preferida, el método de amplificación es una amplificación isotérmica. Métodos de amplificación adecuados para usar de

- acuerdo con la invención se conocen bien en la técnica. Tal método puede ser, por ejemplo, pero sin limitarse a, el método de extensión de iniciador. De acuerdo con una modalidad preferida, el método de amplificación es un método NASBA. Los métodos NASBA son métodos de amplificación basados en ADN-ARN que comprenden el uso de una transcriptasa inversa, una ARN-polimerasa y una RNasa. Una persona con experiencia en la técnica tiene conocimiento de los métodos NASBA que se pueden usar de acuerdo con la invención. De acuerdo con una modalidad preferida, el método de amplificación es un método de reacción en cadena de la ligasa. Generalmente, estos son métodos de amplificación que se basan en el uso de una ligasa. Una persona con experiencia en la técnica conoce la LCR adecuada que se puede usar de acuerdo con la invención.
- De acuerdo con una modalidad, el método de amplificación es una amplificación específica de metilación. Aquellos con experiencia en la técnica conocen métodos de amplificación específicos de metilación adecuados. De acuerdo con una modalidad preferida, el método de amplificación específico de metilación es el método de PCR específica de metilación (MSP). El método MSP permite la evaluación de la metilación de los dinucleótidos CpG (ver anteriormente; Herman y otros: *supra*; patente de Estados Unidos núm. 5,786,146). En resumen, el ADN convertido con bisulfito se amplifica con iniciadores específicos para ADN metilado contra el no metilado. Los pares de iniciadores MSP contienen al menos un iniciador, que se hibrida a un dinucleótido CpG convertido con bisulfito. Por lo tanto, la secuencia de dichos iniciadores comprende al menos un dinucleótido CpG. Los iniciadores MSP específicos para el ADN no metilado contienen una "T" en la posición 3' de la posición C en el CpG. Preferentemente, por lo tanto, se requiere que la secuencia base de dichos iniciadores comprenda una secuencia que tiene una longitud de al menos 9 nucleótidos que hibrida con una secuencia de ácido nucleico convertida con bisulfito, en donde la secuencia base de dichos oligómeros comprende al menos un dinucleótido CpG. El MSP requiere sólo pequeñas cantidades de ADN y es sensible a 0.1% de alelos metilados de un locus isla de CpG dado.
- De acuerdo con una modalidad preferida, la amplificación es un método MSP anidado. El método MSP anidado prácticamente se lleva a cabo como está descrito en documento WO 02/18649 y US 20040038245. Este método MSP comprende la expansión del número de copias de la región genética de interés después de la conversión con bisulfito. Por lo tanto una reacción en cadena de la polimerasa se usa para amplificar una porción de dicha región en donde radica la metilación de interés. De ese modo se genera un producto de amplificación. Una alícuota de dicho producto después se usa en una segunda reacción en cadena de la polimerasa, específica de metilación, para detectar la presencia de metilación. En otras palabras una PCR específica de no metilación se realiza antes de la PCR específica de metilación.
- De acuerdo con una modalidad preferida el método de amplificación es el método HeavyMethyl™. El método HeavyMethyl™ se lleva a cabo esencialmente como se describe en documento WO 02/072880 y Cottrell y otros, (Cottrell y otros, *Nucleic Acids Res.* 2004 Ene 13;32(1):e10). Este método comprende el uso de oligonucleótidos sondas de bloqueo que pueden hibridar con el ácido nucleico molde tratado con bisulfito al mismo tiempo que con los iniciadores de la PCR. Preferentemente, los oligonucleótidos bloqueadores se caracterizan porque su secuencia de base comprende una secuencia que tiene una longitud de al menos 9 nucleótidos que hibridan con la secuencia de ácido nucleico tratada químicamente. De ese modo la secuencia de base de dichos oligonucleótidos bloqueadores comprende al menos un dinucleótido CpG, TpG o CpA. La amplificación del ácido nucleico molde se suprime en caso de que la secuencia complementaria de la sonda de bloqueo esté presente en el molde. En tal caso, la amplificación se termina en la posición 5' de la sonda de bloqueo. Las sondas de bloqueo se pueden diseñar para hibridar con el ácido nucleico que se trata con bisulfito de manera específica al estado de metilación. Por ejemplo, ácido nucleicos metilados dentro de una población de ácido nucleicos no metilados por la supresión de la amplificación de ácido nucleicos que no están metilados en una posición en cuestión. Por lo tanto una sonda de bloqueo comprendería un 'CpA' o 'TpA' en la posición en cuestión, opuesto a un 'CpG' si la supresión de la amplificación de ácidos nucleicos metilados se desea. El uso de oligonucleótidos bloqueadores requiere para una interrupción eficiente de amplificación mediada por polimerasa que la polimerasa no pueda alargar los oligonucleótidos bloqueadores. De acuerdo con el método HeavyMethyl™, este se logra a través del uso de los bloqueadores que son 3'-deoxi oligonucleótidos, u oligonucleótidos derivatizados en la posición 3' con otro distinto de un grupo hidroxilo "libre". Por ejemplo, pero sin limitarse a, los oligonucleótidos 3'-O-acetilo son representativos de una clase preferida de moléculas bloqueadoras.
- Además, se debe impedir la degradación mediada por polimerasa de los oligonucleótidos bloqueadores. Preferentemente, tal exclusión comprende ya sea i) el uso de una polimerasa carente de actividad exonucleasa 5'-3', o ii) el uso de oligonucleótidos bloqueadores modificados. Estos oligonucleótidos bloqueadores modificados se caracterizan por tener, por ejemplo, puentes de toato en el terminal 5'. Esto hace la molécula de bloqueador resistente a nucleasa. Las aplicaciones particulares pueden no requerir tales modificaciones en 5' del oligonucleótido bloqueador. Por ejemplo, la degradación del oligonucleótido bloqueador prácticamente se impedirá si los sitios de unión del bloqueador y el iniciador se superponen. De ese modo se impide la unión del iniciador (por ejemplo, en caso de exceso de oligonucleótido bloqueador). Por lo tanto la polimerasa no se puede unir al iniciador y extenderlo. Debido a que la polimerasa no extiende el iniciador, el oligonucleótido bloqueador no se degradará. Una modalidad particularmente preferida del método HeavyMethyl™, para los propósitos de la presente invención y tal como se aplica en la presente descripción, comprende el uso de oligómeros de ácido nucleico peptídico (PNA) como oligonucleótidos bloqueadores.

Tales oligómeros bloqueadores de PNA son idealmente adecuados porque no son ni degradados ni extendidos por la polimerasa.

5 De acuerdo con una modalidad, el método de detección puede ser cualquier tipo de método de detección. Una persona con experiencia en la técnica tiene conocimiento de métodos de detección adecuados. Preferentemente, un método de detección puede ser cualquier tipo de método de detección que comprende el uso de un colorante fluorescente, un colorante no fluorescente, un marcador de masa, una separación por tamaño, o una separación por peso. Por ejemplo, pero sin limitarse a, el método de detección es una separación por tamaño en un gel de agarosa seguido por una tinción de ADN por medio de un colorante fluorescente. De acuerdo con una modalidad preferida, el método de detección es una detección específica de metilación. Una persona con experiencia en la técnica conoce adecuados métodos de detección específicos de metilación. De acuerdo con una modalidad preferida, el método de detección específico de metilación es un método de secuenciación con bisulfito. El método de secuenciación con bisulfito se lleva a cabo prácticamente como está descrito en Frommer y otros (Frommer y otros Proc. Natl. Acad. Sci. USA 89:1827-1831, 1992). El método de secuenciación con bisulfito es un método en donde se lleva a cabo la secuenciación de un fragmento amplificado previamente del ADN genómico tratado con bisulfito. Como el ADN tratado con bisulfito se amplifica antes de la secuenciación, un método de amplificación como el descrito en la presente descripción se puede usar en conjunto con este método de detección. Adicionalmente es especialmente preferido que los resultados de una secuenciación con bisulfito se analicen prácticamente como está descrito en EP 02090203. En breve, de acuerdo con este método el grado de metilación de una citosina se determina por medio de un electroferograma de una o más bases. De ese modo se calcula el área debajo del electroferograma de una base detectada. El grado de metilación después se deduce por comparación de este valor para una posición de citosina a ser analizada con el valor obtenido para una citosina no metilada. Para obtener mejores resultados, la determinación y la consideración de la tasa de conversión de citosina en uracilo del tratamiento con bisulfito y/o una normalización de las señales del electroferograma es favorable. Además se prefiere especialmente que la secuenciación con bisulfito se realice y los resultados se analicen como están descritos en EP06090125.

De acuerdo con una modalidad preferida, el método de detección es un método de detección por medio de una matriz de ADN. Una persona con experiencia en la técnica conoce gran cantidad de matrices de ADN adecuadas. Preferentemente, una matriz de ADN comprende moléculas de ADN que se unen a, o de otra manera se asocian con una fase sólida. La matriz se puede caracterizar, por ejemplo pero sin limitarse a, que las moléculas de ADN estén dispuestas en la fase sólida en forma de una red hexagonal o rectangular. De ese modo la fase sólida es al menos una fase seleccionada a partir del grupo que comprende: silicio, vidrio, poliestireno, aluminio, acero, hierro, cobre, níquel, plata, oro, nitrocelulosa, o plásticos tales como pero sin limitarse al nilón. Pero además se puede pensar en combinaciones de dichos materiales. Para detección, el ADN hibridado en la matriz se marca, preferentemente con un colorante fluorescente. Tal marcaje es por ejemplo, pero sin limitarse a, la simple fijación de los colorantes Cy3 y Cy5 al 5'-OH del fragmento de ADN. La detección de la fluorescencia del ADN hibridado se puede llevar a cabo, por ejemplo, pero sin limitarse a, a través de un microscopio confocal.

De acuerdo con una modalidad preferida particular, el método de detección es un método de detección por medio de un microarreglo de oligonucleótido. Una visión general de la técnica anterior en la fabricación de matriz de oligómero pueden obtenerse de una edición especial de Nature Genetics (Nature Genetics Supplement, volumen 21, enero 1999, y de la bibliografía citada en ella).

De acuerdo con una modalidad preferida particular, el método de detección es un método de detección por medio de un microarreglo de isla de CpG. De ese modo el ADN de la matriz inmovilizado o asociado comprende secuencias que se derivaron a partir de islas de CpG.

De acuerdo con una modalidad preferida particular, el método de detección es un método de detección por medio de una matriz de ADN como está prácticamente descrito en documento WO 99/28498, documento WO 01/38565, o en documento WO 02/18632.

De acuerdo con una modalidad preferida, el método de detección es un método de detección por medio de enzimas de restricción. Una persona con experiencia en la técnica tiene conocimiento de métodos adecuados.

55 De acuerdo con una modalidad preferida, la amplificación específica de metilación y la detección se llevan a cabo simultáneamente. Aquellos con experiencia en la técnica conocen los métodos adecuados. De acuerdo con una modalidad preferida particular, el método para la amplificación específica de metilación simultánea y detección es el método COBRA. El método COBRA es un método de metilación cuantitativo útil para determinar los niveles de metilación de ADN en los loci de gen específico en cantidades pequeñas de ADN genómico (Xiong & Laird, Nucleic Acids Res. 25:2532-2534, 1997). De acuerdo con el método COBRA, la digestión con enzimas de restricción se utiliza para revelar las diferencias en la secuencia dependiente de la metilación en los productos de PCR de ADN tratado con bisulfito. Las diferencias de secuencias dependientes de la metilación se introducen primero en el ADN genómico por tratamiento con bisulfito. La amplificación por PCR del ADN convertido con bisulfito se realiza después mediante la

utilización de iniciadores inespecíficos seguido de la digestión con endonucleasas de restricción, electroforesis en gel y detección por medio del uso de sondas de hibridación marcadas y específicas. Los niveles de metilación en la muestra de ADN original se representan por las cantidades relativas de producto de PCR digerido y no digerido de una manera linealmente cuantitativa a través de un amplio espectro de niveles de metilación de ADN. Además se usa la digestión con enzimas de restricción de los productos PCR amplificados a partir del ADN convertido con bisulfito (Sadri & Hornsby. Nucl. Acids Res. 24:5058-5059,1996).

De acuerdo con una modalidad preferida particular, el método para la amplificación específica de metilación simultánea y detección es un método de PCR en tiempo real. Una persona con experiencia en la técnica conoce adecuados métodos de PCR en tiempo real. De acuerdo con una modalidad preferida particular, el método de PCR en tiempo real es un método HeavyMethyl™. El método HeavyMethyl™ de ese modo se realiza como está descrito anteriormente por medio de una máquina de PCR en tiempo real.

De acuerdo a una modalidad preferida particular, el método de PCR en tiempo real es un método MethyLight™. El método MethyLight™ es un método de metilación cuantitativa de alto rendimiento que utiliza tecnología de PCR en tiempo real basada en fluorescencia (TaqMan™) que no requiere manipulaciones adicionales después de la etapa de PCR (Eads y otros, Cancer Res. 59:2302-2306, 1999). En resumen, el proceso MethyLight™ comienza con una muestra mixta de ADN genómico que se convierte, con una reacción de bisulfito, en una mezcla mixta de diferencias en la secuencia dependientes de la metilación de acuerdo con procedimientos estándar. El PCR basado en fluorescencia se realiza después ya sea en una reacción de PCR "no-sesgada" (con los iniciadores que no solapan sitios de metilación CpG conocidos), o en una reacción "sesgada" (con iniciadores de PCR que solapan los dinucleótidos CpG conocidos). La discriminación de secuencia puede ocurrir ya sea a nivel del proceso de amplificación o a nivel del proceso de la detección de fluorescencia, o ambos. El método MethyLight™ puede usarse como una prueba cuantitativa para los patrones de metilación en la muestra de ADN genómico, en donde la discriminación de secuencia ocurre a nivel de la hibridación de la sonda. En esta versión cuantitativa, la reacción de PCR proporciona la amplificación no-sesgada en presencia de una sonda fluorescente que solapa un sitio potencial de metilación en particular. Se proporciona un control no-sesgado para la cantidad de ADN de entrada por una reacción en la que ni los iniciadores, ni la sonda revisten ninguno de los dinucleótidos CpG. Alternativamente, una prueba cualitativa para la metilación genómica se logra mediante el sondeo de la mezcla de PCR sesgada, ya sea con oligonucleótidos control que no "revisten" los sitios de metilación conocidos (una versión basada en fluorescencia de la técnica "MSP" denominada también método MSP MethyLight™), o con oligonucleótidos que revisten los posibles sitios de metilación.

El proceso MethyLight™ puede usarse con una sonda "TaqMan®" en el proceso de amplificación. Por ejemplo, el ADN genómico bicatenario se trata con bisulfito y se somete a uno de dos conjuntos de reacciones de PCR por medio del uso de sondas TaqMan®; por ejemplo, ya sea con iniciadores sesgados y sonda TaqMan®, o iniciadores no-sesgados y sonda TaqMan®. La sonda TaqMan® se marca doble con las moléculas fluorescentes "reportero" e "inactivador", y se diseña para ser específica de una región de contenido GC relativamente alto tal que se funde a aproximadamente a 10°C de temperatura más alta en el ciclo de PCR que los iniciadores directo o inverso. Esto permite que la sonda TaqMan® permanezca completamente hibridada durante la etapa de apareamiento/extensión del PCR. Debido a que la Taq polimerasa sintetiza enzimáticamente una nueva cadena durante la PCR, eventualmente alcanzará la sonda TaqMan® apareada. La actividad endonucleasa 5' a 3' de la Taq polimerasa desplazará después la sonda TaqMan® mediante la digestión para liberar la molécula reportera fluorescente para la detección cuantitativa de su señal ahora inactivada mediante la utilización de un sistema de detección de fluorescencia en tiempo real. Variaciones en la tecnología de detección TaqMan® que además son adecuadas incluyen el uso de la tecnología de sonda dual (LightCycler™), iniciadores de amplificación fluorescentes (Sunrise™ tecnología), Sondas Balizas Moleculares (Tyagi S., y Kramer F.R., Nature Biotechnology 14, 303-308, 1996), iniciadores Scorpion (Whitcombe y otros Nature and Biotechnology., 17,804-807, 1999), sondas de oligonucleótidos de colorante doble de ANB (Acido Nucleico Bloqueado) (Exiqon A/S) o actividades de ácidos nucleico catalíticos (US 6,140,055; solicitud de patente "Verfahren zum Nachweis eines Methylierungsmusters" presentada el 27 de julio, 2446 en la Organización de Patente Europea). Todas estas técnicas se pueden adaptar de manera adecuada para usar con ADN tratado con bisulfito, y además en el campo del análisis de metilación dentro de los dinucleótidos CpG.

De acuerdo con una modalidad preferida particular, el método de PCR en tiempo real es el método MethyLight™ ALGO™. El método MethyLight™ ALGO™ es un método mejorado del método MethyLight™ como se describe esencialmente en EP 04090255. De acuerdo con este método mejorado, el grado de metilación se calcula a partir de las intensidades de la señal de las sondas por medio del uso de diferentes algoritmos.

De acuerdo con una modalidad preferida particular, el método de PCR en tiempo real es el método QM (método de metilación cuantitativo; ver anteriormente). Este método es inespecífico de metilación y por lo tanto una amplificación por PCR en tiempo real no sesgada. Se acompaña por el uso de dos sondas específicas de metilación (MethyLight™) una para el amplificado metilado y una segunda para el amplificado no metilado. De esta forma, se generan dos señales que se pueden usar a) para determinar la relación de ácidos nucleicos (CG) metilados a (TG) no metilados, y al mismo

tiempo b) para determinar la cantidad absoluta de ácidos nucleico metilados. Para lo último, es necesaria una calibración del ensayo con una cantidad conocida de ADN control.

5 De acuerdo con la modalidad preferida, el método para la amplificación y detección simultáneas específicas de metilación es un método de PCR Headloop. El método de PCR Headloop es un método de PCR de supresión. Prácticamente se lleva a cabo como se describe en Rand y otros (Rand y otros Nucleic Acid Research, 33(14), e127). Es un método de PCR para distinguir secuencias relacionadas en el que la selectividad de la amplificación depende de la secuencia del amplicón. Una extensión 5' se incluye en uno (o ambos) iniciador(es) que corresponde a secuencias dentro de uno de los amplicones relacionados. Después de la copia y la incorporación dentro del amplificado esta
10 secuencia es después capaz de formar un bucle hacia atrás, aparearse a las secuencias internas e iniciar la formación de una estructura en horquilla. Esta estructura previene después la amplificación adicional. Así, la amplificación de las secuencias que contienen un ajuste perfecto a la extensión 5' se suprime mientras la amplificación de las secuencias que contienen desajustes o que carecen de la secuencia no se afecta.

15 De acuerdo con una modalidad preferida particular, el método para la amplificación y detección simultáneas específicas de metilación es una combinación del método de PCR Headloop y el método MethyLight™, además denominado método Headloop MethyLight™.

20 De acuerdo con la modalidad preferida, el método para la amplificación y detección simultáneas específicas de metilación es un método Scorpion™. Este método se describió primero por Whitcombe y otros (Whitcombe y otros: Detección de productos de PCR por medio del uso de amplicones de auto-sondeo y fluorescencia. Nat Biotechnol. 1999; 17(8):804-7; Thelwell y otros: Modo de acción y aplicación de iniciadores Scorpion™ para la detección de mutaciones. Nucleic Acids Res. 2000 Oct 1;28(19):3752-61; US 6,326,145; US 6,365,729; US 20030087240 A1). Varias modalidades de este método se conocen por aquellos con experiencia en la materia. Todos estos métodos tienen en común el sondeo intramolecular. De acuerdo con la variante llamada de Horquilla, los iniciadores Scorpion™ poseen una
25 secuencia sonda específica en su extremo 5'. Esta secuencia se presenta en una configuración de tipo bucle. Un colorante fluorescente y un inactivador se localizan en proximidad espacial en el extremo de la secuencia de sondeo. Después de la desnaturalización subsecuente a un ciclo de amplificación, la sonda hibrida intramolecularmente sobre la secuencia iniciadora alargada de la misma hebra. De este modo el bucle se abre, el colorante y el inactivador se separan y así se pueden detectar las señales del colorante.
30

Otras variantes del método Scorpion™ son por ejemplo la variante Duplex (Solinas y otros: Iniciadores Duplex Scorpion™ en el análisis SNP y aplicaciones FRET. Nucleic Acids Res. 2001 Oct 15;29(20):E96), o las variantes como se describen en US 6,326,145 y US 20030087240. De acuerdo con una modalidad preferida particular, el método
35 Scorpion™ es un método como se describe prácticamente en documento WO 05/024056.

De acuerdo a una modalidad preferida particular, el método para la amplificación y detección simultáneas específicas de metilación es una combinación del método HeavyMethyl™ y el método Scorpion™ además denominado método HeavyMethyl™ Scorpion™.
40

De acuerdo a una modalidad preferida particular, el método para la amplificación y detección simultáneas específicas de metilación es una combinación del método HeavyMethyl™ y el método MethyLight™ además denominado método HeavyMethyl™ MethyLight™.
45

De acuerdo a una modalidad preferida particular, el método para la amplificación y detección simultáneas específicas de metilación es una combinación del método MSP y el método Scorpion™, además denominado método MSP Scorpion™.
50

De acuerdo a una modalidad preferida particular, el método para la amplificación y detección simultáneas específicas de metilación es una combinación del método Headloop y el método Scorpion™, además denominado método Headloop Scorpion™.
55

De acuerdo con una modalidad preferida, el método para la amplificación y detección simultáneas específicas de metilación es un método de extensión del iniciador específico de metilación. Una persona con experiencia en la técnica conoce los métodos que se pueden usar de acuerdo con la invención.
60

De acuerdo con una modalidad preferida particular, el método de extensión del iniciador específico de metilación es el método Ms-SNuPE (Extensión del iniciador en un solo nucleótido sensible a la metilación). El método Ms-SNuPE es un método prácticamente llevado a cabo como se describe en Gonzalzo y otros (Gonzalzo y otros Nucleic Acids Research 25(12), 2529-2531, 1997; US 6,251,594). De acuerdo con el método Ms-SNuPE, las regiones de interés se amplifican por PCR a partir de ADN tratado con bisulfito. Después de la purificación de los productos de PCR, los iniciadores se hibridan cercanamente delante de la posición a analizar. El iniciador después se alarga en un solo nucleótido ya sea con dCTP marcado o con dTTP marcado diferentemente. En el caso en que la citosina en el ADN original estaba metilada, después se incorporará dCTP porque las citosinas metiladas permanecen sin cambio durante el tratamiento con
65

bisulfito. En el otro caso, la citosina en el ADN original no estaba metilada, después se incorporará dTTP porque las citosinas no metiladas se convierten a uracilo por tratamiento con bisulfito y el PCR subsecuente sustituirá el uracilo por timina. Por la detección de las diferentes marcas, se puede distinguir si una citosina de una posición CpG estaba metilada o no metilada. El método MS-SNuPE se puede realizar además en una manera cuantitativa.

5 De acuerdo con una modalidad preferida particular, el método de extensión del iniciador específico de metilación es un método como se describe prácticamente en documento WO 01/062960, documento WO 01/062064, o documento WO 01/62961. Todos estos métodos se pueden realizar en una manera cuantitativa. De acuerdo con documento WO 10 01/062960, el iniciador que se va a extender hibrida con su terminal 3' completo o solo parcialmente sobre las posiciones de interés. Una extensión de al menos un nucleótido ocurre solamente si el iniciador hibrida completamente. El documento WO 01/062064 describe un método en el que el iniciador que se va a extender hibrida inmediatamente adyacente o a una distancia de hasta diez bases a la posición a analizar. El iniciador después se extiende por al menos un solo nucleótido. El tercer método se describe en documento WO 01/62961. De acuerdo con este método, dos 15 conjuntos de oligonucleótidos se hibridan al ADN amplificado después del tratamiento con bisulfito. El primer tipo de oligonucleótido hibrida inmediatamente adyacente a 5' o a una distancia de hasta diez bases de la posición a analizar. El segundo tipo de oligonucleótido hibrida en el ADN amplificado de forma que su terminal 5' hibrida 3' inmediatamente adyacente a dicha posición a analizar. Mediante esto, los dos oligonucleótidos se separan uno del otro por una interrupción en el intervalo de 1 a 10 nucleótidos. El primer tipo de oligonucleótido después se extiende por medio de una polimerasa, en donde no se adicionan más que el número de nucleótidos que se encuentran entre los dos 20 oligonucleótidos. De este modo se usan nucleótidos que comprenden dCTP y/o dTTP diferencialmente marcados. Los dos oligonucleótidos después se unen entre sí por medio de una enzima ligasa. En el caso de que la citosina en el ADN original estaba metilada, después se incorporará dCTP. En el caso de que la citosina en el ADN original no estaba metilada, después se incorporará dTTP.

25 Por supuesto otros métodos similares, que son métodos más desarrollados de los métodos mencionados o combinaciones de los mismos además se pueden usar de acuerdo con la invención.

Particularmente de máxima preferencia, el análisis de ambas hebras de ácido nucleico convertidas comprende al menos uno seleccionado del grupo que comprende: PCR en tiempo real, método de PCR en tiempo real HeavyMethyl™, 30 método MSP MethyLight™, método MethyLight™, método MethyLight™ Algo™, método QM, método Headloop MethyLight™, método HeavyMethyl™ MethyLight™, método HeavyMethyl™ Scorpion™, método MSP Scorpion™, método Headloop Scorpion™, extensión del iniciador sensible a la metilación, y método Ms-SNuPE (extensión del iniciador en un solo nucleótido sensible a la metilación).

35 En una modalidad particularmente de máxima preferencia el análisis de las dos hebras de ácido nucleico convertidas comprende al menos un método seleccionado del grupo que comprende: PCR en tiempo real, método de PCR en tiempo real HeavyMethyl™, método MSP MethyLight™, método MethyLight™, método MethyLight™ Algo™, método QM, método Headloop MethyLight™, método Heavy-Methyl™ MethyLight™, método HeavyMethyl™ Scorpion™, método MSP 40 Scorpion™, método Headloop Scorpion™, método de extensión del iniciador sensible a la metilación, y método Ms-SNuPE (extensión del iniciador en un solo nucleótido sensible a la metilación).

En una modalidad preferida, analizar ambas hebras convertidas comprende el análisis de cada hebra convertida por una reacción del mismo método. Una modalidad preferida comprende que ambas hebras convertidas se analizan por el 45 mismo método.

En una modalidad preferida, analizar ambas hebras convertidas comprende el análisis de una hebra convertida por una reacción de un método y el análisis de la otra hebra convertida por una reacción de un método diferente. Una modalidad preferida comprende que una de las hebras convertidas se analiza por un método y la otra hebra se analiza por otro 50 método.

En una modalidad preferida, analizar ambas hebras convertidas comprende el análisis de cada hebra convertida por una reacción de PCR Heavy Methyl™. En una modalidad preferida, analizar ambas hebras convertidas comprende el análisis de cada hebra convertida por una reacción de PCR Heavy Methyl™ en tiempo real. Una modalidad preferida comprende que ambas hebras convertidas se analicen por el método de PCR HeavyMethyl™, preferentemente por el método de 55 PCR HeavyMethyl™ en tiempo real.

En una modalidad preferida, analizar ambas hebras convertidas comprende el análisis de una hebra convertida por una reacción de PCR HeavyMethyl™ y el análisis de la otra hebra convertida por una reacción de PCR inespecífica de metilación. En una modalidad preferida, analizar ambas hebras convertidas comprende el análisis de una hebra 60 convertida por una reacción de PCR HeavyMethyl™ en tiempo real y el análisis de la otra hebra convertida por una reacción de PCR en tiempo real inespecífica de metilación. Una modalidad preferida comprende que una de las hebras convertidas se analiza por el método de PCR HeavyMethyl™ y la otra hebra se analiza por un método inespecífico de

metilación, preferentemente el método de PCR HeavyMethyl™, el método inespecífico de metilación, o ambos son métodos de PCR en tiempo real.

5 En una modalidad preferida, analizar ambas hebras convertidas comprende el análisis de cada hebra convertida por una reacción de MSP. En una modalidad preferida, analizar ambas hebras convertidas comprende el análisis de cada hebra convertida por una reacción de MSP en tiempo real. Una modalidad preferida comprende que ambas hebras convertidas se analicen por el método MSP, preferentemente por el método MSP en tiempo real.

10 En una modalidad preferida, analizar ambas hebras convertidas comprende el análisis de una hebra convertida por una reacción MSP y el análisis de la otra hebra convertida por una reacción de PCR inespecífica de metilación. En una modalidad preferida, analizar ambas hebras convertidas comprende el análisis de una hebra convertida por una reacción de MSP en tiempo real y el análisis de la otra hebra convertida por una reacción de PCR en tiempo real inespecífica de metilación. Una modalidad preferida comprende que una de las hebras convertidas se analiza por el método MSP y la otra hebra se analiza por un método inespecífico de metilación, preferentemente el método MSP, el método inespecífico de metilación, o ambos son métodos de PCR en tiempo real.

15 En una modalidad preferida, analizar ambas hebras convertidas comprende el análisis de cada hebra convertida por una reacción MethyLight™. Una modalidad preferida comprende que ambas hebras convertidas se analizan por el método MethyLight™

20 En una modalidad preferida, analizar ambas hebras convertidas comprende el análisis de una hebra convertida por una reacción de PCR MethyLight™ y el análisis de la otra hebra convertida por una reacción de PCR inespecífica de metilación. En una modalidad preferida, analizar ambas hebras convertidas comprende el análisis de una hebra convertida por una reacción de PCR MethyLight y el análisis de la otra hebra convertida por una reacción de PCR en tiempo real inespecífica de metilación. Una modalidad preferida comprende que una de las hebras convertidas se analiza por el método MethyLight™ y la otra hebra se analiza por un método inespecífico de metilación, preferentemente el método inespecífico de metilación es un método de PCR en tiempo real.

25 En una modalidad preferida, analizar ambas hebras convertidas comprende el análisis de cada hebra convertida por una reacción QM. En una modalidad preferida, analizar ambas hebras convertidas comprende el análisis de cada hebra convertida por una reacción QM en tiempo real. Una modalidad preferida comprende que ambas hebras convertidas se analicen por el método QM, preferentemente por el método QM en tiempo real.

30 En una modalidad preferida, analizar ambas hebras convertidas comprende el análisis de una hebra convertida por una reacción QM y el análisis de la otra hebra convertida por una reacción de PCR inespecífica de metilación. En una modalidad preferida, analizar ambas hebras convertidas comprende el análisis de una hebra convertida por una reacción QM en tiempo real y el análisis de la otra hebra convertida por una reacción de PCR en tiempo real inespecífica de metilación. Una modalidad preferida comprende que una de las hebras convertidas se analiza por el método QM y la otra hebra se analiza por un método inespecífico de metilación, preferentemente el método QM, el método inespecífico de metilación, o ambos son métodos de PCR en tiempo real.

35 Una modalidad preferida comprende el análisis de una hebra convertida por una reacción del método HeavyMethyl™ y el análisis de la otra hebra convertida por una reacción del método MSP. Preferentemente, la reacción del método HeavyMethyl™, la reacción del método MSP, o ambas son reacciones en tiempo real.

40 Una modalidad preferida comprende el análisis de una hebra convertida por una reacción del método HeavyMethyl™ y el análisis de la otra hebra convertida por una reacción del método QM. Preferentemente, la reacción del método HeavyMethyl™, la reacción del método QM, o ambas son reacciones en tiempo real.

45 [Una modalidad preferida comprende el análisis de una hebra convertida por una reacción del método MSP y el análisis de la otra hebra convertida por una reacción del método QM. Preferentemente, la reacción del método MSP, la reacción del método QM, o ambas son reacciones en tiempo real.

50 Una modalidad preferida comprende el análisis de una hebra convertida ya sea por una reacción del método Heavy-Methyl™, una reacción del método MSP o una reacción del método QM y el análisis de la otra hebra convertida por una reacción del método MethyLight™. Preferentemente, la reacción del método Heavy-Methyl™, la reacción del método MSP y la reacción del método QM es una reacción en tiempo real, respectivamente.

55 Una modalidad preferida es un método para el análisis de la metilación, que comprende

- 60
- proporcionar el ácido nucleico bicatenario;
 - convertir una de las dos hebras de ácido nucleico proporcionadas de forma que la 5-metilcitosina permanezca sin cambios, mientras la citosina no metilada se convierte a uracilo o a otra base que se distingue de la citosina en

su comportamiento de apareamiento de bases, dicha reacción lleva a dos hebras de ácidos nucleicos diferentes que ya no son complementarias entre sí;

- analizar ambas hebras de ácidos nucleicos, caracterizadas además porque la hebra convertida se analiza en una reacción específica de metilación y la otra hebra no convertida se analiza en una reacción inespecífica de metilación. Preferentemente, la reacción inespecífica de metilación comprende el análisis de SNP, deleción o amplificación de uno o más nucleótidos adyacentes, o número de copias. Preferentemente, la conversión de una de los dos hebras de ácidos nucleicos comprende un reactivo bisulfito. Preferentemente, el análisis específico de la metilación comprende el análisis de una o más posiciones CpG localizadas en la hebra convertida y el análisis de una sección correspondiente, solapada, adyacente o diferente localizada en la otra hebra no convertida. Preferentemente, analizar ambas hebras comprende la cuantificación de uno o más patrones de metilación, la cuantificación de las hebras de ácidos nucleicos convertidas, la cuantificación de las hebras de ácidos nucleicos no convertidas, o combinaciones de las mismas. Preferentemente, analizar ambas hebras comprende al menos uno seleccionado del grupo que comprende: método de amplificación, método de PCR, método de amplificación isotérmico, método NASBA, método LCR, método de amplificación específico de metilación, método MSP (PCR específica de metilación), método MSP anidado, método HeavyMethyl™, método de detección, método de detección específico de metilación, método de secuenciación con bisulfito, detección por medio de microarreglos, detección por medio de microarreglos de oligonucleótido, detección por medio de enzimas de restricción, métodos de amplificación y detección simultáneos específicos de metilación, PCR en tiempo real, método de PCR en tiempo real HeavyMethyl™, método MSP MethyLight™, método MethyLight™, método MethyLight™ Algo™, método QM, método Headloop MethyLight™, método HeavyMethyl™ MethyLight™, método HeavyMethyl™ Scorpion™, método MSP Scorpion™, método Headloop Scorpion™, extensión del iniciador sensible a la metilación, y método Ms-SNuPE (extensión del iniciador de un solo nucleótido sensible a la metilación).

En una modalidad preferida, se analiza el ADN genómico, dicho ADN genómico comprende al menos una citosina metilada en el intervalo de 0-100 %.

En una modalidad preferida, se analiza el ADN genómico, dicho ADN genómico que comprende una citosina que está metilada a aproximadamente 0 %, 0.1 %, 0.2 %, 0.3 %, 0.4 %, 0.5 %, 0.6 %, 0.7 %, 0.8 %, 0.9 %, 1.0%, 2.0 %, 3.0 %, 4.0 %, 5.0 %, 6.0 %, 7.0 %, 8.0 %, 9.0 %, 10.0 %, 12.0%, 88.0 %, 90.0 %, 91.0 %, 92.0%, 93.0 %, 94.0 %, 95.0 %, 96.0 %, 97.0 %, 98.0 %, 99.0 %, 99.1 %, 99.2 %, 99.3 %, 99.4 %, 99.5 %, 99.6 %, 99.7 %, 99.8 %, 99.9 %, o 100.0%.

En una modalidad preferida, el ADN genómico se analiza por PCR en tiempo real.

Una modalidad preferida es un método para el diagnóstico del cáncer, que comprende el uso del método de la invención para determinar el estado de metilación de una posición CpG del gen TMEFF 2 y/o una región regulatoria del mismo, en donde la presencia de la metilación en CpG es indicativa de la presencia de cáncer. En una modalidad preferida, el método de la invención es un método para el diagnóstico del cáncer. Comprende proporcionar el ácido nucleico bicatenario; convertir dicho ácido nucleico de forma que la 5-metilcitosina permanezca sin cambios, mientras la citosina no metilada se convierte a uracilo o a otra base que se distingue de la citosina en su comportamiento de apareamiento de bases, dicha reacción lleva a dos hebras de ácidos nucleicos convertidas diferentes que ya no son complementarias entre sí; y analizar ambas hebras de ácidos nucleicos convertidas, caracterizadas además porque al menos una de las dos hebras se analiza en una reacción específica de metilación. De este modo se determina la metilación de la citosina de una posición CpG del gen TMEFF 2 o de una región regulatoria del mismo es decir se determina la presencia o ausencia de metilación de la citosina y/o el grado de metilación o no metilación. La presencia de metilación de la citosina o la presencia de una metilación parcial de la citosina es entonces indicativa de la presencia de cáncer.

Estuche.

Aspectos de la presente descripción se refieren a un estuche que comprende un contenedor, uno o más iniciadores, y una enzima o reactivo para la conversión del ácido nucleico. Aspectos de la presente descripción se refieren a un estuche que comprende un contenedor, un reactivo bisulfito o una citidina-deaminasa, y cuatro o más iniciadores. Preferentemente dicho estuche comprende adicionalmente una, dos o más sondas; una, dos o más moléculas bloqueadoras o ambas.

Un estuche de la descripción es un estuche para realizar una o más modalidades del método de la invención. Dicho estuche comprende un contenedor, uno o más iniciadores, una enzima o reactivo para la conversión de un ácido nucleico. Preferentemente, dicho estuche comprende al menos una sonda, al menos un bloqueador, o ambos. Un estuche de mayor preferencia, comprende un contenedor, 1, 2, 3, 4, 5, 6, 7, 8, o más iniciadores, un reactivo bisulfito y/o una citidina-deaminasa, 1, 2, 3, 4 o más sondas, y 1, 2, 3,4 o más bloqueadores una enzima o reactivo para la conversión de un ácido nucleico

Un estuche de la descripción comprende un contenedor, cuatro iniciadores, y una enzima o reactivo para la conversión

del ácido nucleico. Preferentemente, dicha enzima es una citidina-deaminasa. Preferentemente, dicho re-activo es un reactivo bisulfito. Preferentemente, dichos uno o más iniciadores son 1,2,3,4,5, 6, 7,8, o más iniciadores.

5 Un estuche preferido adicional comprende 1, 2, o más sondas; 1, 2, o más bloqueadores; o combinaciones de los mismos.

10 Un estuche preferido además comprende uno o más reactivos, dispositivos o enzimas adicionales necesarias o útiles para realizar una reacción de PCR de los métodos descritos en la presente descripción o realizar una conversión de ácido nucleico descrita en la presente descripción. Preferentemente, tales uno o más reactivos, dispositivos o enzimas adicionales son reactivos, dispositivos o enzimas necesarios o útiles para realizar un método de PCR en tiempo real; para realizar una conversión con bisulfito; o ambas.

Una persona experta en la técnica conoce tales reactivos, dispositivos o enzimas adicionales.

15 Un estuche preferido es además un estuche, en donde el uno o más iniciadores comprenden dos pares de iniciadores, caracterizados además porque un par es respectivamente específico por una de las dos hebras del ácido nucleico bicatenario proporcionado. En un estuche preferido, el uno o más iniciadores comprende dos iniciadores, caracterizados además porque uno de dichos iniciadores es específico por una de las dos hebras del ácido nucleico bicatenario proporcionado, y en donde el otro de dichos iniciadores es específico por la otra de las dos hebras del ácido nucleico bicatenario proporcionado. Un estuche preferido particular comprende dos o más iniciadores, en donde uno de dichos iniciadores es específico por una hebra convertida del ácido nucleico bicatenario proporcionado, y en donde el otro es específico por la otra hebra convertida del ácido nucleico bicatenario proporcionado.

Uso de un método de la invención.

25 Aspectos particulares de la invención se refieren al uso del método de la invención. Particularmente, el uso de un método de la invención se prefiere para al menos uno de los siguientes con respecto a un paciente o individuo: diagnóstico de una afección, pronóstico de una afección, predicción de la respuesta a un tratamiento, diagnóstico de una predisposición a una afección, diagnóstico de una progresión de una afección, determinación del grado de una afección, determinación del estado de una afección, clasificación de una afección, caracterización de una afección, o combinaciones de los mismos, en donde

30 la afección es una condición sana o un evento adverso, el evento adverso comprende al menos una categoría seleccionada del grupo que comprende: interacciones de fármacos no deseadas; enfermedades de cáncer, enfermedades proliferativas o enfermedades asociadas con estas; mal funcionamiento del SNC; daño o enfermedad; síntomas de agresión o comportamiento alterado; consecuencias clínicas, psicológicas y sociales del daño cerebral; trastornos psicóticos y trastornos de la personalidad; demencia y/o síndromes asociados; enfermedad cardiovascular del tracto gastrointestinal; mal funcionamiento, daño o enfermedad del sistema respiratorio; lesión, inflamación, infección, inmunidad y/o convalecencia; mal funcionamiento, daño o enfermedad del cuerpo como una anomalía en el proceso de desarrollo; mal funcionamiento, daño o enfermedad de la piel, de los músculos del tejido conectivo o de los huesos; mal funcionamiento, daño o enfermedad endocrino o metabólico; y cefaleas o disfunción sexual. En consecuencia se obtiene un ácido nucleico a partir de una muestra derivada de un individuo o paciente. Dicho ácido nucleico después se analiza de acuerdo con el método de la invención. Preferentemente, por lo tanto se usa un estuche de la **descripción**. Los resultados obtenidos por este análisis permiten después dicho diagnóstico de una afección, pronóstico de una afección, predicción de la respuesta a un tratamiento, diagnóstico de una predisposición a una afección, diagnóstico de una progresión de una afección, determinación del grado de una afección, determinación del estado de una afección, clasificación de una afección, caracterización de una afección, o combinaciones de los mismos.

50 Particularmente, el uso de un método de la invención se prefiere para distinguir tipos celulares o tejidos, o para investigar la diferenciación celular. En consecuencia un ácido nucleico se obtiene ex vivo a partir de muestras de células, tipos de células o tejido. Dicho ácido nucleico después se analiza de acuerdo con el método de la invención. Preferentemente, por lo tanto se usa un estuche de la descripción. Los resultados obtenidos por este análisis caracterizaron las células, tipos de célula o tejido. Con esto los resultados permiten la distinción de tipos celulares o tejidos, o la investigación de la diferenciación celular.

Breve descripción de las figuras.

55 La Figura 1 muestra una visión general de una modalidad, en donde el ADN genómico se convierte por medio de bisulfito. Las dos hebras convertidas resultantes bisulfito superior y bisulfito inferior después se analizan respectivamente en una reacción específica de metilación. De este modo una hebra convertida con bisulfito se analiza con respecto a la presencia de metilación de una o más posiciones CpG, mientras la otra hebra convertida se analiza con respecto a la ausencia de metilación de la misma o más posiciones CpG.

60 La Figura 2 da una visión general del ensayo HQM diseñado así como el diseño del ensayo QM del Ejemplo 1. El ensayo HQM tiene una reacción HM específica de no metilación (a), en donde se usa la hebra de ADN convertida con bisulfito superior del gen TMEFF2. Debajo se dan las secuencias de los iniciadores, el bloqueador y la sonda usados. El

ensayo HQM tiene una reacción HM específica de metilación (B), en donde se usa la hebra de ADN convertida con bisulfito inferior del gen TMEFF2. Debajo se dan las secuencias de los iniciadores, el bloqueador y la sonda usados. El ensayo QM es específico de metilación y la no metilación, en donde se usa la hebra de ADN convertida con bisulfito inferior del gen TMEFF2. Debajo se dan las secuencias de los iniciadores y las sondas usados. Las secuencias o las

5

secuencias complementarias inversas de los iniciadores, bloqueadores y sondas se indican en las secuencias mostradas: subrayado una vez = iniciador directo respectivo; subrayado dos veces= iniciador inverso respectivo, en letras gruesas = bloqueador respectivo, cursiva = sondas respectivas, gris resaltado = nucleótidos de posiciones CpG o nucleótidos de iniciadores, bloqueadores o sondas que corresponden a posiciones CpG.

10

La Figura 3 muestra los resultados del experimento QM del Experimento 1. El ensayo QM funciona bien en comparación a otros ensayos QM, porque es capaz de detectar 1% de metilación. La Figura muestra los gráficos de las amplificaciones de la sonda CG (sonda específica de metilación) y la sonda tG (sonda específica de no metilación). Cada gráfico muestra las curvas de amplificación del ADN diferencialmente metilado convertido con bisulfito aplicado. La Figura 4 muestra los resultados del experimento HQM del Experimento 1. El ensayo HQM funciona significativamente mejor que el ensayo QM. Es capaz de detectar 0.1 % de metilación. Tiene una sensibilidad relativa de 1:1000. La Figura muestra los gráficos de las amplificaciones de la sonda CG (sonda específica de metilación) y la sonda tG (sonda específica de no metilación). Cada gráfico muestra las curvas de amplificación del ADN diferencialmente metilado convertido con bisulfito aplicado.

15

La Figura 5 muestra una comparación de los ensayos QM y HQM (gráficas lineales) del Experimento 1. Esta da además la mediana de la relación de los valores de Ct (mediana de la relación CT), la desviación estándar de la relación de los valores Ct (DE de la relación CT) así como las correspondientes puntuaciones de fisher (puntuación de fisher) con respecto al grado de metilación del ADN aplicado. Las puntuaciones de fisher del ensayo HQM son más altas que las puntuaciones de fisher del método QM lo que significa que el ensayo HQM tiene mayor reproducibilidad.

20

La Figura 6 muestra una comparación de los ensayos QM y HQM (gráficos logarítmicos). Esta da además la mediana de la relación de los valores de Ct (mediana de la relación CT), la desviación estándar de la relación de los valores Ct (DE de la relación CT) así como las correspondientes puntuaciones de fisher (puntuación de fisher) con respecto al grado de metilación del ADN aplicado. Las puntuaciones de fisher del ensayo HQM son más altas que las puntuaciones de fisher del método QM lo que significa que el ensayo HQM tiene mejor reproducibilidad. El ensayo HQM en contraste con el ensayo QM es capaz de diferenciar entre 0 % y 0.1 % de metilación y de diferenciar entre 0.5 % a 1.0 % de metilación.

25

30

Definiciones.

En aspectos particulares, el término "patrón de metilación" se refiere a, pero sin limitarse a, la presencia o ausencia de metilación de uno o más nucleótidos. De este modo dichos uno o más nucleótidos se comprenden en una sola molécula de ácido nucleico. Ellos tienen la habilidad de estar metilados o estar no metilados. El término "estado de metilación" puede además usarse, pero sin limitarse a, en donde solamente se considera un solo nucleótido. Un patrón de metilación se puede cuantificar, en donde se considera más de un ácido nucleico.

35

En aspectos particulares, el término "estado de metilación" se refiere a, pero sin limitarse a, la presencia o ausencia de metilación de uno o más nucleótidos. De este modo dicho nucleótido tiene la habilidad de estar metilado o de estar no metilado. Un patrón de metilación se puede cuantificar, en donde se considera más de un ácido nucleico.

40

En aspectos particulares, el término "sensibilidad" se refiere a, pero sin limitarse a, la medida de la habilidad de un método o en particular una PCR de detectar correctamente un evento o condición, particularmente la presencia o ausencia de metilación. Un método o PCR que tiene una pobre sensibilidad produce un alto índice de falsos negativos. Por ejemplo, la presencia o ausencia de metilación es indicativa de una enfermedad. Los falsos negativos llevan a la situación donde los individuos que tienen dicha enfermedad se identifican falsamente como libres de esa enfermedad particular. El peligro potencial de un falso negativo resulta en que el individuo enfermo permanecerá sin diagnosticar y sin tratamiento durante cierto período de tiempo, durante el cual la enfermedad puede progresar a una etapa más avanzada en donde los tratamientos, si los hay, pueden ser menos eficaces. Matemáticamente, la sensibilidad se puede describir como: $\text{sensibilidad} = \text{TP}/(\text{TP}+\text{FN})$. De este modo TP representa un resultado positivo verdadero y FN un resultado negativo falso. Un resultado positivo verdadero significa que el resultado del método es indicativo de la presencia de una afección y la afección está presente. Un resultado negativo falso es donde el resultado del método es indicativo de la ausencia de una afección y la afección no está presente.

45

50

55

En aspectos particulares, el término "especificidad" se refiere a, pero sin limitarse a, la medida de la habilidad de un método o en particular una PCR de identificar con precisión un evento o condición, particularmente la presencia o ausencia de metilación. Un método o PCR que tiene una pobre especificidad produce un alto índice de falsos positivos. Por ejemplo, la presencia (o ausencia) de metilación es indicativa de una enfermedad. Los resultados falsos positivos llevan después a la situación, en donde individuos sanos se identifican falsamente como que tienen una enfermedad. Un inconveniente de los falsos positivos resulta en que obligan a los pacientes a someterse a tratamientos o procedimientos médicos innecesarios con riesgos inherentes, estrés emocional y financiero, y que podrían tener efectos adversos sobre la salud del paciente. Matemáticamente, la especificidad se puede describir como: $\text{Especificidad} = \text{TN}/(\text{FP}+\text{TN})$. De este

60

modo TN representa un resultado negativo verdadero y FP un resultado positivo falso. Un resultado negativo verdadero es donde el resultado de un método es negativo y la afección no está presente. Un resultado positivo falso es donde el resultado de un método es positivo y la afección no está presente.

5 En aspectos particulares, el término "específico de metilación" se refiere a, pero sin limitarse a, la dependencia de la presencia o ausencia de metilación. El término "específico de metilación" es el opuesto al término "específico de no metilación" o el término "inespecífico de metilación".

10 En aspectos particulares, el término "específico de no metilación" o "inespecífico de metilación" se refiere a, pero sin limitarse a, la independencia de la presencia o ausencia de metilación. El término "específico de no metilación" o el término "inespecífico de metilación" es el opuesto al término "específico de metilación".

15 En aspectos particulares, el término "dinucleótido CpG" se refiere a, pero sin limitarse a, la secuencia 5'-CG-3' en un ácido nucleico, particularmente es un ADN, ARN, o PNA, y más particularmente en un ADN genómico.

En aspectos particulares, el término "posición CpG" se refiere a, pero sin limitarse a, un lugar en el ácido nucleico bicatenario, en donde un dinucleótido CpG se presenta en una hebra y otro dinucleótido CpG complementario inverso se presenta en la otra hebra complementaria inversa.

20 En aspectos particulares, el término "análisis de la metilación" se refiere a, pero sin limitarse a, el análisis de la presencia o ausencia de uno o más patrones de metilación. Sinónimamente, se refiere a, pero sin limitarse a, el análisis de la presencia o ausencia de metilación de una o más citosinas.

25 En aspectos particulares, el término "secciones correspondientes" se refiere a, pero sin limitarse a, dos secciones, una en cada hebra, en donde ambas secciones son parcialmente inversas complementarias una a la otra antes de la conversión. Pero ya no son inversas complementarias después de la conversión.

30 En aspectos particulares, el término "secciones solapadas" se refiere a, pero sin limitarse a, dos secciones, una en cada hebra, en donde ambas secciones son parcialmente inversas complementarias una a la otra antes de la conversión. Pero ya no son inversas complementarias después de la conversión.

35 En aspectos particulares, el término "secciones adyacentes" se refiere a, pero sin limitarse a, dos secciones, una en cada hebra, en donde una sección es inversa complementaria a una sección en la otra hebra respectiva, en donde dicha sección inversa complementaria se localiza inmediatamente antes o después de la otra sección que se considera. Las secciones adyacentes no son antes ni después de la conversión inversas complementarias una de la otra.

40 En aspectos particulares, el término "secciones diferentes" se refiere a, pero sin limitarse a, dos secciones, una en cada hebra, en donde ninguna de las secciones es inversa complementaria de la otra antes de la conversión y en donde la sección complementaria inversa de una sección no se localiza inmediatamente antes o después de la otra sección que se considera. Las secciones diferentes no son antes ni después de la conversión inversas complementarias una de la otra.

45 El término "HQM" se refiere en la presente descripción a una modalidad preferida particular de la invención. De este modo "HQM" significa Ensayo de Metilación Cuantitativo Pesado

EJEMPLOS

Ejemplo 1: Comparación del método HQM con el método QM

50 *Método QM:* El método QM tiene un rendimiento relativamente bueno debido a una calibración interna. De este modo el método usa la relación de la señal de la sonda específica por el ADN metilado a la señal de la sonda específica por el ADN no metilado. La desventaja del método QM es que tiene una sensibilidad limitada. Esto se basa en el mismo en i) que la amplificación es inespecífica de metilación; ii) que la señal específica por el ADN metilado disminuye con la presencia de una gran porción que aumenta de ADN no metilado; y iii) que la señal específica por el ADN no metilado disminuye con la presencia de una gran porción que aumenta de ADN metilado. Por lo tanto el método tiene una pobre resolución asociada al error cuando se analiza una muestra con menos del 10% de ADN metilado (90 % de no metilación) o cuando se analiza una muestra con más del 90 % de ADN metilado (10% de no metilación). Los valores menores que el 1 % de metilación (99 % de no metilación) o mayores que el 99 % de metilación (1% de no metilación) no se detectan correctamente y confiablemente.

60 *El método HQM:* El método HQM comprende por ejemplo, pero sin limitarse a, dos reacciones HM combinadas en una sola reacción. En la reacción HM A un ADN metilado de una región de interés se amplifica. La amplificación se detecta en el canal de fluorescencia A. En la reacción HM el ADN no metilado B de la misma región de interés se amplifica. La

amplificación se detecta en el canal de fluorescencia B. Las dos reacciones HM se realizan en paralelo por el uso de ambas hebras de ADN convertidas. La reacción A de la hebra convertida inferior y la reacción B de la hebra convertida superior, o viceversa. De este modo ambas reacciones revisten la misma región genómica de interés y por lo tanto se basan en la misma información de metilación. El bloqueador para el enriquecimiento del ADN metilado de la reacción HM A se localiza en las posiciones CpG idénticas a las del bloqueador para el enriquecimiento del ADN no metilado de la reacción HM B. De este modo el diseño del bloqueador preferido con las mejores propiedades de discriminación se usa en ambas reacciones HM. Esto significa que un bloqueo del iniciador rico en citosina se prefiere para la amplificación del ADN metilado, porque es particularmente eficaz. Por otro lado, un bloqueo del iniciador rico en guanina se prefiere para la amplificación del ADN no metilado, porque es particularmente eficaz. En ambos casos el desajuste más fuerte energéticamente (desajuste citosina/adenina) se usa para la prevención de la unión del bloqueador en el amplificado deseado respectivamente. Preferentemente las sondas para la detección revisten además las mismas posiciones CpG. Además en este caso las sondas pueden diseñarse de la manera más específica, en donde se usa un desajuste citosina/adenina, el de la diferencia energética más fuerte. Esta es una ventaja adicional en comparación al método QM, en donde una sonda tiene que ser comparablemente más inespecífica. Esto es porque, la discriminación se basa en una diferencia energéticamente menor de un desajuste timina/guanina.

Los resultados del método HQM se pueden obtener de acuerdo con al menos uno de los dos algoritmos HASTA AQUÍ:
 A) Determinación de la concentración del ADN metilado así como la determinación de la concentración del ADN no metilado por medio del uso de una serie de diluciones de un estándar. Preferentemente, tal estándar es ADN metilado 50%. SE puede usar simultáneamente para ambas reacciones HM.
 B) Generación directa de la relación de los valores Ct (ciclos de umbral además conocidos como puntos de cruce). Adicionalmente, se prefiere calibrar con ADN metilado 50%.

Esto asegura que suficientes componentes del PCR están presentes para ambas reacciones, sin considerar cuando las dos reacciones HM de las reacciones HQM alcanzan respectivamente sus máximos de amplificación.

Ventajas del método HQM: Un método HQM en dos reacciones independientes. En este caso, se basa en dos reacciones HM independientes. Ambas son altamente sensibles porque ellas amplifican la metilación específicamente. Esto tiene la ventaja de que las señales generadas son independientes de la relación mezclada de ADN metilado y no metilado. Debido a esto se alcanza una sensibilidad mucho más alta por una reacción HQM en comparación a una reacción QM. Adicionalmente, debido a esto se logra una precisión mucho más alta por una reacción HQM que por una sola reacción HM de un método HM convencional.

Debido a que el método HQM se basa en dos reacciones completamente independiente, las señales obtenidas no son ambiguas. Se obtienen curvas de señales de amplificación de inclinación pareja (pendientes) a relaciones de mezcla muy bajas, hasta 1:1000, de ADN metilado a no metilado o de ADN no metilado a metilado. La determinación de los valores Ct es por lo tanto más precisa. No se distorciona por una pendiente demasiado pequeña. Esto tiene el efecto de una resolución más alta y una precisión más alta del método HQM en comparación el método QM. [incluidos al final de las secciones de la modalidad]

Se realizaron un experimento QM y un experimento HQM para el análisis de una región genómica del gen TMEFF2 además conocida como TPEF. Ambos experimentos corrieron en paralelo y se repitieron cuatro veces. Los mismos reactivos, enzimas y mezclas de ADN metilado y no metilado se usaron para cada método. La siguiente Tabla I da una visión general del ADN aplicado.

ES 2 538 214 T3

Tabla 1 Visión general de la cantidad aplicada de ADN convertido con bisulfito por reacción QM o HQM.

metilo. bis-ADN ng/PCR	nometil. bis-ADN ng/PCR	total bis-ADN ng/PCR	M%
0,00	10,00	10,00	0,0
0,05	0,95	10,00	0,2
0,05	49,00	50,00	0,1
0,10	9,90	10,00	1,0
0,50	9,50	10,00	10,0
2,50	7,50	10,00	25,0
5,00	5,00	10,00	50,0
7,50	2,50	10,00	75,0
10,00	0,00	10,00	100,0

La Tabla 2 da una visión general de los iniciadores, bloqueadores y sondas usados del experimento HQM.

iniciador directo A	Sec. con ident.: 1	núm.	aaaaaaaaaaaactcctctacatac
iniciador inverso A	Sec. con ident.: 2	núm.	ggttattgtttgggtaataaatg
bloqueador A	Sec. con ident.: 3	núm.	aCATACaCCaCaaaTaaaTTaCCaaaAaCATCaaCCaa-PH
Sonda. A	Sec. con ident.: 4	núm.	FAM-ttCGgaCGtCGttgttCGg-BHQ
iniciador directo B	Sec. con ident.: 5	núm.	gaaagagaaaggttttttgtatac
iniciador inverso B	Sec. con ident.: 6	núm.	aatcactacctaaccaacaata
bloqueador B	sec. con ident.:	núm. de	tgtataCGtCGCGggtgggttGTGg-PH
	7		
Sonda. B	Sec. con ident.: 8	núm.	HEX-cttcccaaaccactaccaa-BHQ

Tabla 2 Visión general de los iniciadores, bloqueadores y sondas usados, sus sec. con núms. de ident. y sus secuencias del experimento HQM.

ES 2 538 214 T3

Cada mezcla de reacción HQM (20µl) tiene los siguientes componentes:

5	agua		1.2 µl
	MgCl ₂	3.5 mmol/l	2.0 µl
	iniciador directo A	0.30 µmol/l	0.6 µl
	iniciador inverso A	0.30 µmol/l	0.6 µl
10	bloqueador A	4.00 µmol/l	0.8 µl
	Sonda. A	0.20 µmol/l	0.4 µl
	iniciador directo B	0.30 µmol/l	0.6 µl
15	iniciador inverso B	0.30 µmol/l	0.6 µl
	bloqueador B	4.00 µmol/l	0.8 µl
	Sonda. B	0.20 µmol/l	0.4 µl
20	10x mezcla de reactivos		2.0 µl
	ADN (ver Tabla 1)		10.0 µl

25 Se usó la mezcla de reactivos 10x del estuche FastStart (Roche). El experimento HQM se corrió en una máquina de PCR ABI 7900 con el siguiente programa de temperaturas: 95°C 10 min, 45 ciclos de 95 °C 15 s (velocidad de incremento gradual 2°C/s), 56 °C 30s (velocidad de incremento gradual 2°C/s) (punto de detección), 72 °C 30 s (velocidad de incremento gradual 2°C/s).

30 La Tabla 3 da una visión general de los iniciadores, bloqueadores y sondas usados del experimento QM.

35	iniciador directo A	Sec. con núm. ident.: 1	aaaaaaaaaaaactcctctacatac
	iniciador inverso A	Sec. con núm. ident.: 2	ggttattgttgggtaataaatg
	Sonda. A	Sec. con núm. ident.: 4	FAM-ttCGgaCGtCGttgttCGg-BHQ
	Sonda. C	Sec. con núm. ident.: 9	HEX-tcaaccaacaacaacatccaa-BHQ
40	Tabla 3 Visión general de los iniciadores, bloqueadores y sondas usados, sus sec. con núms. de ident. y sus secuencias del experimento QM.		

Cada mezcla de reacción QM (20µl) tiene los siguientes componentes:

45	agua		2.8 µl
	MgCl ₂	3.5 mmol/l	2.0 µl
	iniciador directo A	0.30 µmol/l	0.6 µl
50	iniciador inverso A	0.30 µmol/l	0.6 µl
	Sonda. A	0.20 µmol/l	0.4 µl
	Sonda. C	0.20 µmol/l	0.4 µl
55	10x mezcla de reactivos		2.0 µl
	ADN (ver Tabla 1)		10.0 µl

60

Se usó la mezcla de reactivos 10x del estuche FastStart (Roche). El experimento QM se corrió en una máquina de PCR ABI 7900 con el siguiente programa de temperaturas: 95°C 10 min, 45 ciclos de 95 °C 15 s (velocidad de incremento gradual 2°C/s), 56 °C 30s (velocidad de incremento gradual 2°C/s) (punto de detección), 72 °C 30 s (velocidad de incremento gradual 2°C/s).

5 Resultados: En contraste al ensayo QM el ensayo HQM es capaz de diferenciar entre 0 % y 0.1% de metilación, entre 0.1 % y 0.5%, y entre 0.5 % ay 1 % de metilación. Los resultados del ensayo HQM se caracterizan más aun por puntuaciones de fisher más altas que los resultados del ensayo QM. Esto significa que el ensayo HQM tiene una reproducibilidad mejor que el ensayo QM es decir, tiene una mejor confiabilidad. Adicionalmente, el ensayo HQM tiene una sensibilidad de 1: 1000.

15 El método HQM tiene entre otras las ventajas de que: (i) la misma secuencia o región genómica se usa como un marcador y como referencia; (ii) los números de copias y el polimorfismo de las regiones de interés se detectan simultáneamente; (iii) las señales de bajos niveles de metilación (< 10 %) o altos niveles de metilación (> 90 %) tienen una buena señal (correcta llamada de valores Ct; más alta precisión de relaciones Ct (puntuaciones de fisher)); (iv) salva la materia prima / necesita solamente bajas cantidades de materia prima, y (v) es capaz de cuantificar confiablemente en el intervalo de 0.1 - 10 % de metilación y en el intervalo de 90 - 99.9 % de metilación.

20 El método HQM se puede realizar como un método basado en una PCR en tiempo real, como un método basado en PCR en bloque ciclador en combinación con sistemas de detección adecuados como, por ejemplo, pero sin limitarse a esto, un gel de agarosa o una plataforma de hibridación (por ejemplo matriz de oligonucleótidos), MSP o Headloop.

LISTADO DE SECUENCIAS

- 25 <110> Epigenomics AG
- <120> UN MÉTODO PARA EL ANÁLISIS DE METILACIÓN DE ÁCIDO NUCLEICO
- <130> E60001PCT
- <150> EP06090132.9
- <151> 2006-08-08
- 30 <160> 11
- <210> 1
- <211> 25
- <212> ADN
- <213> Secuencia artificial
- 35 <220>
- <223> iniciador directo A
- <400> 1
- aaaaaiaaaa aactcctcta catac
- 25
- 40 <210> 2
- <211> 24
- <212> ADN
- <213> Secuencia artificial
- <220>
- 45 <223> iniciador inverso A
- <400> 2

50 **ggttattggt tgggtaata aatg**
24

- <210> 3
- <211> 38
- <212> ADN
- 55 <213> Secuencia artificial
- <220>
- <223> bloqueador A
- <400> 3

60 **acatacacca caaataaatt accaaaaaca tcaaccaa**
38

<210> 4
 <211> 19
 5 <212> ADN
 <213> Secuencia artificial
 <220>
 <223> sonda A
 <400> 4
 10 **ttcggacgtc gttgttcgg**
 19

 <210> 5
 15 <211> 25
 <212> ADN
 <213> Secuencia artificial
 <220>
 <223> iniciador directo B
 20 <400> 5
 gaaagagaaa ggtttttttg tatac
 25

 <210> 6
 <211> 24
 <212> ADN
 <213> Secuencia artificial
 <220>
 30 <223> iniciador inverso B
 <400> 6
 aatcactacc taaaccaaca aata
 24
 <210> 7
 35 <211> 26
 <212> ADN
 <213> Secuencia artificial
 <220>
 <223> bloqueador B
 40 <400> 7

 tgtatacgtc gcggggtgggt tgtcgg
 26
 45

 <210> 8
 <211> 22
 50 <212> ADN
 <213> Secuencia artificial
 <220>
 <223> sonda B
 <400> 8
 55 **cttcccaaac accactaccc aa**
 22

 <210> 9
 60 <211> 22
 <212> ADN
 <213> Secuencia artificial

ES 2 538 214 T3

<220>
<223> sonda C
<400> 9
5 **tcaaccaaac aacaacatcc aa**
 22

10 <210> 10
<211> 113
<212> ADN
<213> Secuencia artificial
<220>
15 <223> Región genómica TMEFF 2 después de la conversión con bisulfito (hebra superior)
<400> 10
 gaaagagaaa ggTTTTTTTg tatatgTTgt gggTgggtg ttgggagtat TgTTgggta
 60
20 **gtggtgTTTg ggaaggggag agTgggTTTT atttTtTggt ttaggtagtg att**
 113

25 <210> 11
<211> 113
<212> ADN
<213> Secuencia artificial
<220>
30 <223> Región genómica TMEFF 2 después de la conversión con bisulfito (hebra inferior):
<400> 11
 aaaaaaaaaa aactcctcta catacgccgc gaataaatta ccgaaaacat cgaccgaaca
 60
35 **àcgacgtccg aaaaaaaaaa aacgaactcc atttattaac ccaacaata acc**
 113

Reivindicaciones

- 5 1. Un método para el análisis de la metilación de un ácido nucleico bicatenario, que comprende convertir dicho ácido nucleico de forma tal que la 5-metilcitosina permanece sin cambio, mientras que la citosina no metilada se convierte a uracilo o a otra base que se distingue de la citosina en su comportamiento de apareamiento de base, dicha reacción lleva a dos hebras de ácidos nucleicos convertidas diferentes que ya no son complementarias entre sí, analizar ambas hebras de ácidos nucleicos convertidas en una reacción de detección para la presencia o ausencia de metilación de CpG en la misma posición, en donde
 - 10 a) se analiza la presencia de metilación en una o más posiciones CpG de una hebra convertida y la ausencia de metilación en la misma o más posiciones CpG de la otra hebra convertida; o
 - b) se analiza la presencia o ausencia de metilación en la misma o más posiciones CpG de ambas hebras convertidas.
- 15 2. El método de la reivindicación 1, en donde la conversión del ácido nucleico comprende un reactivo químico, tal como bisulfito, o una enzima, tal como citidina-deaminasa.
- 20 3. El método de la reivindicación 1, en donde analizar ambas hebras de ácidos nucleicos convertidas comprende el análisis de las secciones solapada, adyacentes o diferentes correspondientes de las hebras del ácido nucleico proporcionado originalmente
- 25 4. El método de la reivindicación 1, en donde analizar ambas hebras de ácidos nucleicos convertidas comprende
 - a) la cuantificación de la metilación o la no- metilación de una o más posiciones CpG; y
 - b) la cuantificación del ácido nucleico convertido; o la cuantificación de los ácidos nucleicos no convertidos.
- 30 5. El método de la reivindicación 1, en donde, analizar ambas hebras de ácidos nucleicos convertidas comprende al menos uno seleccionado del grupo que comprende: método de amplificación, método de PCR, método de amplificación isotérmico, método NASBA, método LCR, método de amplificación específico de metilación, método MSP (PCR específica de metilación), método MSP anidado, método HeavyMethyl™, método de detección, método de detección específico de metilación, método de secuenciación con bisulfito, detección por medio de microarreglos, detección por medio de microarreglos de oligonucleótido, detección por medio de enzimas de restricción, métodos de amplificación y detección simultáneos específicos de metilación, PCR en tiempo real, método de PCR en tiempo real HeavyMethyl™, método MSP MethyLight™, método MethyLight™, método MethyLight™ Algo™, método QM, método Headloop MethyLight™, método HeavyMethyl™ MethyLight™, método HeavyMethyl™ Scorpion™, método MSP Scorpion™, método Headloop Scorpion™, extensión del iniciador sensible a la metilación, y método Ms-SNuPE (extensión del iniciador de un solo nucleótido sensible a la metilación).
- 35 6. El método de la reivindicación 5, en donde analizar ambas hebras convertidas comprende el análisis de cada hebra convertida por una reacción del mismo método.
- 40 7. El método de la reivindicación 5, en donde analizar ambas hebras convertidas comprende el análisis de una hebra convertida por una reacción de un método y el análisis de la otra hebra convertida por una reacción de un método diferente.
- 45 8. El método de acuerdo con cualquiera de las reivindicaciones precedentes, en donde el ADN genómico se analiza por PCR en tiempo real.
- 50 9. Un método para el diagnóstico del cáncer, que comprende el uso del método de acuerdo con cualquiera de las reivindicaciones precedentes para determinar el estado de metilación de una posición CpG del gen TMEFF2 y/o una región regulatoria del mismo, en donde la presencia de la metilación en CpG es indicativa de la presencia de cáncer.

ADN cromosomal con citosinas parcialmente metiladas:

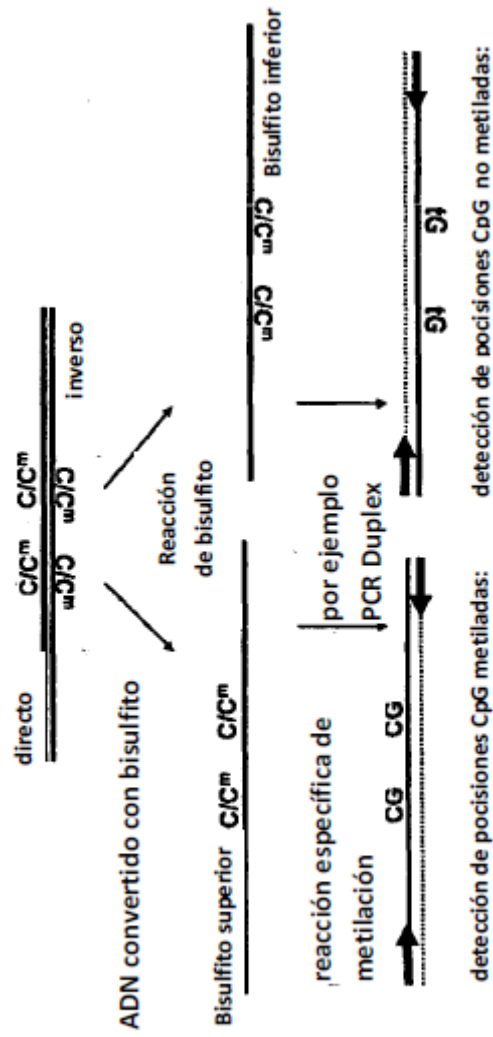


Figura 1

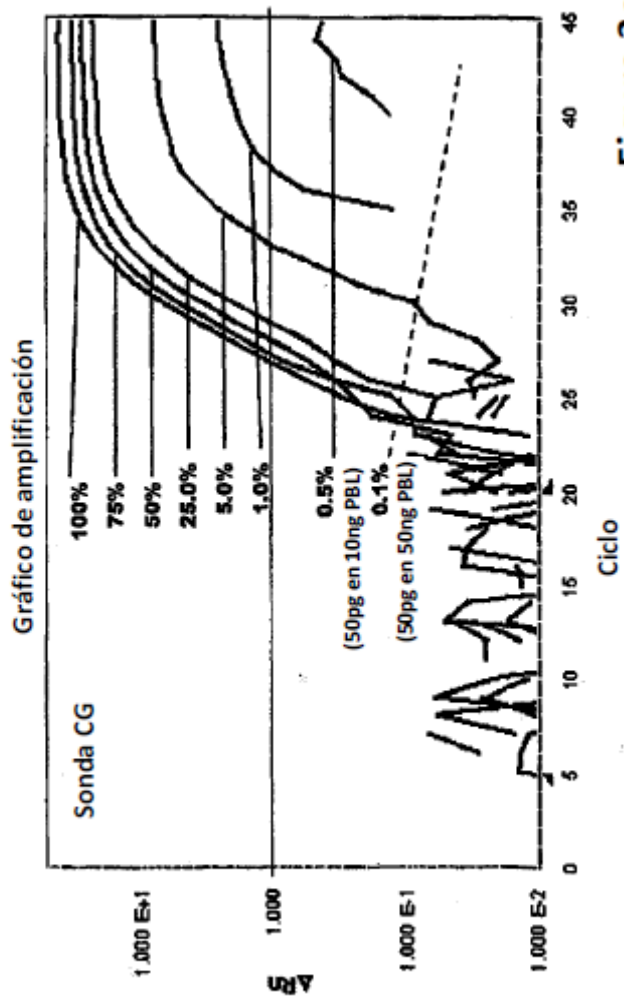


Figura 3a

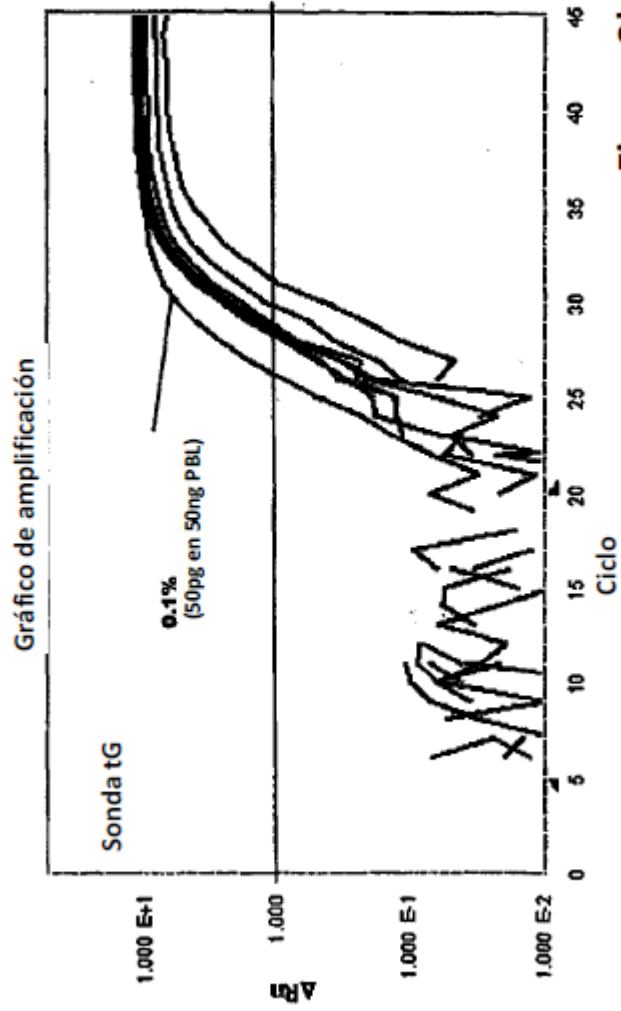


Figura 3b

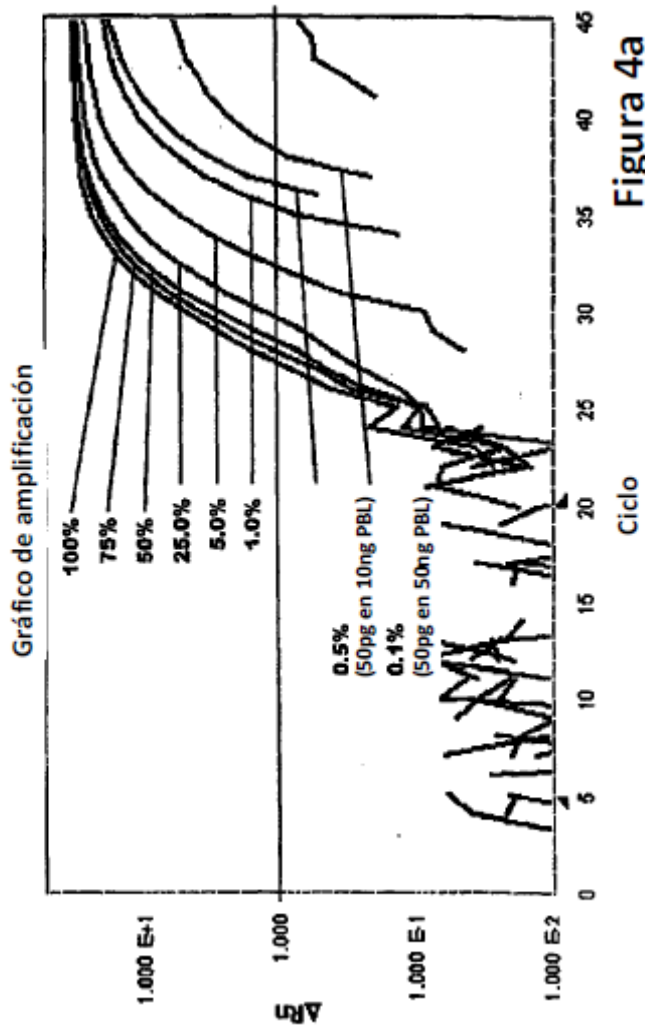


Figura 4a

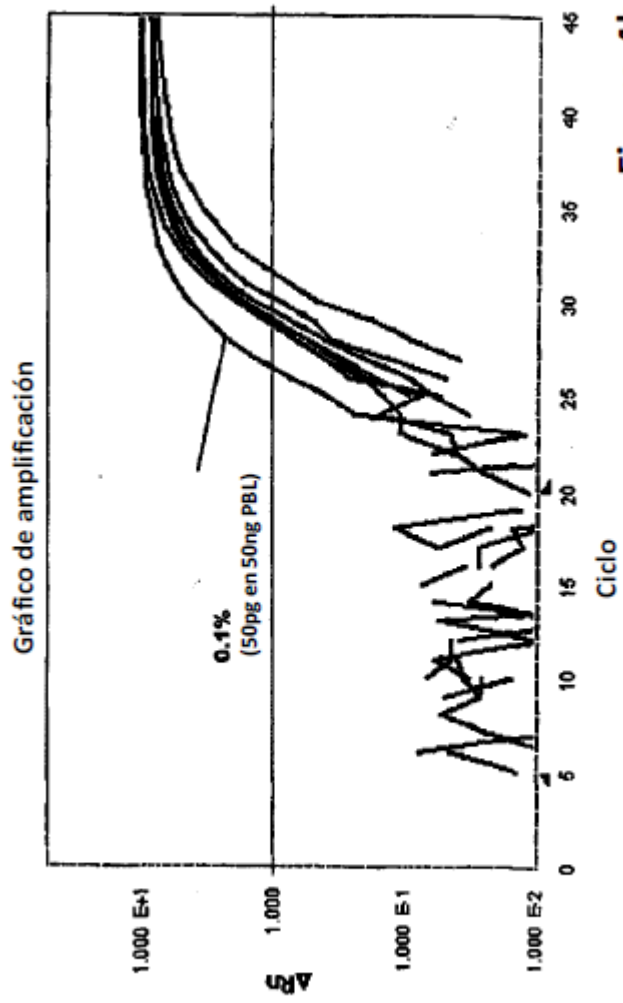
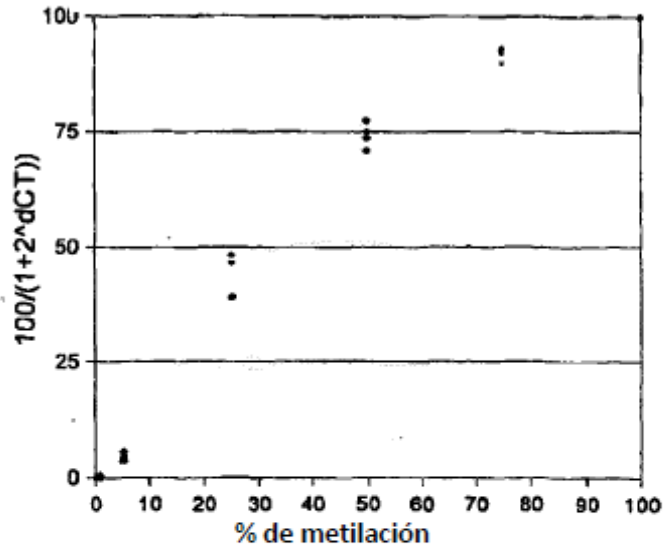


Figura 4b

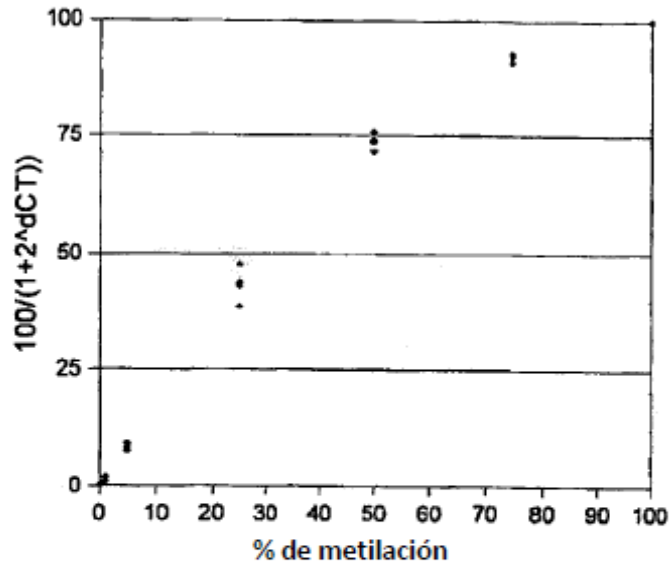
Relación del ensayo QM (gráfico lineal)



% M	Mediana del índice CT	DE del índice CT	Puntuación de Fisher	
0,0	0,001	0,000		
5	7,85	0,969	88,67	0% / 5%
25	42,81	4,874	49,47	5% / 25%
50	74,38	2,627	32,52	25% / 50%
75	92,33	1,413	36,18	50% / 75%
100	100,00	0,000	29,44	75% / 100%

Figura 5a

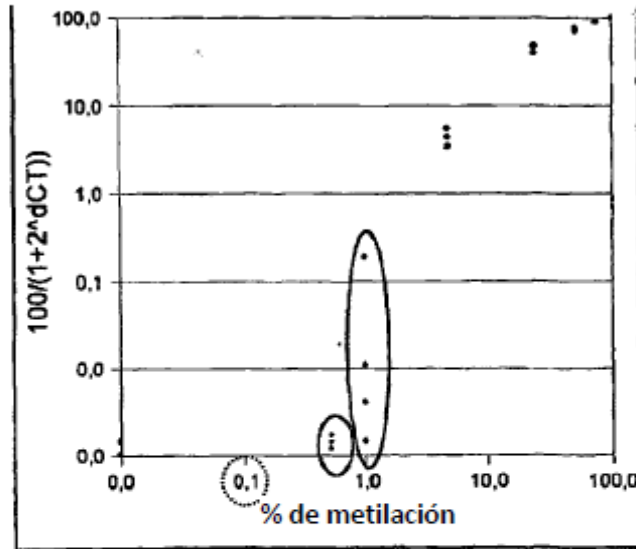
Relación del ensayo HQM (gráfico logarítmico)



% M	Mediana del índice CT	DE del índice CT	Puntuación de Fisher	
0,0	0,012	0,005		
5	7,85	0,691	128,71	0% / 5%
25	43,36	3,653	91,21	5% / 25%
50	73,98	1,742	57,22	25% / 50%
75	92,39	0,849	90,26	50% / 75%
100	100,00	0,000	88,45	75% / 100%

Figura 5b

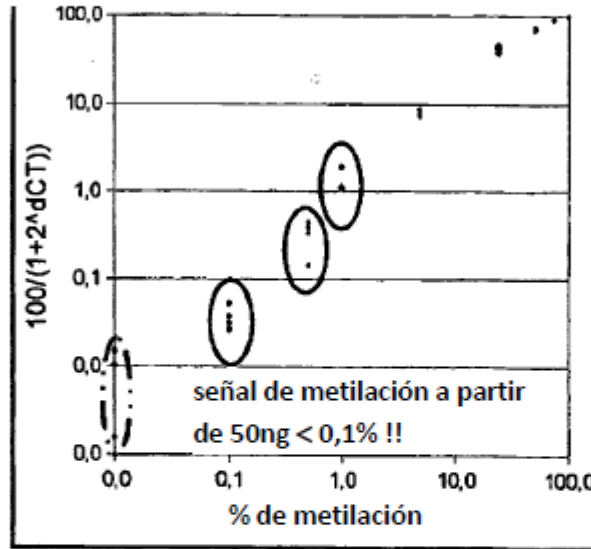
Relación del ensayo QM (gráfico logarítmico)



% M	Mediana del DE del		Puntuación de Fisher	
	índice CT	índice CT		
0,0	0,001	0,00		
0,10	0,000	0,00		
0,5	0,001	0,00		
1,0	0,007	0,09	0,00	0% / 1,0%
5	7,85	0,97	64,90	1% / 5%
25	42,81	4,87	49,47	5% / 25%
50	74,39	2,63	32,52	25% / 50%
75	92,33	1,41	36,10	50% / 75%
100	100,00	0,00	29,44	75% / 100%

Figura 6a

Relación del ensayo HQM (gráfico logarítmico)



% M	Mediana del índice CT	DE del índice CT	Puntuación de Fisher	
0,0	0,012	0,01		
0,10	0,034	0,01	2,79	0% / 0,1%
0,5	0,362	0,13	6,09	0,1% / 0,5%
1,0	1,143	0,40	3,5	0,5% / 1,0%
5	7,86	0,69	70,98	1% / 5%
25	43,36	3,65	91,21	5% / 25%
50	73,98	1,74	57,22	25% / 50%
75	92,39	0,85	90,26	50% / 75%
100	100,00	0,00	80,45	75% / 100%

Figura 6b