

19



OFICINA ESPAÑOLA DE
PATENTES Y MARCAS

ESPAÑA



11 Número de publicación: **2 546 848**

51 Int. Cl.:

C12Q 1/68

(2006.01)

12

TRADUCCIÓN DE PATENTE EUROPEA

T3

96 Fecha de presentación y número de la solicitud europea: **08.03.2007 E 07090040 (2)**

97 Fecha y número de publicación de la concesión europea: **19.08.2015 EP 1842926**

54 Título: **Un método para identificar una muestra biológica para el análisis de la metilación**

30 Prioridad:

10.03.2006 EP 06090032
30.05.2006 EP 06090091

45 Fecha de publicación y mención en BOPI de la traducción de la patente:
29.09.2015

73 Titular/es:

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

72 Inventor/es:

BERLIN, KURT, DR.;
DIETRICH, DIMO;
KLUTH, ANTJE, DR.;
SCHATZ, PHILIPP, DR.;
WANDELL, MICHAEL, DR. y
TETZNER, REIMO

74 Agente/Representante:

LAZCANO GAINZA, Jesús

ES 2 546 848 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 identificar una muestra biológica para el análisis de la metilación

5 Campo de la invención

La invención generalmente se relaciona con métodos nuevos y sustancialmente mejorados para identificar una muestra biológica para el análisis de la metilación que comprende un identificador particularmente su aplicación, uso y detección.

10 Antecedentes de aspectos de la invención

15 Análisis de la metilación. Muchas enfermedades, particularmente las enfermedades de cáncer, se acompañan por una expresión modificada del gen. Ésta puede ser una mutación de los genes mismos, lo que conduce a una expresión de proteínas modificadas o a una inhibición o una sobre-expresión de las proteínas o enzimas. Una modulación de la expresión puede sin embargo ocurrir además por modificaciones epigenéticas particularmente la metilación de ADN. Tales modificaciones epigenéticas no afectan la actual secuencia codificante del ADN. Se ha encontrado que los procesos de metilación de ADN tienen implicaciones sustanciales para la salud, y parece ser claro que el conocimiento acerca de los procesos de metilación y modificaciones del metabolismo del metilo y metilación del ADN son esenciales para entender las enfermedades, para la profilaxis, diagnóstico y terapia de las enfermedades.

20 El control preciso de los genes, que representan sólo una parte pequeña del genoma completo de mamíferos, es una cuestión de la regulación bajo la consideración del hecho que la parte principal del ADN en el cromosoma es no codificante. La presencia de tal ADN tronco que contiene intrones, elementos repetitivos y elementos transponibles activamente en potencia, requiere mecanismos efectivos para su supresión duradera (silenciamiento). Aparentemente, la metilación de citosina por metiltransferasas ADN dependientes S-adenosilmetionina (SAM), que forma 5-metilcitosina, representa un mecanismo de ese tipo para la modificación de interacciones ADN-proteína. Los genes se pueden transcribir por promotores libres de metilación, aun cuando se metilan ampliamente las regiones transcritas o no transcritas adyacentes. Esto permite el uso y la regulación de promotores de genes funcionales, mientras que se suprime el ADN tronco que incluye los elementos transponibles. La metilación tiene lugar además por la supresión a largo plazo de genes enlazados a X y puede conducir ya sea a una reducción o un aumento del grado de transcripción, dependiendo de donde ocurre la metilación en la unidad de la transcripción.

35 Casi la metilación completa de ADN natural en mamíferos se restringe a secuencias palíndromo dinucleótido citosina-guanosina (CpG) que se controlan por metil transferasas de ADN. Los dinucleótidos CpG son aproximadamente 1 a 2 % de todos los dinucleótidos y se concentran en las llamadas islas de CpG. Una definición generalmente aceptada de islas de CpG significa que una región larga de ADN de 200 pb tiene un contenido de CpG de al menos 50 %, y que la relación del número de dinucleótidos CG observados y el número de los dinucleótidos CG esperados es mayor que 0.6 (Gardiner-Garden, M., Frommer, M. (1987) J. Mol. Biol. 196, 261-282. Típicamente, las islas de CpG tienen al menos 4 dinucleótidos CG en una secuencia que tiene una longitud de 100 pares de bases.

40 Si las islas de CpG están presentes en áreas del promotor, tienen frecuentemente una función reguladora para la expresión del respectivo gen. Si la isla de CpG es hipometilada, puede tener lugar la expresión. La hipermetilación frecuentemente conduce a la supresión de la expresión. En el estado normal, se hipometila un gene del supresor del tumor. Si tiene lugar una hipermetilación, esto conducirá a una supresión de la expresión del gen supresor del tumor, que es frecuentemente observado en tejidos de cáncer. En contraste a ella, los oncogenes se hipermetilan en el tejido saludable, mientras que frecuentemente se hipometilan en el tejido de cáncer.

45 Mediante la metilación de citosina, se previene regularmente la unión de proteínas que regulan la transcripción. Esto conduce a una modificación de la expresión génica. En cuanto al cáncer, por ejemplo la expresión de genes que regulan la división celular se afecta de ese modo, es decir por ejemplo la expresión de genes de apoptosis se regula negativamente, mientras que la expresión de oncogenes se regula positivamente. La hipermetilación del ADN tiene sin embargo además una influencia a largo plazo sobre la regulación. Mediante la metilación de la citosina, las proteínas de acetilación de histona pueden unirse por su dominio específico a ADN 5-metilcitosina. Esto tiene como consecuencia que las histonas son de-acetiladas, lo que conducirá a una compactación más apretada del ADN. De ese modo, las proteínas reguladoras no tienen más la posibilidad de unirse al ADN.

50 Por la razón de esto, la detección de la metilación del ADN es importante con respecto a diagnosticar una enfermedad, pronosticar una enfermedad, predecir una respuesta al tratamiento, diagnosticar una predisposición de una enfermedad, diagnosticar una progresión de una enfermedad, evaluar una enfermedad, estadificar una enfermedad, clasificar una enfermedad, caracterizar una enfermedad, o para identificar un nuevo marcador asociado con una enfermedad. Una visión general del método para el análisis de la metilación del ADN puede ser obtenida de Laird PW. "The power and the promise of DNA methylation markers" Nat Rev Cancer 2003 abril; 3 (4):253-66. Muchos métodos para el análisis de la metilación se basan en el tratamiento del ADN genómico con el reactivo que diferencia entre las citosinas metiladas y no metiladas. En muchos casos, este reactivo es un reactivo de bisulfito que conduce a una conversión de citosinas no metiladas a uracilo o después de la amplificación a timina mientras que las citosinas metiladas permanecen sin cambios.

Necesidad pronunciada en la técnica. Al igual que muchos métodos modernos de flujos de trabajo de laboratorio para el análisis de la metilación se caracterizan en ese sentido un gran número de muestras que debe ser procesado. De ese modo es irrelevante, si se aplican métodos o flujos de trabajo para diagnosticar una enfermedad, pronosticar una enfermedad, predecir una respuesta al tratamiento, diagnosticar una predisposición de una enfermedad, diagnosticar una progresión de una enfermedad, evaluar una enfermedad, estadificar una enfermedad, clasificar una enfermedad, caracterizar una enfermedad, o identificar un nuevo marcador como metilación, ARN, o proteína que se asocia con una enfermedad. En cualquier caso, es importante que las muestras no se intercambien y ninguna muestra se contamine con otra muestra. Como técnica anterior relevante se considera lo siguiente:

De acuerdo con WO994385 las secuencias polimórficas endógenas se usan como identificador único para muestras biológicas. Estos identificadores enlazan la muestra a su fuente y a otra información relevante.

De acuerdo con la Patente de Estados Unidos 6,153,389 muestras forenses o médicas biológicas se marcan por la adición de ácidos nucleicos de secuencia conocida. Además utiliza iniciadores y su uso para la detección del ácido nucleico añadido en una reacción de amplificación resultando en una molécula de ácido nucleico de longitud específica.

Actualmente el solicitante no está consciente de cualquier técnica anterior, que aborda la cuestión de detectar el intercambio de muestra y/o contaminación cruzada de muestra para el análisis de la metilación. Los dos documentos citados anteriormente no enseñan un método para marcar una muestra biológica que resiste un tratamiento de bisulfito, tal como se usa muchas veces en el análisis de la metilación.

Resumen de aspectos de la invención

Los aspectos de la presente descripción se relacionan con composiciones y métodos para identificar una muestra biológica en el campo del análisis de la metilación que comprende al menos un identificador, particularmente, su aplicación, uso y detección.

Aspectos particulares proporcionan composiciones y métodos para identificar una muestra biológica en el campo del análisis de la metilación, en donde se proporcionan muestras biológicas, uno o más identificadores se aplican a una muestra, el (los) identificador(es) aplicado(es) se detectan o cuantifican, y se analiza la metilación del ADN de cada muestra biológica.

Aspectos particulares proporcionan composiciones y métodos para identificar una muestra biológica en el campo del análisis de la metilación, en donde el ADN de la muestra biológica que incluye el identificador se pone en contacto con un reactivo o enzima que diferencia entre las posiciones de citosina metiladas o no metiladas.

Aspectos particulares proporcionan composiciones y métodos para identificar una muestra biológica en el campo de análisis de la metilación, en donde la muestra biológica y el identificador se someten a los procedimientos experimentales. Por ejemplo, pero no se limitan a, en donde el ADN de la muestra se aísla, se trata con bisulfito, purifica, y desulfona.

Aspectos particulares proporcionan composiciones y métodos para identificar una muestra biológica en el campo del análisis de la metilación, en donde la detección o cuantificación se realiza simultáneamente con el análisis de la metilación.

Aspectos particulares proporcionan composiciones y métodos para identificar una muestra biológica en el campo de análisis de la metilación, en donde el identificador es al menos en parte un ácido nucleico. En aspectos particulares el identificador comprende al menos una citosina, al menos una guanina, o ambas; es una variante de un polimorfismo; y/o tiene una composición de base similar como la sección de ADN de interés. En aspectos particulares el identificador es parte del ADN genómico endógeno de la muestra biológica. En otros aspectos particulares, el identificador es parte de una molécula de ADN externo que se añade a la muestra biológica poco después de coleccionar la muestra o al comienzo de un procedimiento experimental.

Aspectos particulares proporcionan composiciones y métodos para identificar una muestra biológica en el campo de análisis de la metilación, en donde los identificadores aplicados de diferentes muestras se asignan a diferentes conjunto de identificadores de acuerdo con sus propiedades biológicas, químicas o físicas. En aspectos particulares los identificadores se asignan a conjuntos de variantes polimórficas de secuencias, a conjuntos de variantes polimórficas de longitud, a conjuntos de variantes polimórficas de nucleótidos simples, o a conjuntos de variantes polimórficas de delección.

Aspectos particulares proporcionan composiciones y métodos para identificar una muestra biológica en el campo de análisis de la metilación, en donde el identificador se detecta o cuantifica por ácidos nucleicos o análogos de estos que comprenden al menos una citosina y/o al menos una guanina.

Aspectos particulares proporcionan composiciones y métodos para identificar una muestra biológica en el campo de

análisis de la metilación, que se puede usar como un método de detección de intercambio de la muestra, contaminación cruzada, o ambos; como un método para identificar una muestra en un conjunto de muestra mezclada; como un método de una inhibición de amplificación; como un método de normalización, calibración o ambos; como un método de identificación de una contaminación por arrastre o ambos; como un método para determinar la velocidad de conversión de ADN.

Aspectos particulares proporcionan composiciones y métodos para controlar la exactitud de un proceso o método.

Aspectos particulares describen además estuches para realizar dichos aspectos particulares.

La propia invención se define por las reivindicaciones adjuntas.

Breve descripción de las figuras

La Figura 1 muestra una visión general sobre una modalidad de la invención. De acuerdo con esta modalidad dos identificadores se asignan el uno al otro, de manera que cada identificador pertenece a un conjunto diferente de identificadores. Un conjunto contiene 8 variantes de un polimorfismo de secuencia y las otras 8 variantes de un polimorfismo de longitud. Los iniciadores para la detección son los mismos para todas las variantes de un conjunto.

La Figura 2 muestra una visión general ilustrativa sobre un conjunto de 24 muestras. Una combinación única de identificadores se aplica a cada muestra. Cada identificador se detecta por medio de la hibridación de los productos de amplificación correspondientes. Como se puede ver fácilmente, cada combinación de identificador, por tanto cada muestra tiene su propio patrón de hibridación característico.

La Figura 3 muestra en la parte superior ilustrativa cómo se detecta un intercambio de muestra de la muestra 2 con la muestra 17. La Figura 3 muestra en la parte inferior ilustrativa cómo se detecta una contaminación cruzada de la muestra de la muestra 2 con la muestra 17.

La Figura 4 muestra dibujos esquemáticos de una hibridación. En A se muestra la orientación de la sonda en la matriz. B y C muestran hibridaciones de muestras. En B se usan dos plásmidos que se generaron por el dominio-iniciador 1 + dominio-iniciador 2 y dominio-iniciador 1 + dominio-iniciador 3. En C se usan dos plásmidos que se generaron por dominio-iniciador 1 + dominio-iniciador 2 y dominio-iniciador 1 + dominio-iniciador 4.

La Figura 5 muestra un dibujo esquemático de un microarreglo hibridado que detecta una contaminación de la muestra. Se usó una combinación de dos plásmidos.

La Figura 6A muestra un análisis en gel de agarosa de amplificados del plásmido 23 linealizado tratado con el bisulfito. 100 pg de plásmido 23 linealizado tratado con bisulfito se usaron para la amplificación.

La Figura 6B muestra un análisis en gel de agarosa de amplificados de plásmido 195 linealizado tratado con bisulfito. 100 pg de plásmido 23 linealizado tratado con el bisulfito se usaron para la amplificación. (m = tamaño estándar, la banda brillante es aproximadamente 200 pb)

La Figura 7 muestra la imagen de dos tubos de la matriz hibridados. A) Amplificados derivados del plásmido 23 de identificación molecular se usaron para la hibridación. B) Amplificados derivados del plásmido 195 de identificación molecular se usaron para la hibridación. Los amplificados de cada uno de los dos plásmidos de identificación molecular hibridan específicamente dos oligonucleótidos del tubo de la matriz (manchas oscuras marcadas por cuadrantes). Las manchas oscuras en la esquina de la imagen muestran manchas de control necesarias para la digitalización de los tubos de la matriz. Las manchas gris claro representan la hibridación inespecífica.

La Figura 8A muestra una vista general esquemática de un patrón de identificación de acuerdo con la invención. Un primer identificador se asigna a las muestras de las columnas 1, 5, 9 de una placa de microtitulación. Un segundo identificador se asigna a las muestras de las columnas 2, 6, 10. Un tercer identificador se asigna a las muestras de la columna 3, 7, 11 (identificador X = gris claro, identificador Y = gris medio, identificador Z = gris oscuro).

La Figura 8B muestra una vista general esquemática del patrón del identificador determinado por el análisis. Cada identidad del identificador detectado se asigna a la posición de la muestra de la que se usó una alícuota para determinar la identidad del identificador. Es obvio que un intercambio de muestra ocurrió en la primera corrida (muestras 5 y 6), así como en la tercera corrida (muestras 12 y 13).

Descripción detallada de aspectos de la invención

Para lograr varios propósitos técnicos, los aspectos de la invención enseñan composiciones y métodos para identificar una muestra biológica para el análisis de la metilación que comprende identificador, particularmente, su aplicación, uso y detección. Dichas composiciones y métodos comprenden proporcionar al menos una muestra biológica, aplicar al menos un identificador, detectar o cuantificar el (los) identificador(es) aplicado(s) y realizar un análisis de la metilación.

Aspectos particulares proporcionan métodos que comprenden al menos un identificador y al menos un ácido nucleico, que permite una detección o cuantificación de al menos un identificador incluso después del tratamiento con bisulfito, sulfuro o cualquier otro reactivo de conversión de ADN correspondiente. Aspectos particulares proporcionan además los métodos para la detección o cuantificación simultánea de al menos de un identificador aplicado y la detección o cuantificación de la metilación del ADN genómico de la muestra biológica proporcionada. Los aspectos particulares proporcionan combinaciones y ajustes adecuados de estos métodos entre sí de manera que en realidad cumplan el (los) propósito(s) técnico(s).

10 Ventajas de los aspectos de la invención.

En aspectos particulares, el método de la invención ilustrativa tiene la ventaja que permite el uso de identificadores junto con la conversión de ADN con bisulfito. Particularmente, esto por lo tanto, tiene las siguientes ventajas para el análisis de la metilación:

- Permite una detección del intercambio de la muestra
- Permite una detección de la contaminación cruzada de la muestra.
- Permite una detección de la contaminación por arrastre
- Además, permite una normalización y/o calibración de la muestra o del método de análisis de la metilación usado.
- Permite una identificación de una muestra en un conjunto mezclado de muestras.
- Permite calcular una velocidad de conversión para el tratamiento con bisulfito.
- Permite una detección de la inhibición de los procesos posteriores, particularmente, el análisis basado en PCR.
- Permite una evaluación del éxito de una etapa de hibridación.

25 En aspectos particulares, el método de la invención ilustrativo tiene la ventaja de que controla la corrida libre de error y exacta de un proceso o método, particularmente, de un método de alto rendimiento. De ese modo dicho método puede ser un método para el diagnóstico, pronóstico, o para el descubrimiento del marcador.

30 Método de aspectos de la invención.

El método de la invención es un método para identificar al menos una muestra biológica en el campo del análisis de la metilación, que comprende las etapas (a) y (b) en el orden indicado:

- (a) proporcionar un conjunto de muestras de al menos dos muestras biológicas, en donde al menos una muestra comprende ADN genómico metilado diferencialmente al menos en una posición;
- (b) aplicar al menos un identificador para cada muestra, en donde al menos un identificador aplicado no interfiere con el análisis posterior; y en donde al menos un identificador aplicado es un ácido nucleico que no forma una estructura secundaria estable y comprende al menos un sitio de unión de oligonucleótidos con citosina-libre, o citosina- libre y guanina-libre; poner en contacto el ADN de cada muestra con el bisulfito;
- (c) someter cada muestra a una reacción de detección o cuantificación específica para el (los) sitio(s) de unión de uno o más identificadores aplicados; y
- (d) someter cada muestra al análisis de la metilación, de manera que se detecta o cuantifica la metilación en donde la etapa (c) se lleva a cabo antes, simultáneamente con o posterior a la etapa (d).

45 En aspectos particulares, el método de la invención es un método para identificar al menos una muestra biológica en el campo de análisis de la metilación, en donde el identificador es parte del ADN genómico de la muestra biológica.

50 En aspectos particulares, el método de la invención es un método para identificar al menos una muestra biológica en el campo de análisis de la metilación, en donde el identificador se añade a la muestra biológica.

De acuerdo con una modalidad, el método de la invención es un método para identificar al menos una muestra biológica en el campo del análisis de la metilación, que comprende las dos primeras etapas en el orden indicado:

- 55 proporcionar un conjunto de muestras de al menos dos muestras biológicas, en donde al menos una muestra comprende ADN genómico metilado diferencialmente al menos en una posición;
- aplicar al menos un identificador para cada muestra, en donde al menos un identificador aplicado interfiere con el análisis posterior;
- someter cada muestra a una reacción de detección o cuantificación específica para uno o más identificadores aplicados;
- 60 y
- someter cada muestra al análisis de la metilación

65 En una modalidad preferida, el identificador es un ácido nucleico que es parte de una molécula de ADN endógeno de la muestra, particularmente, una molécula de ADN genómico. En otra modalidad preferida, el identificador es un ácido nucleico que se añade a una muestra. En una modalidad preferida, se detecta o cuantifica el identificador antes del análisis de la metilación del ADN proporcionado. En otra modalidad preferida, se detecta o cuantifica el identificador

posterior al análisis de la metilación del ADN proporcionado. En una modalidad particular preferida, la detección o cuantificación del identificador se lleva a cabo simultáneamente con el análisis de la metilación.

Una modalidad preferida comprende además al menos uno de los siguientes

5 En una modalidad preferida, el identificador se puede detectar o cuantificar en medio o posterior a un procedimiento experimental. Por ejemplo, pero no se limitan a este, un procedimiento experimental de este tipo puede comprender un procedimiento para aislar el ADN genómico, un procedimiento para tratar ADN genómico con un reactivo que diferencia entre el ADN metilado y no metilado, un procedimiento para purificar ADN, y/o un procedimiento para detectar o
10 cuantificar la metilación del ADN. Procedimientos experimentales adecuados son, por ejemplo, pero no se limitan a los descritos en WO 2006/113770 o en WO 2006/039563.

De acuerdo con una modalidad preferida, el identificador al menos en particular es parte de una molécula más grande; parte de una molécula endógena de la muestra respectiva; parte de una molécula exógena añadida a la muestra
15 respectiva; una sección de ADN genómico o ADN genómico total derivado de una planta; una sección de ADN genómico o ADN genómico total derivado de una bacteria; una sección de ADN genómico o ADN genómico total derivado de un no vertebrado; una sección de ADN genómico o ADN genómico total derivado de un vertebrado; una repetición en tándem corta una variante de un polimorfismo de delección; una variante de un polimorfismo de nucleótido simple; una variante de un polimorfismo de longitud; un ácido nucleico artificial; un ácido nucleico circular; un ADN
20 circular; un plásmido; un polinucleótido; un oligonucleótido; un PNA; un PNA-oligómero; un PNA-polímero; una metilación artificial; o combinaciones de estas.

De acuerdo con una modalidad preferida, diferentes identificadores se asignan a diferentes conjuntos de identificadores de acuerdo con sus respectivas propiedades biológicas, químicas o físicas.

25 Una modalidad preferida se caracteriza en que un representante de cada uno de al menos dos conjuntos de identificadores está comprendido en un plásmido. Un plásmido de ese tipo puede ser, por ejemplo, pero no se limitan a, un plásmido como se muestra en la Figura 1. Un plásmido de acuerdo con la Figura 1 comprende una variante de un polimorfismo de secuencia de 8 variantes y una variante de un polimorfismo de longitud de 8 variantes. De ese modo cada variante del polimorfismo de secuencia y cada variante del polimorfismo de la longitud representa un identificador. Además todas las variantes del polimorfismo de secuencia representan un conjunto de identificadores y todas las variantes del polimorfismo de longitud representan el segundo conjunto de identificadores. Esta combinación de diferentes conjuntos de identificadores tiene la ventaja de que diferentes muestras pueden ser identificadas de acuerdo con diferentes métodos. Una simple identificación de las muestras correspondientes es posible, por ejemplo mediante la
30 detección de las diferentes variantes de polimorfismo de longitud por medio de PCR y electroforesis en gel. Para algunas solicitudes, podría ser favorable identificar muestras de acuerdo con las variantes de secuencias polimórficas. Por ejemplo, pero no se limitan a, en caso de que el análisis de la metilación del ADN de la muestra biológica comprenda PCR y detección de los productos de PCR por hibridación. En este caso es fácilmente posible además realizar una amplificación de las diferentes variantes del polimorfismo de secuencia y detectarlos además por hibridación. Preferentemente, el análisis de la metilación y la detección del identificador se realizan simultáneamente. Si se desea además es posible cuantificar el identificador. Esto permite, por ejemplo, pero no se limitan a, inconvenientes en la cantidad de contaminación cruzada de la muestra original.

De acuerdo con una modalidad preferida, el primer conjunto de identificadores comprende un polimorfismo de secuencia y en donde el segundo conjunto de identificadores comprende un polimorfismo de longitud.

De acuerdo con una modalidad preferida, el identificador comprende al menos un sitio de unión de oligonucleótido que abarca las posiciones de citosina convertidas por bisulfito; se caracteriza por una composición de base similar como la del ADN genómico analizado de la muestra proporcionada; es una secuencia polimórfica de aproximadamente 5, aproximadamente 10, aproximadamente 15, aproximadamente 20, aproximadamente 25, aproximadamente 30, aproximadamente 35, aproximadamente 40, aproximadamente 50, aproximadamente 75, aproximadamente 100, o aproximadamente 200 nucleótidos; tiene un contenido de nucleótidos-citosina y nucleótidos-guanosina de aproximadamente 15 %, aproximadamente 20 %, aproximadamente 30 %, aproximadamente 40 %, aproximadamente 50 %, aproximadamente 60 %, aproximadamente 70 %, o aproximadamente 80 %; o combinaciones de éstos.

De acuerdo con una modalidad preferida, el identificador se caracteriza por una composición de base similar a la del ADN genómico analizado de la muestra proporcionada; es una secuencia polimórfica de aproximadamente 5, aproximadamente 10, aproximadamente 15, aproximadamente 20, aproximadamente 25, aproximadamente 30, aproximadamente 35, aproximadamente 40, aproximadamente 50, aproximadamente 75, aproximadamente 100, o
60 aproximadamente 200 nucleótidos; tiene un contenido de nucleótidos-citosina y nucleótidos-guanosina de aproximadamente 15 %, aproximadamente 20 %, aproximadamente 30 %, aproximadamente 40 %, aproximadamente 50 %, aproximadamente 60 %, aproximadamente 70 %, o aproximadamente 80 %; o combinaciones de éstos.

De acuerdo con una modalidad preferida, el identificador es una variante de un polimorfismo de secuencia y, además comprende aproximadamente 1, aproximadamente 10, aproximadamente 20, aproximadamente 30, aproximadamente

40, aproximadamente 50, aproximadamente 60, aproximadamente 70, aproximadamente 80, aproximadamente 90, o aproximadamente 100 sitios de nucleótidos variables.

De acuerdo con una modalidad preferida, el identificador es una variante de un polimorfismo de secuencia y, además comprende aproximadamente 5, aproximadamente 10, aproximadamente 15, aproximadamente 20, o aproximadamente 25 sitios nucleótidos variables; tiene un contenido de nucleótidos-citosina y nucleótidos-guanosina de aproximadamente 20 %, aproximadamente 30 %, aproximadamente 40 %, aproximadamente 50 %, aproximadamente 60 %, aproximadamente 70 %, o aproximadamente 80 %; o combinaciones de éstos.

De acuerdo con una modalidad preferida, el identificador es una variante de un polimorfismo de longitud y, además, tiene una diferencia de longitud de aproximadamente 10, aproximadamente 100, aproximadamente 200, aproximadamente 300, aproximadamente 400, aproximadamente 500, aproximadamente 600, aproximadamente 700, aproximadamente 800, aproximadamente 900, o aproximadamente 1000 nucleótidos en comparación con otros identificadores polimórficos de longitud de ácido nucleico usados; es de aproximadamente 10, aproximadamente 100, aproximadamente 500, aproximadamente 1.000, aproximadamente 1.500, aproximadamente 2.000, aproximadamente 2.500, aproximadamente 3.000, aproximadamente 3.500, aproximadamente 4.000, aproximadamente 4.500, aproximadamente 5.000, aproximadamente 5.500, aproximadamente 6.000, aproximadamente 6.500, aproximadamente 7.000, aproximadamente 7.500, aproximadamente 8.000, aproximadamente 8.500, aproximadamente 9.000, aproximadamente 9.500, o aproximadamente 10.000 nucleótidos de longitud; se deriva de ADN no humano; o combinaciones de éstos.

De acuerdo con una modalidad preferida, el identificador es una variante de un polimorfismo de longitud y, además, es ya sea de aproximadamente 5, aproximadamente 25, aproximadamente 50, aproximadamente 75, aproximadamente 100, aproximadamente 125, aproximadamente 150, aproximadamente 175, aproximadamente 200, aproximadamente 225, aproximadamente 250, aproximadamente 275, aproximadamente 300, aproximadamente 325, aproximadamente 350, aproximadamente 375, aproximadamente 400, aproximadamente 425, aproximadamente 450, aproximadamente 475, o aproximadamente 500 nucleótidos de longitud; se deriva de ADN no humano; tiene un contenido de nucleótidos-citosina y nucleótidos-guanosina de aproximadamente 20 %, aproximadamente 30 %, aproximadamente 40 %, aproximadamente 50 %, aproximadamente 60 %, aproximadamente 70 %, o aproximadamente 80 %; o combinaciones de éstos.

De acuerdo con una modalidad preferida, el identificador comprende una etiqueta seleccionada del grupo que comprende colorante, colorante fluorescente, colorante quimioluminiscente, Cy5, Cy3, TAMRA, FAM, etiqueta, etiqueta de epítipo, péptido, polipéptido, proteína, sacárido, hormona, lípido, marcador de masa, partícula, partícula de oro, partícula de plata, partícula de platino, código embebido en parafina o combinaciones de éstos.

El identificador comprende una región de citosina libre o región citosina libre y guanina libre para la detección de la conversión específica. Una persona con experiencia en la técnica conoce numerosos métodos de detección adecuados, por ejemplo pero no se limitan a métodos de basados en PCR en tiempo real que comprenden el uso de iniciadores de conversión específicos, sondas y/o bloqueadores.

En una modalidad preferida, el identificador se embebe en parafina como un código embebido en parafina. Preferentemente, el identificador se embebe en parafina simultáneamente con la muestra biológica o después del embebimiento de la muestra biológica. Preferentemente, un identificador no embebido se añade a la muestra biológica embebida

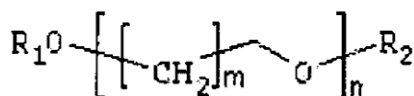
El reactivo que diferencia entre una posición metilada o no metilada es un reactivo de bisulfito, en donde la posición metilada o no metilada es una posición de citosina, o ambas.

En una modalidad preferida, el procedimiento experimental comprende una o más de la siguiente mezcla de la muestra, aislamiento de ADN, mezcla de ADN, concentración de ADN, purificación de ADN, desulfonación, amplificación.

En una modalidad preferida estas etapas se llevan a cabo esencialmente como se describe en WO 2006/113770 o en WO 2006/039563.

De acuerdo con una modalidad preferida, un tratamiento con bisulfito se lleva a cabo esencialmente como se describe en WO05/038051. De acuerdo con esto, en una modalidad el ADN se hace reaccionar con un reactivo de bisulfito, caracterizado porque dicha reacción se lleva a cabo en presencia de un compuesto del grupo de dioxano, uno de sus derivados y un éter cíclico alifático similar.

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



5

10 $n = 1-35000$ $m = 1-3$ $R_1 = \text{H, Me, Et, Pr, Bu}$ $R_2 = \text{H, Me, Et, Pr, Bu}$

15 Se prefieren así compuestos n-alquileo glicol, particularmente sus éteres de dialquilo, y especialmente dietilenglicol dimetil éter (DME).

La conversión de bisulfito puede tener lugar tanto en solución, así como además en el ADN unido a una fase sólida. Preferentemente se usa el disulfito de sodio (= bisulfito de sodio/metabisulfito de sodio), ya que es más soluble en agua que el sulfito de sodio. La sal de disulfito se desproporciona en solución acuosa con los aniones de sulfito de hidrógeno necesarios para la conversión de citosina. Cuando se analiza la concentración de bisulfito más abajo, esto se refiere a la concentración de sulfito de hidrógeno y aniones de sulfito en la solución de reacción. Para el método de acuerdo con la invención, son posibles intervalos de concentración de 0.1 a 6 mol/l. Particularmente se prefiere un intervalo de concentración de 1 a 6 mol/l, y lo más particularmente preferido, 2-4 de mol/l. Sin embargo, cuando se usa el dioxano, la concentración máxima de bisulfito que se puede usar es más pequeña (ver más abajo). Al seleccionar la concentración de bisulfito, se debe considerar que una alta concentración de bisulfito conduce a una alta conversión, pero además conduce a una alta velocidad de descomposición debido al pH más bajo.

El dioxano se puede utilizar en diferentes concentraciones. Preferentemente, las cantidades de concentración de dioxano a 10 a 35 % (vol/vol), particularmente preferido es 20 a 30 %, y lo más particularmente preferido es 22 a 28 %, especialmente 25 %. Una concentración de dioxano mayor que 35 % es problemática, ya que esto resulta en una formación de dos fases dentro de la solución de reacción. En las modalidades particularmente preferidas con una concentración de dioxano de 22-28 %, la concentración de bisulfito preferida final asciende a 3.3 hasta 3.6 mol/l, y en la modalidad más particularmente preferida con una concentración de dioxano de 25 %, que equivale a 3.5 mol/l (ver los Ejemplos).

Los compuestos n-alquileo glicol de acuerdo con la invención se pueden utilizar en un intervalo de concentración diferente. DME se usa preferentemente en concentraciones entre 1-35 % (vol/vol). Existe preferentemente entre 5 y 25 %, y con la máxima preferencia 10 % de DME.

Los limpiadores preferidos utilizados de acuerdo con la invención son derivados de cromano, por ejemplo, ácido 6-hidroxi-2,5,7,8, -tetrametilcromano 2-carboxílico (además conocido como: Trolox-C™) o ácido trihidroxibenzoico y derivados de éstos, por ejemplo, ácido gálico (ver: WO 2005/038051). Otros impidiadores se listan en la solicitud de patente WO 01/98528 (= DE 100 29 915; = solicitud de Estados Unidos 10/311,661).

La conversión de bisulfito se puede conducir en un amplio intervalo de temperatura de 0 a 95 °C. Sin embargo, como a mayores temperaturas las velocidades tanto de la conversión como la descomposición del ADN aumenta, en una modalidad preferida la temperatura de reacción se encuentra entre 0-80 °C, preferentemente entre 30-80 °C. Particularmente preferido es un intervalo entre el 50-70 °C; más particularmente preferido entre 57-65 °C.

El tiempo de reacción óptimo del tratamiento con bisulfito depende de la temperatura de reacción. El tiempo de reacción asciende normalmente a entre 1 y 18 horas (ver: Grunau y otros 2001, Nucleic Acids Res. 2001, 29(13), E65-5).

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

En una modalidad particularmente preferida del método de acuerdo con la invención, la conversión de bisulfito se conduce a temperaturas de reacción suaves, en donde la temperatura de reacción se aumenta claramente después por un corto tiempo al menos una vez durante el curso de la conversión. De esta manera, la eficacia de la conversión de bisulfito se puede aumentar claramente de forma sorprendente. Los aumentos de temperatura de corta duración se denominan más abajo "picos de temperatura". La temperatura de reacción "estándar" fuera de los picos de temperatura se denota como la temperatura de reacción básica. Las temperatura de reacción básica aumenta a entre 0 y 80 °C, preferentemente entre 30-80 °C, con mayor preferencia entre 50-70 °C, con la máxima preferencia entre 57-65 °C, como se describió anteriormente.

La temperatura de reacción durante un pico de temperatura se aumenta a más de 85 °C por al menos un picos de temperatura. El número óptimo de los picos de temperatura es una función de la temperatura de reacción básica.

- 5 Cuanto mayor es el número óptimo de picos de temperatura, menor es la temperatura de reacción básica. Al menos un pico de temperatura es necesario en cada caso. Y, por otro lado, en principio, cualquier número de picos de temperatura es concebible. Por supuesto, debe considerarse que con un gran número de aumentos de la temperatura, la velocidad de descomposición del ADN además aumenta, y una conversión óptima ya no está garantizada. El número preferido de picos de temperatura es así entre 1 y 10 picos de temperatura cada vez, dependiendo de la temperatura de reacción básica. Así, es especialmente preferido un número de dos a 5 picos de temperatura. Los picos de temperatura aumentan la temperatura de reacción preferentemente a 85 hasta 100 °C, en particular preferentemente a 90-100 °C, y con la máxima preferencia a 94 °C-100 °C.
- 10 La duración en el tiempo de los picos de temperatura depende además del volumen del lote de reacción. Se debe asegurar que la temperatura se aumenta uniformemente a través de la solución de reacción total. Para un lote de reacción de 20 µl al usar un termociclador se prefiere una duración entre 15 segundos y 1.5 minutos, especialmente una duración entre 20 y 50 segundos. En una modalidad preferida particular, la duración es de 30 segundos. Operando en un volumen de 100 µl el intervalo preferido se encuentra entre 30 segundos y 5 minutos, especialmente entre 1 y 3 minutos. Particularmente preferidos son 1.5-3 minutos. Para un volumen de 600 µl, una duración de 1 a 6 minutos, se prefiere, especialmente entre 2 y 4 minutos. Particularmente preferido es una duración de 3 minutos. Una persona con experiencia en la técnica será fácilmente capaz de determinar las duraciones adecuadas de los picos de temperatura en relación con una variedad de volúmenes de reacción. El uso descrito anteriormente de los picos de temperatura conduce a unas velocidades de conversión significativamente mejores en la reacción de conversión de bisulfito, aun cuando no se utilizan los disolventes desnaturalizantes anteriormente descritos.
- 15 De acuerdo con una modalidad preferida, el método de la invención es un método, en donde el ADN tratado con bisulfito se somete directamente a los métodos en el campo de análisis de la metilación. Esto es especialmente preferido en vista de evitar contaminaciones cruzadas en los métodos basados en PCR. Esta modalidad se lleva a cabo básicamente como se describe en US 2006/115835. De acuerdo con esto, se proporciona ADN descontaminado que es adecuado para el análisis de la metilación del ADN. Esta modalidad se caracteriza en que el ADN se incuba con un reactivo de bisulfito que comprende la solución como se describió anteriormente. Esto conduce a una sulfonación, una desaminación, o ambos de la citosina no metilada. La desaminación es un proceso espontáneo en una solución acuosa y conduce a ADN que comprende uracilo sulfonado. Ninguna desulfonación ocurre todavía.
- 20 En una etapa separada, el ADN que comprende uracilo sulfonado se pone en contacto e incuba con una enzima que degrada específicamente ácidos nucleicos que contienen uracilo no sulfonado. Una enzima de ese tipo es, por ejemplo Uracil-ADN-glicosilasa (UNG).
- 25 En una modalidad preferida para proporcionar un ADN molde descontaminado para reacciones de amplificación basadas en la polimerasa el, ADN molde sulfonado y/o desaminado se mezclan con una actividad UNG y componentes requeridos para una reacción de amplificación mediada por polimerasa o un ensayo de detección basado en la amplificación. Después de la degradación de ácidos nucleicos que contiene uracilo no sulfonado por el uso de UNG, la actividad de UNG se termina y el molde de ADN se desulfona por el aumento de la temperatura. Posteriormente, el ADN molde está listo para ser amplificado.
- 30 En una modalidad preferida, la degradación, terminación, desulfonación y amplificación ocurre en un solo tubo durante una reacción de amplificación basada en la polimerasa y/o un ensayo basado en la amplificación. Preferentemente, una amplificación de ese tipo se realiza en presencia de dUTP en lugar de dTTP.
- 35 En una modalidad preferida, el ADN sulfonado y parcialmente o completamente desaminado después del tratamiento con bisulfito se somete directamente a una reacción de amplificación basada en la polimerasa y/o un ensayo basado en la amplificación sin ningún tipo de desulfonación anterior. La desulfonación ocurre durante el aumento de la temperatura inicial de la reacción de amplificación.
- 40 Estas modalidades particulares tienen la ventaja en comparación con los métodos conocidos de tratamiento con bisulfito de que la etapa de purificación después del tratamiento con bisulfito se convierte en prescindible. Esta es una simplificación que resulta en la reducción de costos y esfuerzo de manipulación, minimiza la pérdida de ADN tratado con bisulfito y es además ahorro de tiempo.
- 45 En una modalidad, el método de la invención es un método, en donde tratar el ADN con un reactivo de bisulfito que permite la diferenciación del estado de metilación comprende purificar el ADN tratado.
- 50 De acuerdo con una modalidad, el tratamiento que conduce a una conversión de citosina no metilada en uracilo mientras que las citosinas metiladas permanecen inalteradas comprende la purificación del ADN tratado con bisulfito. De acuerdo con una modalidad, una purificación de ese tipo comprende una desulfonación del ADN tratado con bisulfito poniendo en contacto el mencionado con un reactivo o solución alcalina, por ejemplo, pero no se limitan a una solución alcalina de aproximadamente 0.1 mol/l de hidróxido de sodio.
- 55 En una modalidad preferida, purificar el ADN tratado comprende el uso de al menos uno seleccionado del grupo que comprende: ultrafiltración, dispositivo de filtro Microcon, dispositivo de filtro, etanol, propanol, superficie de sílice,
- 60
- 65

membrana de sílice, partícula magnética, partícula de poliestireno, superficie cargada positivamente y membrana cargada positivamente, membrana cargada, superficie cargada, membrana con interruptor cargada, superficie cambiada cargada.

5 En una modalidad preferida particular, la reacción de detección o cuantificación comprende el uso de al menos uno de los siguientes métodos o combinaciones de estos: método de amplificación, método de PCR, método de amplificación isotérmica, método NASBA, método LCR, método de amplificación específica de la metilación, método MSP (PCR específica de metilación), método de MSP anidada, método HeavyMethyl™, método de detección, gel de agarosa, tinción de un gel de agarosa, método de detección específica de metilación, método de secuenciación por bisulfito, 10 detección por medio de matrices de ADN, detección por medio de microarreglos de oligonucleótidos, detección por medio de microarreglos de islas de CpG, detección por medio de enzimas de restricción, método de amplificación específica de la metilación y detección simultánea, método COBRA, PCR en tiempo real, método de PCR en tiempo real HeavyMethyl™, método MSP MethyLight™, método MethyLight™, método MethyLight™ Algo™, método de QM, método Headloop MethyLight™, método HeavyMethyl™ MethyLight™, método HeavyMethyl™ Scorpion™, método MSP Scorpion™, método Headloop Scorpion™, extensión con iniciador sensible a la metilación y método Ms-SNuPE (Extensión del Iniciador de Nucleótido Simple Sensible a la Metilación).

De acuerdo con una modalidad, el método de amplificación puede ser cualquier tipo de método de amplificación. Una persona con experiencia en la técnica está en conocimiento de los 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. Los métodos de amplificación adecuados para el uso de acuerdo con la invención son bien conocidos en la técnica. Un método de este tipo puede ser, por ejemplo pero no se limitan a este Método de Extensión del Iniciador. De acuerdo con una modalidad preferida, el método de amplificación es un método NASBA. Los métodos NASBA son métodos de amplificación basados en ARN-ADN que comprenden el uso de una Transcripsa Inversa, una ARN polimerasa y un Ribonucleasa. Una persona con experiencia en la técnica es consciente 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 adecuado que se puede usar de acuerdo con la invención.

De acuerdo con una modalidad, el método de amplificación es una amplificación específica de la metilación. Los métodos adecuados de amplificación específicos de la metilación son conocidos por aquellos con experiencia en la técnica. De acuerdo con una modalidad preferida, el método de amplificación específico de la metilación es el método PCR específica de metilación (MSP). El método MSP permite evaluar virtualmente la condición de metilación de cualquier grupo de sitios CpG dentro de una isla de CpG, independiente del uso de enzimas de restricción sensibles a la metilación (Herman y otros Proc. Natl. Acad. Sci. USA 93:9821-9826, 1996; patente de Estados Unidos núm. 5,786,146). En resumen, el ADN se modifica por bisulfito sódico convirtiendo todas las citosinas no metiladas, pero no las metiladas en uracilo, y posteriormente se amplifica con iniciadores específicos para ADN metilado frente al no metilado. Pares de iniciadores MSP contienen al menos un iniciador que se hibrida a un dinucleótido CpG tratado 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. MSP requiere solamente pequeñas cantidades de ADN y es sensible a 0.1 % de alelos metilados de un locus de isla de CpG dada. Los tratamientos con bisulfito y el método de amplificación descrito en la presente descripción se pueden usar en conjunto con este método de detección.

50 De acuerdo con una modalidad preferida, la amplificación es un método MSP anidada. El método MSP anidada se lleva a cabo prácticamente como se describe en WO 02/18649 y US 20040038245. Este método MSP considera el aparente conflicto de requerir alta especificidad del iniciador MSP para diferenciar suficientemente entre las posiciones CG y TG y de permitir un desajuste para crear un sitio de restricción único.

55 Comprende la expansión del número de copias de la región genética de interés. Por lo tanto una reacción en cadena de la polimerasa se usa para amplificar una porción de dicha región en donde reside la metilación de interés. Así se genera un producto de amplificación. Una alícuota de dicho producto se usa después en una segunda reacción en cadena de la polimerasa de metilación específica para detectar la presencia de metilación. En otras palabras se realiza un PCR no específica de metilación antes de la PCR específica de metilación.

60 De acuerdo con una modalidad preferida, el método de amplificación es un método HeavyMethyl™. El método HeavyMethyl™ se lleva a cabo prácticamente como se describe en WO 02/072880 y Cottrell SE y otros Nucleic Acids Res. 13 enero 2004;32(1):e10. Este método comprende el uso de oligonucleótidos de sonda de bloqueo que pueden hibridarse con el ácido nucleico molde tratado con bisulfito concurrentemente con los iniciadores de PCR. Preferentemente, los oligonucleótidos de bloqueo se caracterizan porque su secuencia de base comprende una secuencia que tiene una longitud de al menos 9 nucleótidos que se hibrida 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 está 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 tratado con bisulfito de manera específica a la condición de metilación. Por ejemplo, los ácidos nucleicos metilados dentro de una población de ácidos nucleicos no metilados se pueden detectar mediante la supresión de la amplificación de ácidos nucleicos que están no metilados en una posición en cuestión. Por lo tanto una sonda de bloqueo comprendería un "CpA" o "TpA" en la posición en cuestión, en oposición a un "CpG" si se desea la supresión de la amplificación de ácidos nucleicos metilados. El uso de oligonucleótidos bloqueadores se requiere para una interrupción eficiente de la amplificación mediada por polimerasa de tal manera los oligonucleótidos bloqueadores no pueden ser alargados por la polimerasa. De acuerdo con el método HeavyMethyl™, esto se logra a través del uso de los bloqueadores que son 3' desoxioligonucleótidos, u oligonucleótidos derivatizados en la posición 3' con un grupo hidroxilo "libre" distinto. Por ejemplo, pero no se limitan a este, 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 o i) el uso de una polimerasa que carece de actividad exonucleasa 5'-3', o ii) el uso de oligonucleótidos bloqueadores modificados. Estos oligonucleótidos bloqueadores modificados se caracterizan por tener, por ejemplo, puentes tiolato en el 5'-terminal. Esto hace la molécula bloqueadora resistente a nucleasa. Las aplicaciones particulares pueden no requerir tales modificaciones en 5' del oligonucleótido bloqueador. Por ejemplo, la degradación del oligonucleótido bloqueador se excluirá sustancialmente si se superponen los sitios de unión bloqueador e iniciador. De ese modo la unión del iniciador se excluye (por ejemplo, en caso de exceso de oligonucleótido bloqueador). Por lo tanto la polimerasa no puede unirse en el iniciador y lo alarga. Porque ninguna polimerasa está extendiendo el iniciador, el oligonucleótido de bloqueo 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 degradados ni extendidos por la polimerasa.

De acuerdo con una modalidad, el método de detección puede ser cualquier tipo de método de detección. Una persona con experiencia en la técnica está en conocimiento de los 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, una etiqueta de masa, una separación por tamaño, o una separación por peso. Por ejemplo, pero no se limitan a este, el método de detección es una separación por tamaño en un gel de agarosa seguido por una tinción de DNA por medio de un colorante fluorescente. De acuerdo con una modalidad preferida, el método de detección es una detección específica de la metilación. Una persona con experiencia en la técnica conoce los métodos adecuados de detección específica de la metilación. De acuerdo con una modalidad preferida, el método de detección de la metilación específica es un método de secuenciación por bisulfito. El método de secuenciación por bisulfito se lleva a cabo prácticamente como se describe en Frommer y otros Proc. Natl. Acad. Sci. Estados Unidos 89:1827-1831, 1992. El método de secuenciación por bisulfito es un método en donde es llevado a cabo la secuenciación de un fragmento previamente amplificado del ADN genómico tratado con bisulfito. Como se amplifica el ADN tratado con bisulfito antes de la secuenciación, un método de amplificación como se describe en la presente descripción pueden usarse en conjunto con este método de detección. Se prefiere especialmente además que los resultados de una secuenciación por bisulfito se analicen prácticamente como se describe en EP 1369493. En resumen, 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 se deduce después por comparación de este valor para una posición de citosina que se analiza con el valor obtenido para una citosina no metilada. Para obtener mejores resultados, la determinación y la consideración de la velocidad de conversión de citosina en uracilo del tratamiento con bisulfito y/o una normalización de señales electroferograma es favorable.

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 una gran cantidad de matrices de ADN. Preferentemente, una matriz de ADN comprende moléculas de ADN que se unen a eso, o de lo contrario se asocia a una fase sólida. La matriz se puede caracterizar, por ejemplo, pero no se limitan a esta, en que las moléculas de ADN se disponen en la fase sólida en forma de una red rectangular o hexagonal. De este modo la fase sólida es al menos una fase seleccionada del grupo que comprende: silicio, vidrio, poliestireno, aluminio, acero, hierro, cobre, níquel, plata, oro, nitrocelulosa, o plásticos tales como, pero no se limitan a este nylon. Pero además las combinaciones de dichos materiales son imaginables. Para la detección, el ADN hibridado en la matriz se marca, preferentemente con un colorante fluorescente. Este marcaje es, por ejemplo, pero no se limitan a este, la simple fijación de colorantes Cy3 y Cy5 a 5'-OH del fragmento de ADN. La detección de la fluorescencia del ADN hibridado puede llevarse a cabo, por ejemplo, pero no se limitan a esta, 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 oligonucleótidos. 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).

5 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 inmovilizado o asociado de la matriz comprende secuencias que se derivan de las islas de CpG.

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

15 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 está en conocimiento de los métodos de detección adecuados.

20 De acuerdo con una modalidad preferida, la amplificación específica de la metilación y la detección se llevan a cabo simultáneamente. Los métodos adecuados se conocen por los expertos en la técnica. De acuerdo con una modalidad particular preferida, el método para la amplificación y detección específica de la metilación simultánea 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; esta referencia se incorpora como referencia en su totalidad). De acuerdo con 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 sódico. Las diferencias de secuencia dependiente de metilación se introducen primero en el ADN genómico por tratamiento con bisulfito. La amplificación por PCR del ADN convertido con bisulfito se realiza después usando iniciadores no específicos de metilación seguido de la digestión con endonucleasas de restricción, electroforesis en gel y detección usando 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. Adicionalmente, se usa la digestión con enzimas de restricción de los productos de PCR amplificados a partir del ADN convertido con bisulfito, en el método descrito por Sadri & Homsby (Nucl. Acids Res. 24:5058-5059, 1996). Los tratamientos con bisulfito y métodos de amplificación descritos en la presente descripción se pueden usar en conjunto con este método de detección.

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

30 De acuerdo con 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 de 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, en 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.

35 El método MethyLight™ puede usarse como una prueba cuantitativa de 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 se proporciona para 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 PCR sesgada, ya sea con oligonucleótidos de control que no "cubren" los sitios de metilación conocido (una versión basada en fluorescencia de la técnica de "MSP", además llamada método MSP MethyLight™), o con oligonucleótidos que cubren los posibles sitios de metilación.

40 El proceso MethyLight™ se puede usar 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 los dos conjuntos de reacciones de PCR usando 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 GC de contenido 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 el PCR, eventualmente se logrará 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.

5 Variaciones sobre la tecnología de detección TaqMan® que además son adecuadas incluyen el uso de la tecnología de doble sonda (LightCycler™), iniciadores de amplificación fluorescentes (tecnología Sunrise™), sondas moleculares Beacon (Tyagi S., y Kramer F.R., Nature Biotechnology 14, 303-308, 1996), iniciadores Scorpion (Whitcombe y otros, Nature and Biotechnology, 17, 804-807, 1999), o LNA (ácido nucleico Locked) sondas de oligonucleótidos de doble-colorante (Exiqon A/S). Todas estas técnicas se pueden adaptar de una manera adecuada para el uso con el ADN
10 tratado con bisulfito, y además en el campo de análisis de la metilación dentro de dinucleótidos CpG.

Los tratamientos con bisulfito y métodos de amplificación descritos en la presente descripción pueden usarse en conjunto con el método MethyLight™ o sus variantes.

15 De acuerdo con una modalidad preferida particular, el método PCR en tiempo real es el método MethyLight™ ALGO™. El método MethyLight™ ALGO™ es un método mejorado del método MethyLight™ prácticamente como se describe en EP04090255.3. De acuerdo con este método mejorado, el grado de metilación se calcula a partir de las intensidades de la señal de las sondas usando diferentes algoritmos.

20 De acuerdo con una modalidad preferida particular, el método de PCR en tiempo real es el ensayo QM (metilación cuantitativa). Este ensayo es una metilación inespecífica y por lo tanto amplificación por PCR en tiempo real no sesgado. Se acompaña por el uso de dos sondas de metilación específicas (MethyLight™) una para el amplificado metilado y una segunda para el amplificado no metilado. De esta manera, se generan dos señales que se pueden usar
25 a) para determinar la relación de ácidos nucleicos metilados (CG) con no metilados (TG), y al mismo tiempo b) para determinar la cantidad absoluta de ácidos nucleicos metilados. Para más tarde, una calibración del ensayo es necesario con una cantidad conocida de ADN de control.

De acuerdo con la modalidad preferida, el método para la amplificación específica de la metilación y la detección simultánea es un método Headloop PCR. El método Headloop PCR es un método de PCR de supresión. Prácticamente
30 se lleva a cabo como se describe en Rand K.N., y otros, Nucleic Acid Research, 33(14), e127. Es un método PCR para distinguir secuencias relacionadas en la 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 (n) con secuencias dentro de uno de los amplicones relacionados. Después de copiarse y la incorporación en el amplificado esta secuencia es capaz después de enrollarse de nuevo, hibridarse con las secuencias internas y prepararse para formar una estructura de horquilla. Esta
35 estructura impide después la amplificación adicional. Así, la amplificación de secuencias que contienen un ajuste perfecto con la extensión 5' se suprime, mientras que no se afecta la amplificación de secuencias que contienen desajustes o carencias de la secuencia.

40 De acuerdo con una modalidad particular preferida, el método para la amplificación específica de la metilación y la detección simultánea es una combinación del método Headloop PCR y el método MethyLight™, llamado además método Headloop MethyLight™.

De acuerdo con la modalidad preferida, el método para la amplificación específica de la metilación y la detección simultánea es un método Scorpion™. Este método se describió primero por Whitcombe y otros: Detection of PCR
45 products using self-probing amplicons and fluorescence. Nat Biotechnol. 1999; 17(8):804-7; Thelwell y otros: Mode of action and application of Scorpion™ primers to mutation detection. 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 son conocidos por aquellos con experiencia en la técnica. Todos estos métodos tienen en común el sondeo intramolecular. De acuerdo con la llamada variante bucle en horquilla, los iniciadores Scorpion™ poseen una secuencia de sonda específica en su extremo 5'. Esta
50 secuencia está presente en una configuración de tipo bucle en horquilla. Un colorante fluorescente y un inactivador se encuentran en la proximidad espacial al final de la secuencia de sondeo. Después de la desnaturalización posterior a un ciclo de amplificación, la sonda se hibrida intramolecularmente sobre la secuencia del iniciador alargado de la misma cadena. De ese modo el bucle en horquilla se abre, el colorante y el inactivador de la fluorescencia se separan y así se puede detectar la señal del colorante.

55 Otras variantes del método Scorpion™ son por ejemplo la variante Duplex (Solinas y otros: Duplex Scorpion™ primers in SNP analysis and FRET applications. Nucleic Acids Res. 2001 Oct 15; 29(20):E96), o las variantes descritas en US 6,326,145 y US 20030087240.

60 De acuerdo con una modalidad preferida particular, el método Scorpion™ es un método prácticamente como se describe en WO 05/024056.

De acuerdo con una modalidad preferida particular, el método para la amplificación específica de la metilación y la
65 detección simultánea es una combinación del método HeavyMethyl™ y el método Scorpion™, además llamado método HeavyMethyl™ Scorpion™.

De acuerdo con una modalidad preferida particular, el método para la amplificación específica de la metilación y la detección simultánea es una combinación del método HeavyMethyl™ y el método MethyLight™, además llamado método HeavyMethyl™MethyLight™.

5

De acuerdo con una modalidad preferida particular, el método para la amplificación específica de la metilación y la detección simultánea es una combinación del método MSP y el método Scorpion™, además llamado método MSP Scorpion™.

10

De acuerdo con una modalidad preferida particular, el método para la amplificación específica de la metilación y la detección simultánea es una combinación del método Headloop y el método Scorpion™, además llamado método Headloop Scorpion™.

15

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

20

De acuerdo con una modalidad preferida particular, el método de extensión del iniciador específico de metilación es el método Ms-SNuPE (Extensión del Iniciador de Nucleótido Simple Sensible a la Metilación). El método Ms-SNuPE es un método que se lleva a cabo prácticamente como se describe en Gonzalzo y otros, Nucleic Acids Research 25(12), 2529-2531, 1997 y Patente de Estados Unidos 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 inmediatamente frente a la posición que se analiza. El iniciador se alarga después por un nucleótido simple, ya sea con dCTP marcado o con dTTP marcado de manera diferente. En el caso que se metiló la citosina en el ADN original, el dCTP se incorporará después porque las citosinas metiladas permanecen inalteradas durante el tratamiento con bisulfito. En el otro caso que, no se metiló la citosina en el ADN original, después dTTP se incorporará porque la citosina no metilada se convierte en uracilo mediante tratamiento con bisulfito y el PCR posterior sustituirá el uracilo por timina. Mediante la detección de las diferentes etiquetas, se puede distinguir si se metiló o no metiló una citosina de una posición CpG. El método MS-SNuPE además se puede realizar de una manera cuantitativa.

25

30

De acuerdo con una modalidad preferida particular, el método de extensión del iniciador específico de metilación es un método prácticamente como se describe en WO 01/062960, WO 01/062064, o WO 01/62961. Todos estos métodos se pueden realizar de una manera cuantitativa. De acuerdo con WO 01/062960, el iniciador que se extiende hibrida con su extremo 3' completo o sólo parcialmente en las posiciones de interés. Una extensión de al menos un nucleótido ocurre sólo si el iniciador hibrida completamente. WO 01/062064 describe un método en el que el iniciador que se extiende hibrida inmediatamente adyacente o a una distancia de hasta diez bases en la posición que se analiza. El iniciador se extiende después por al menos un nucleótido simple. El tercer método se describe en WO 01/62961. De acuerdo con este método, dos conjuntos de oligonucleótidos se hibridan con el ADN amplificado después del tratamiento con bisulfito. El primer tipo de oligonucleótido hibrida 5' inmediatamente adyacente o a una distancia de hasta 10 bases con la posición que se analiza. El segundo tipo de oligonucleótido se hibrida en el ADN amplificado de modo que su terminal 5' se hibrida 3' inmediatamente adyacente a dicha posición que se analiza. A través de esto, los dos oligonucleótidos se separan unos de otros por una interrupción en el intervalo de 1 a 10 nucleótidos. El primer tipo de oligonucleótido se extiende después por medio de una polimerasa, en donde se añaden no más que el número de nucleótidos que se encuentran entre los dos oligonucleótidos. Se usan de ese modo los nucleótidos que comprenden dCTP y/o dTTP marcados diferencialmente. Los dos oligonucleótidos se enlazan después entre sí por medio de una enzima ligasa. En el caso que se metiló la citosina en el ADN original, se incorporará después dCTP. En el caso que no se metiló la citosina en el ADN original se incorporará después el dTTP.

40

45

50

Por supuesto otros métodos similares, que son métodos más desarrollados de los llamados métodos o combinaciones de estos son usables además de acuerdo con la invención.

55

En una modalidad preferida la reacción de detección o cuantificación comprende un ácido nucleico, ADN, PNA, oligonucleótido, u oligómero de PNA que es al menos de aproximadamente 10, aproximadamente 15, aproximadamente 20, aproximadamente 25, aproximadamente 30, aproximadamente 35, aproximadamente 40, aproximadamente 50, aproximadamente 60, aproximadamente 70, aproximadamente 80, aproximadamente 90, aproximadamente 100, aproximadamente 150 o aproximadamente 200 nucleótidos de longitud,

60

tiene un contenido de nucleótidos-citosina y nucleótidos-guanosina de aproximadamente 15 %, aproximadamente 20 %, aproximadamente 30 %, aproximadamente 40 %, aproximadamente 50 %, aproximadamente 60 %, aproximadamente 70 %, aproximadamente 80 %, o aproximadamente 85 %;

65

tiene una temperatura de fusión de aproximadamente 37 °C, aproximadamente 45 °C, aproximadamente 50 °C, aproximadamente 55 °C, aproximadamente 60 °C, aproximadamente 65 °C, aproximadamente 70 °C, aproximadamente 75 °C, aproximadamente 80 °C, aproximadamente 85 °C, aproximadamente 90 °C, aproximadamente 95 °C, o aproximadamente 99 °C; o combinaciones de estos.

5 En una modalidad preferida la reacción de detección o cuantificación comprende un oligonucleótido que tiene al menos de aproximadamente 5, aproximadamente 10, aproximadamente 15, aproximadamente 20, aproximadamente 25, aproximadamente 30, aproximadamente 35, aproximadamente 40, aproximadamente 50, aproximadamente 60, aproximadamente 70, aproximadamente 80, o aproximadamente 90 nucleótidos de longitud; tiene un contenido de nucleótidos-citosina y nucleótidos-guanosina de aproximadamente 5 %, de aproximadamente 10 %, aproximadamente 20 %, aproximadamente 30 %, aproximadamente 40 %, aproximadamente 50 %, aproximadamente 60 %, aproximadamente 70 %, aproximadamente 80 %, aproximadamente 90 % o aproximadamente 95 %; tiene una temperatura de fusión de aproximadamente 37 °C, aproximadamente 45 °C, aproximadamente 50 °C, aproximadamente 55 °C, aproximadamente 60 °C, aproximadamente 65 °C, aproximadamente 70 °C, aproximadamente 75 °C, aproximadamente 80 °C, aproximadamente 85 °C, aproximadamente 90 °C, aproximadamente 95 °C, o aproximadamente 99 °C; o combinaciones de estos.

15 En una modalidad preferida la reacción de detección o cuantificación comprende un oligonucleótido que tiene al menos de aproximadamente 16, aproximadamente 20, aproximadamente 25, aproximadamente 30, aproximadamente 35, o aproximadamente 40 nucleótidos de longitud; tiene un contenido de nucleótidos-citosina y nucleótidos-guanosina de aproximadamente 20 %, aproximadamente 30 %, aproximadamente 40 %, aproximadamente 50 %, aproximadamente 60 %, aproximadamente 70 %, o aproximadamente 80 %; y tiene una temperatura de fusión de aproximadamente 50 °C, aproximadamente 53 °C, aproximadamente 56 °C, aproximadamente 59 °C, o aproximadamente 62 °C.

20 En una modalidad preferida la reacción de detección o cuantificación comprende un oligonucleótido que comprende una secuencia iniciadora específica de genes y una secuencia que hibrida en una variante de un polimorfismo de secuencia.

25 En una modalidad preferida la reacción de detección o cuantificación comprende un oligonucleótido que comprende dos dominios, en donde un dominio comprende una secuencia iniciadora objetivo específica de aproximadamente 10, aproximadamente 15, aproximadamente 20, aproximadamente 25, aproximadamente 30, aproximadamente 35, o aproximadamente 40 nucleótidos, tiene un contenido de nucleótidos-citosina y nucleótidos-guanosina de aproximadamente 20 %, aproximadamente 30 %, aproximadamente 40 %, aproximadamente 50 %, aproximadamente 60 %, aproximadamente 70 %, o aproximadamente 80 %, y tiene una temperatura de fusión del dominio de aproximadamente 50 °C, aproximadamente 52 °C, aproximadamente 54 °C, aproximadamente 56 °C, aproximadamente 58 °C, aproximadamente 60 °C, o aproximadamente 62 °C; y en la presente descripción el otro dominio comprende una secuencia única de aproximadamente 5, aproximadamente 10, aproximadamente 15, aproximadamente 20, aproximadamente 25, aproximadamente 30, aproximadamente 35, aproximadamente 40, aproximadamente 45, o aproximadamente 50 nucleótidos, está libre de citosinas, guanina, o ambos, y tiene un contenido de nucleótidos-citosina y nucleótidos-guanosina de aproximadamente 20 %, aproximadamente 30 %, aproximadamente 40 %, aproximadamente 50 %, aproximadamente 60 %, aproximadamente 70 %, o aproximadamente 80 %.

40 La reacción de detección o cuantificación puede comprender un oligonucleótido que comprende una secuencia iniciadora específica al gen y una secuencia que se hibrida con una variante de un polimorfismo de secuencia. De acuerdo con una modalidad preferida, la secuencia iniciadora específica al gen se encuentra en la región 5' terminal y la secuencia de hibridación en la variante del polimorfismo de secuencia se encuentra en la región 3' terminal de dicho oligonucleótido. De acuerdo con una modalidad particular preferida, la secuencia de hibridación en la variante del polimorfismo de secuencia se encuentra en la región 5' terminal y la secuencia iniciadora específica al gen se encuentra en la región 3' terminal de dicho oligonucleótido.

45 La reacción de detección o cuantificación puede comprender un oligonucleótido que comprende dos dominios, en donde un dominio comprende una secuencia iniciadora específica al objetivo de aproximadamente 10, aproximadamente 15, aproximadamente 20, aproximadamente 25, aproximadamente 30, aproximadamente 35, o aproximadamente 40 nucleótidos, tiene un contenido de nucleótidos-citosina y nucleótidos-guanosina de aproximadamente 20 %, aproximadamente 30 %, aproximadamente 40 %, aproximadamente 50 %, aproximadamente 60 %, aproximadamente 70 %, o aproximadamente 80 %, y tiene una temperatura de fusión del dominio de aproximadamente 50 °C, aproximadamente 52 °C, aproximadamente 54 °C, aproximadamente 56 °C, aproximadamente 58 °C, aproximadamente 60 °C, o aproximadamente 62 °C; y

50 en donde el otro dominio comprende una secuencia única de aproximadamente 5, aproximadamente 10, aproximadamente 15, aproximadamente 20, aproximadamente 25, aproximadamente 30, aproximadamente 35, aproximadamente 40, aproximadamente 45, o aproximadamente 50 nucleótidos, y tiene un contenido de nucleótidos-citosina y nucleótidos-guanosina de aproximadamente 20 %, aproximadamente 30 %, aproximadamente 40 %, aproximadamente 50 %, aproximadamente 60 %, aproximadamente 70 %, o aproximadamente 80 %.

60 De acuerdo con las modalidades especificadas de la presente descripción para la detección o cuantificación, un dicho oligonucleótido es un oligonucleótido de ADN o comprende al menos en partes análogas de ADN como PNA (ácido nucleico peptídico),

65 En una modalidad preferida, el análisis de la metilación comprende al menos uno seleccionado del grupo que comprende la detección de la condición de metilación, detección del nivel de metilación, detección del patrón de metilación, detección de nivel del patrón de metilación, método de amplificación, método de PCR, método de

amplificación isotérmico, método NASBA, método LCR, método de amplificación específica de la metilación, método MSP (PCR específica de metilación), método MSP anidada, método HeavyMethyl™, método de detección, método de detección específica de metilación, método de secuenciación por bisulfito, detección por medio de matrices de ADN, detección por medio de microarreglos de oligonucleótidos, detección por medio de microarreglos de islas CpG, detección por medio de enzimas de restricción, método de amplificación específica de la metilación y detección simultánea, método COBRA, PCR en tiempo real, método de PCR en tiempo real HeavyMethyl™, método MSP MethyLight™, método MethyLight™, método MethyLight™ Algo™, método de QM, método Headloop MethyLight™, método HeavyMethyl™ MethyLight™, método HeavyMethyl™ Scorpion™, método MSP Scorpion™, método Headloop Scorpion™, extensión con iniciador sensible a la metilación y método Ms-SNuPE (Extensión del Iniciador de un Nucleótido Simple Sensible a la Metilación).

De acuerdo con una modalidad, la determinación de una condición de metilación de al menos una posición CpG, la determinación de al menos un patrón de metilación, o ambos comprende el uso de al menos una vez de los siguientes métodos o combinaciones de estos: método de amplificación, método de amplificación isotérmica, método NASBA, método LCR, método de amplificación específica de la metilación, método MSP (PCR específica de metilación), método MSP anidada, método HeavyMethyl™, método de detección, gel de agarosa, tinción de un gel de agarosa, método de detección específica de metilación, método de secuenciación por bisulfito, detección por medio de matriz de ADN, detección mediante microarreglos de oligonucleótidos, detección por medio de microarreglos de islas CpG, detección por medio de enzimas de restricción, amplificación específica de la metilación y método de detección simultánea, método COBRA, PCR en tiempo real, método de PCR en tiempo real HeavyMethyl™, método MSP MethyLight™, método MethyLight™, método MethyLight™ Algo™, método QM, método Headloop MethyLight™, método HeavyMethyl™ MethyLight™, método HeavyMethyl™ Scorpion™, método MSP Scorpion™, método Headloop método Scorpion™, extensión del iniciador sensible a la metilación, y Ms-SNuPE (Extensión del Iniciador de un Nucleótido Simple Sensible a la Metilación). Una persona con experiencia en la técnica conoce cómo realizar dichos métodos. Preferentemente, tales métodos se realizan como se describió anteriormente.

De acuerdo con una modalidad preferida particular, el método de la invención es un método de detección de intercambio de la muestra, contaminación cruzada, o ambos en el campo de análisis de la metilación, que comprende las dos primeras etapas en el orden indicado:
 proporcionar un conjunto de muestras de al menos dos muestras biológicas, en donde al menos una muestra comprende ADN genómico metilado diferencialmente al menos en una posición, aplicar al menos un identificador para cada muestra, someter cada muestra con al menos un identificador para una reacción de detección o cuantificación que es específica para al menos un identificador, y deducir la presencia o ausencia de un intercambio de la muestra, de una contaminación cruzada, o ambos a partir de la presencia o ausencia de al menos un identificador en una sola muestra.

En una modalidad preferida particular, la etapa de deducir la presencia o ausencia de un intercambio de la muestra, de una contaminación cruzada, o ambos comprende además deducir la extensión de una contaminación cruzada para una sola muestra a partir de la cantidad absoluta o relativa de al menos un identificador presente en dicha muestra individual.

Dichas modalidades preferidas particulares de detección de intercambio de la muestra, contaminación cruzada, o ambos en el campo de análisis de la metilación se llevan a cabo prácticamente como se describe en las modalidades de la presente descripción para identificar al menos una muestra biológica en el campo de análisis de la metilación.

De acuerdo con una modalidad preferida particular, los identificadores se aplican a muestras de un conjunto de muestras como se indica en la Figura 2. Cada muestra del conjunto se representa por dos identificadores diferentes, por ejemplo, pero no se limitan a, dos identificadores diferentes que pertenecen a un conjunto de variantes de polimorfismo de secuencia. Preferentemente, de ese modo cada identificador se codifica por un plásmido diferente. Una muestra respectiva se puede identificar entre las etapas de un procedimiento experimental o posterior a éste amplificando las variantes de polimorfismo de secuencia e hibridando el amplicón en un chip. Cada combinación de identificadores resulta en un patrón de hibridación único. Un intercambio muestra se detecta si dos señales de hibridación se detectan mediante el cual uno o ambos no son característicos de los identificadores aplicados para dicha muestra. Una contaminación cruzada de la muestra se detecta si al menos se detectan tres en lugar de dos señales de hibridación. De ese modo las señales de hibridaciones no esperadas para dicha muestra indican con lo que se contamina una o más muestras de dicha muestra. Mediante la cuantificación de las señales de hibridación es posible deducir la cantidad de contaminación (es). De acuerdo con esta modalidad, el uso de dos identificadores diferentes para cada muestra tiene la ventaja de que la asignación de los identificadores a la diferente muestras es inequívoca. Por ejemplo, en el caso de que dos identificadores idénticos se usan y dos señales de hibridación diferentes se detectan, no puede distinguirse entre una contaminación cruzada y una muestra a la que se aplican dos identificadores diferentes.

De acuerdo con una modalidad preferida particular, un máximo de 28 muestras se codifican por medio del sistema anteriormente descrito de dos identificadores diferentes. De acuerdo con otras modalidades preferidas particulares, el uso de varios números diferentes de identificadores se usan para las muestras de la codificación. Estas modalidades se resumen en la Tabla 1.

Tabla 1

número de plásmidos por muestra número de identificador por plásmido	1	2	3	4	5	6	7	8
1	1	-	-	-	-	-	-	-
2	2	1	-	-	-	-	-	-
3	3	3	1	-	-	-	-	-
4	4	6	4	1	-	-	-	-
5	5	10	10	5	1	-	-	-
6	6	16	20	15	6	1	-	-
7	7	21	35	35	21	7	1	-
8	8	28	56	70	56	28	8	1
9	9	36	84	126	126	84	36	9
10	10	45	120	210	252	210	120	45
11	11	55	185	330	462	462	330	185
12	12	66	220	495	792	924	792	495
13	13	78	286	715	1287	1716	1716	1287
14	14	91	364	1001	2002	3003	3432	3003
15	15	105	455	1365	3003	5006	6435	6435
16	16	120	550	1820	4368	6008	11440	12870
17	17	136	680	2380	6168	12376	19448	24310
18	18	153	816	3060	8568	18564	31824	43758
19	19	171	969	3876	11628	27132	50368	75582
20	20	190	1140	4845	15504	38760	77520	125970
21	21	210	1330	5985	20349	54264	116280	203490
22	22	231	1540	7315	26334	74613	170544	319770
23	23	253	1771	8855	33549	100947	245157	490314
24	24	276	2024	10626	42504	134596	346104	735471
25	25	300	2300	12650	53130	177100	480700	1061575
26	26	325	2600	14950	65780	230230	657800	1562275
27	27	351	2925	17550	80730	296010	888030	2220075
28	28	378	3276	20475	98280	376740	1184040	3108105
29	29	406	3654	23751	118755	475020	1560760	4292145

ES 2 546 848 T3

30	30	435	4060	27405	142506	593775	2035800	5852925
31	31	465	4495	31465	169911	736281	2629575	7888725
32	32	496	4960	35980	201376	906192	3365856	10518300
33	33	528	5456	40920	237336	1107568	4272048	13884156
34	34	561	5984	48378	278256	1344904	5379616	18156204
35	35	595	6545	52360	324632	1623160	6724520	23535820
36	36	630	7140	58905	376992	1947792	8347680	30260340
37	37	666	7770	66045	435897	2324784	10295472	38608020
38	38	703	8436	73815	501942	2760681	12620256	48903492
39	39	741	9139	82251	575757	3262623	15380937	61523748
40	40	780	9880	91390	658008	3838380	18643560	78904685
41	41	820	10660	101270	749398	4496388	22481940	95548245
42	42	861	11480	111930	850668	5245786	26978328	118030185
43	43	903	12341	123410	962598	6096454	32224114	145008513
44	44	946	13244	135751	1086008	7059052	38320568	177232627
45	45	990	14190	148995	1221759	8145060	45379620	215553195
46	46	1035	15180	163185	1370754	9366819	53524680	260932815
47	47	1081	16215	178365	1533939	10737573	62891499	314457495
48	48	1128	17296	194580	1712304	12271512	73629072	377348994
49	49	1176	18424	211876	1906884	13983816	85900584	450978066
50	50	1225	19600	230300	2118760	15890700	99884400	536878650
51	51	1275	20825	249900	2349060	18009460	115775100	636763050
52	52	1326	22100	270725	2598960	20358520	133784560	752538150
53	53	1378	23426	292825	2889685	22957480	154143080	886322710
54	54	1431	24804	316251	3162510	25827165	177100560	1040465790
55	55	1485	26235	341055	3478761	28989675	202927725	1217566350
56	56	1540	27720	367290	3819816	32468436	231917400	1420494075
57	57	1596	29260	395010	4187106	36288252	264385836	1652411475
58	58	1653	30856	424270	4582116	40475358	300674088	1916797311
59	59	1711	32509	455126	5006386	45057474	341149446	2217471399
60	60	1770	34220	487635	5461512	50063860	386206920	2558620845
61	61	1830	35990	521855	5949147	55525372	438270780	2944827765
62	62	1891	37820	557845	6471002	61474519	491796152	3381098545
63	63	1953	39711	595665	7028847	67945521	553270671	3872894697
64	64	2016	41664	635376	7624512	74974368	621216192	4426165368
65	65	2080	43680	677040	8259888	82598880	696190560	5047381560
66	66	2145	45760	720720	8936928	90858768	778789440	5743572120
67	67	2211	47905	766480	9657648	99795696	869648208	6522361580
68	68	2278	50116	814385	10424128	109453344	969443904	7392009768
69	69	2346	52394	864501	11238513	119877472	1078897248	8361453672
70	70	2415	54740	916895	12103014	131115985	1198774720	9440350920
71	71	2485	57155	971635	13019909	143218999	1329890705	1,0639E+10
72	72	2556	59640	1028790	13991544	156238908	1473109704	1,1969E+10
73	73	2628	62196	1088430	15020334	170230452	1629348612	1,3442E+10
74	74	2701	64824	1150626	16108764	185250786	1799579064	1,5071E+10
75	75	2775	67525	1215450	17259390	201359550	1984829850	1,6871E+10
76	76	2850	70300	1282975	18474840	218618940	2186189400	1,8856E+10
77	77	2926	73150	1353275	19757815	237093780	2404808340	2,1042E+10
78	78	3003	76076	1426425	21111090	256851595	2641902120	2,3447E+10
79	79	3081	79079	1502501	22537515	277962685	2898753715	2,6089E+10
80	80	3160	82160	1581580	24040016	300500200	3176716400	2,8988E+10

81	81	3240	85320	1663740	25621596	324540216	3477216600	3,2164E+10
82	82	3321	88560	1749060	27285336	350161812	3801756816	3,5641E+10
83	83	3403	91881	1837620	29034396	3774471484	4151918628	3,9443E+10
84	84	3486	95284	1929501	30872016	4064815444	4529365776	4,3595E+10
85	85	3570	98770	2024785	32801517	437353560	4935847320	4,8125E+10
86	86	3655	102340	2123555	34826302	470156077	5373200880	5,306E+10
87	87	3741	105995	2225895	36949857	504981379	5843355957	5,8434E+10
88	88	3828	109736	2331890	39175752	541931236	6348337336	6,4277E+10
89	89	3916	113564	2441626	41507642	581106988	6890268572	7,0625E+10
90	90	4005	117480	2555190	43940268	622614630	7471375560	7,7516E+10
91	91	4095	121485	2672670	46504458	666563898	8093990190	8,4987E+10
92	92	4186	125580	2794155	49177128	713068356	8760554088	9,3081E+10
93	93	4278	129766	2919735	51971283	762245484	9473622444	1,0184E+11
94	94	4371	134044	3049501	54891018	814216767	1,0236E+10	1,1132E+11
95	95	4465	138415	3183545	57940519	869107785	1,105E+10	1,2155E+11
96	96	4560	142880	3321960	61124064	927048304	1,1919E+10	1,326E+11

La Tabla 1 brinda una visión general de varias modalidades preferidas particulares. Se muestra la cantidad máxima de muestras que se pueden codificar por medio de 1, 2, 3, 4, 5, 6, 7, u 8 plásmidos y por medio de 1 a 96 identificadores, por lo cual cada identificador puede estar compuesto por cada plásmido. Generalmente, la siguiente fórmula expresa la cantidad máxima de muestras que se pueden codificar por medio de un cierto número de plásmidos y un cierto número de identificadores:

$$K(n, k) = \binom{n}{k}$$

De ese modo K representa el número máximo de muestras que se pueden codificar, k representa el número de identificadores (por ejemplo, variantes de polimorfismo), y n representa el número de plásmidos. Por supuesto las modalidades adicionales correspondientes son posibles y se prefieren con la presente.

De acuerdo con una modalidad preferida particular, el método de la invención es un método para identificar una muestra en un conjunto de muestra mezclada en el campo de análisis de la metilación, que comprende las dos etapas primeras en el orden indicado:

proporcionar un conjunto de muestra mezclada de al menos dos muestras biológicas, en donde al menos una muestra comprende ADN genómico diferencialmente metilado al menos en una posición;

aplicar al menos un identificador para cada muestra;

someter el conjunto de muestra a una detección o cuantificación de la reacción que es específica para al menos un identificador de cada muestra; e

identificar una muestra en el conjunto de muestra mezclada mediante la detección del al menos un identificador aplicado respectivo.

El método comprende poner en contacto el ADN de cada muestra y al menos un identificador aplicado con un reactivo de bisulfito que diferencia entre una posición metilada o una no metilada. Dichas modalidades preferidas particulares para identificar una muestra en un conjunto de muestra mezclada en el campo del análisis de la metilación se lleva a cabo prácticamente como se describe en las modalidades de la presente descripción para identificar al menos una muestra biológica en el campo de análisis de la metilación.

De acuerdo con una modalidad preferida particular, las muestras tomadas del mismo individuo se codifican por los identificadores del mismo conjunto de identificadores. Esto permite una codificación órgano específico de las muestras, una codificación tejido específico de las muestras, una codificación cuerpo específico de las muestras, o combinaciones de estas. De acuerdo con una modalidad particular, las muestras tomadas de diferentes individuos se codifican por los identificadores de diferentes conjuntos de identificadores. Además, es particular preferida, combinar estas dos modalidades, de manera que es posible mezclar las muestras derivadas de un mismo individuo y analizarlas simultáneamente con muestras mezcladas de otros individuos. Las muestras se pueden asignar a los individuos correspondientes por medio de los identificadores específicos individuales. Es posible identificar cada muestra y asignarla a los resultados del análisis por medio de los identificadores específicos para cada muestra obtenida a partir del mismo individuo. Por lo tanto es necesario que cada identificador específico para cada muestra se asocie con el ADN genómico o tiene propiedades similares como las del ADN genómico, en caso de que se usan identificadores

exógenos. Pero por supuesto, además se usan y se prefieren además muestra de identificadores endógenos de ADN. Tales identificadores exógenos o endógenos pueden ser, por ejemplo, pero no se limitan a, todo tipo de polimorfismos (secuencia, longitud, delección, SNP).

5 De acuerdo con una modalidad preferida particular, el método de la invención es un método de detección de una inhibición de amplificación en el campo de análisis de la metilación, que comprende las dos primeras etapas en el orden indicado:
 proporcionar un conjunto de muestras de al menos dos muestras biológicas, en donde al menos una muestra comprende ADN genómico metilado diferencialmente al menos en una posición;
 10 aplicar al menos un identificador para cada muestra;
 someter cada muestra con al menos un identificador a una reacción de amplificación que es específica para al menos un identificador; y
 deducir una presencia, ausencia o inhibición de la amplificación parcial a partir de la presencia, ausencia o cantidad del producto de la reacción de amplificación específica del identificador.

15 Estas modalidades comprenden poner en contacto el ADN de cada muestra y al menos un identificador aplicado con un reactivo de bisulfito que diferencia entre una posición metilada o una no metilada. Dichas modalidades preferidas particulares de detección de una inhibición de amplificación en el campo de análisis de la metilación se lleva a cabo prácticamente como se describe en las modalidades de la presente descripción para identificar al menos una muestra biológica en el campo de análisis de la metilación.

De acuerdo con esta modalidad, una persona con experiencia en la técnica puede detectar fácilmente una inhibición de amplificación porque al menos se aplica un identificador que se puede detectar mediante la amplificación. Deduce una presencia de una inhibición de la amplificación en caso de que no es más amplificable el (los) identificador (es) aplicado
 25 (s).

De acuerdo con una modalidad particular preferida, el método de la invención es un método de normalización, calibración, o ambos en el campo de análisis de la metilación, que comprende las dos primeras etapas en el orden indicado:
 30 proporcionar un conjunto de muestras de al menos dos muestras biológicas, en donde al menos una muestra comprende ADN genómico metilado diferencialmente al menos en una posición;
 aplicar al menos un identificador para cada muestra mediante la adición de al menos un identificador a cada muestra proporcionada;
 someter cada muestra con al menos un identificador a una reacción de detección o cuantificación; y
 35 normalizar al menos una muestra, calibrar un procedimiento experimental, o ambos de acuerdo con uno o más identificadores detectados o cuantificados en comparación con la cantidad total añadida de uno o más identificadores. De ese modo la normalización significa una corrección de acuerdo con los estándares, particularmente de acuerdo con uno o más identificadores usados. Por otra parte, la calibración significa un ajuste de un procedimiento experimental o método, de manera que los valores característicos del procedimiento o método se encuentran dentro de ciertos intervalos predefinidos. De acuerdo con la invención, tales valores característicos pueden ser esos derivados de uno o
 40 más identificadores.

De acuerdo con una modalidad preferida, uno o más identificadores aplicados para al menos una muestra biológica se detectan o cuantifican al menos dos veces durante un procedimiento experimental. Preferentemente, se detectan o cuantifican después de una o más etapas del procedimiento experimental y posterior al procedimiento experimental.
 45

Esta modalidad comprende poner en contacto el ADN de cada muestra y al menos un identificador aplicado con un reactivo de bisulfito que diferencia entre una posición metilada o una no metilada. Las modalidades particulares preferidas de normalización, calibración, o ambas, en el campo de análisis de la metilación se llevan a cabo prácticamente como las modalidades descritas en la presente para identificar al menos una muestra biológica en el campo de análisis de metilación.
 50

De acuerdo con esta modalidad, uno o más identificadores se aplican en una cantidad definida. Es posible calibrar un procedimiento experimental o normalizar las muestras procesadas mediante un procedimiento experimental usando estos identificadores como estándar interno y tomando en consideración los cambios cuantitativos. Los cambios de este tipo se pueden determinar, por ejemplo, pero no se limitan a, etapas de pipeteados o amplificaciones.
 55

De acuerdo con una modalidad preferida particular, el método de la invención es un método de identificación de una contaminación por arrastre en el campo de análisis de la metilación, que comprende las dos primeras etapas en el orden indicado:
 60 proporcionar un conjunto de muestras de al menos dos muestras biológicas, en donde al menos una muestra comprende el ADN genómico diferencialmente metilado al menos en una posición;
 aplicar al menos un identificador para cada muestra;
 someter cada muestra con al menos un identificador a una reacción de detección o cuantificación que es específico para al menos un identificador; y
 65

deducir la presencia de una contaminación por arrastre de la muestra a partir de la presencia de al menos un identificador no aplicado en dicha muestra, o deducir la ausencia de una contaminación de la muestra a partir de la ausencia de identificadores no aplicados en dicha muestra.

5 Esta modalidad comprende poner en contacto el ADN de cada muestra y al menos un identificador aplicado con un reactivo de bisulfito que diferencia entre una posición metilada o una no metilada. Dichas modalidades particulares preferidas de identificación de un traspaso de una contaminación por arrastre en el campo de la metilación se lleva a cabo prácticamente como las modalidades descritas en la presente para identificar al menos una muestra biológica en el campo de análisis de metilación.

10 De acuerdo con esta modalidad, se proporciona cada conjunto de muestras con un identificador cuando se procesa o almacena en un lugar determinado. Una contaminación por arrastre está presente, en caso de que un identificador usado anteriormente por otro conjunto de muestras se detecta por un conjunto de muestras.

15 De acuerdo con una modalidad preferida particular, el método de la invención es un método para evaluar el éxito de una etapa de hibridación en el campo de análisis de la metilación, que comprende las dos primeras etapas en el orden indicado:

proporcionar un conjunto de muestras de al menos dos muestras biológicas, en donde al menos una muestra comprende el ADN genómico diferencialmente metilado al menos en una posición; aplicar al menos un identificador;

20 someter cada muestra que incluye al menos un identificador aplicado a una reacción de detección o cuantificación que es específica para dicho al menos un identificador; en donde la reacción de detección o cuantificación comprende una etapa de hibridación,

25 evaluar el éxito de la etapa de hibridación en donde (a) la presencia de una señal derivada de al menos un identificador aplicado indica la presencia de una etapa de hibridación exitosa, y en donde (b) la ausencia de señal derivada por al menos un identificador aplicado indica la presencia de una etapa de hibridación sin éxito.

Esta modalidad comprende poner en contacto el ADN de cada muestra y al menos un identificador aplicado con un reactivo de bisulfito que diferencia entre una posición metilada o una no metilada. Dichas modalidades particulares preferidas para evaluar el éxito de una etapa de hibridación en el campo de análisis de la metilación se lleva a cabo prácticamente como las modalidades descritas en la presente para identificar al menos una muestra biológica en el campo de análisis de la metilación.

30 De acuerdo con esta modalidad, es en principio suficiente para aplicar un único identificador por lote experimental. Preferentemente, dos o más identificadores se aplican para un único lote experimental. Este es en particular el caso en donde las muestras procesadas se tratan diferencialmente o de forma independiente uno del otro. Con la máxima preferencia, al menos un identificador se aplica para cada muestra que se procesa por lote experimental.

40 De acuerdo con una modalidad preferida particular, el método de la invención es un método para determinar la velocidad de conversión de ADN en el campo de análisis de la metilación, que comprende las dos primeras etapas en el orden indicado:

proporcionar un conjunto de muestras de al menos dos muestras biológicas, en donde al menos una muestra comprende el ADN genómico diferencialmente metilado al menos en una posición;

45 aplicar al menos un identificador para cada muestra, al menos uno de los identificadores aplicados comprende una citosina que no es parte de un dinucleótido CpG;

someter cada muestra con al menos un identificador a al menos una reacción que convierte citosinas no metiladas en una base con un comportamiento de apareamiento de base diferente que citosina, particularmente con uracilo, mientras que las citosinas metiladas permanecen sin cambios;

50 someter al menos un identificador de cada muestra a al menos una reacción de cuantificación, en donde la cantidad total de identificador y la cantidad de identificador convertido se detectan; y

determinar la velocidad de conversión de ADN de acuerdo con la cantidad de identificador convertida en comparación con la cantidad total de identificador.

De acuerdo con esta modalidad, la velocidad de conversión de un tratamiento con bisulfito se determina mediante la cuantificación de la cantidad de un identificador aplicado antes de una etapa y después de eso. De ese modo la etapa comprende poner en contacto el ADN y al menos un identificador con un reactivo de bisulfito. Generalmente, la cantidad después del tratamiento se divide por la cantidad antes del tratamiento. Pero otras posibilidades son posibles y se incluyen también con la presente.

60 De acuerdo con otras modalidades, la eficacia de un procedimiento experimental o solo etapas de la misma se determinan en correspondencia como la velocidad de conversión del tratamiento con bisulfito.

Se describe además un método para probar un procedimiento experimental, que comprende aplicar al menos un identificador en lugar de una muestra biológica en un procedimiento experimental; someter uno o más identificadores a una reacción de detección o cuantificación que es específica a dichos uno o más identificadores, y que se lleva a cabo antes o después de las etapas individuales del procedimiento experimental o posterior a la misma.

- Se describe además un método para probar un procedimiento experimental en el campo de análisis de la metilación, que comprende aplicar al menos un identificador en lugar de una muestra biológica en un procedimiento experimental, el procedimiento experimental comprende poner en contacto al menos un identificador aplicado con un reactivo o enzima que diferencia entre una posición metilada o no metilada; someter uno o más identificadores a una reacción de detección o cuantificación que es específica a dichos uno o más identificadores, y que se lleva a cabo antes o después de las etapas individuales del procedimiento experimental o posterior a la misma.
- Como consecuencia, uno o más identificadores que sustituyen una muestra biológica se refieren en la presente como muestra de identificador.
- En estas modalidades, uno o más identificadores pueden sustituir una muestra biológica. Preferentemente, uno o más identificadores sustituyen una muestra biológica dentro de un conjunto de muestras o uno o más identificadores sustituyen un conjunto de muestras que resultan en un conjunto de muestras identificador. De acuerdo con estas modalidades, uno o más identificadores se proporcionan de maneras comparables, similares o idénticas como una muestra biológica. Por ejemplo, uno o más identificadores están dentro del mismo recipiente, en el mismo tampón o ambos como una muestra biológica. Sin embargo, de acuerdo con estas modalidades, uno o más identificadores se pueden proporcionar además como sustancia seca o en solución con agua o cualquier tampón adecuado. De acuerdo con estas modalidades, los identificadores se detectan o cuantifican entre etapas individuales del procedimiento experimental o en su final. La reacción de detección o cuantificación se lleva a cabo según lo especificado por otras modalidades descritas en la presente. Una persona con experiencia en la técnica sabe ajustarlas si es necesario. De acuerdo con esta modalidad, las muestras de identificador o conjuntos de muestras de identificador se someten a otras modalidades descritas en la presente.
- Se describe que el procedimiento experimental es, por ejemplo, pero no se limitan a cualquier combinación de reacciones químicas, biológicas o físicas.
- Se describe que la prueba de un procedimiento experimental comprende al menos una de las siguientes
- determinar la probabilidad para un intercambio de muestra, contaminación cruzada, o ambos;
 - determinar el grado de una posible contaminación cruzada;
 - determinar la probabilidad de identificar una muestra en un conjunto de muestras mezcladas;
 - determinar la probabilidad de una inhibición de la amplificación;
 - calibrar el procedimiento experimental;
 - determinar la necesidad de normalización;
 - determinar la probabilidad de la contaminación por arrastre;
 - determinar la eficacia de una reacción, de una etapa de dicho procedimiento experimental, o del procedimiento experimental completo;
 - optimizar el procedimiento experimental; y
 - determinar la presencia de una etapa de hibridación exitosa o la presencia de una etapa de hibridación sin éxito.
- Se describe que la prueba de un procedimiento experimental comprende determinar la probabilidad de un intercambio de muestra, contaminación cruzada, o ambos. Como consecuencia, al menos uno o más identificadores sustituyen una muestra biológica (muestra de identificador) y al menos dos muestras de identificadores se aplican a un procedimiento experimental. Un intercambio de muestra o contaminación cruzada de la muestra se determina detectando la presencia o ausencia de identificadores aplicados. Un intercambio se determina en donde a) al menos uno de los identificadores aplicados de una muestra de identificador no se detecta, y en donde b) al menos un identificador se detecta que se aplicó a una muestra de identificador diferente, dichas muestras de identificadores que se procesan al mismo tiempo. Una contaminación cruzada de una muestra de identificador se determina en donde a) al menos un identificador se detecta que se aplicó a una muestra de identificador diferente, y ambas muestras de identificadores se procesaron al mismo tiempo, y en donde b) todas las muestras de identificadores aplicadas de dicha muestra de identificador se detectan. Un intercambio y contaminación cruzada simultánea se detecta en donde un intercambio y una contaminación cruzada se determinan para una única muestra de identificador durante la corrida del mismo procedimiento experimental. La probabilidad de que un intercambio de muestra se determina multiplicando el cociente del número de muestras de identificadores intercambiadas reducido a la mitad y el número total de muestras de identificadores analizadas con el factor 100. La probabilidad de que una contaminación cruzada se determina analógicamente multiplicando el cociente del número de muestras de identificadores de contaminación cruzada y el número total de muestras de identificadores analizadas por el factor 100. La probabilidad para el intercambio de muestra y la contaminación cruzada simultánea se determina además analógicamente multiplicando el cociente entre el número de muestras de identificador intercambiados y de contaminación cruzada y el número total de muestras de identificadores analizadas por el factor 100. Por supuesto, y preferido además, una persona con experiencia en la técnica es consciente de otros algoritmos adecuados.
- Se describe que la prueba de un procedimiento experimental comprende determinar el grado de una contaminación cruzada. Como consecuencia, al menos uno o más identificadores sustituyen una muestra biológica (muestra de identificador) y al menos dos muestras de identificadores se aplican a un procedimiento experimental. El grado de una

contaminación cruzada se determina mediante la determinación de la relación de la cantidad de identificador que se contamina y la cantidad total de identificador detectado en la reacción de cuantificación para una muestra de identificador. De acuerdo con una modalidad preferida particular, una distribución de probabilidad para el grado de contaminaciones cruzadas de un procedimiento experimental se determina considerando muchas muestras de
 5 identificador contaminadas de manera cruzada. Por supuesto, y preferido además, una persona con experiencia en la técnica es consciente de otros algoritmos adecuados.

Se describe que la prueba de un procedimiento experimental en el campo de análisis de la metilación comprende determinar la probabilidad para un intercambio, contaminación cruzada de la muestra, o ambos como se especificó
 10 anteriormente. Como consecuencia, la determinación de la probabilidad para un intercambio de muestra, contaminación cruzada, o ambos comprende poner en contacto al menos un identificador con un reactivo de bisulfito.

Se describe que la prueba de un procedimiento experimental comprende determinar la probabilidad de identificar una muestra, particularmente en un conjunto de muestras mezcladas. Como consecuencia, uno o más identificadores se aplican en lugar de una muestra biológica (muestra de identificador). Preferentemente, un número arbitrario de muestras de identificador se combinaron para un conjunto de muestras mezcladas. La muestra de identificador o el conjunto de muestras de identificador preferido, se aplica después a un procedimiento experimental. La probabilidad de identificar una muestra antes o después de una etapa individual del procedimiento experimental o al final de ella se determina realizando muchas veces la reacción de detección o cuantificación específica para un identificador, el identificador
 15 siendo parte de una muestra de identificador. La probabilidad se determina después multiplicando la relación de intentos con éxito en la detección de dicho identificador y el intento total para detectar dicho identificador por el factor 100. Por supuesto, se prefieren además otros algoritmos adecuados por una persona con experiencia en la técnica que sea consciente. Estas modalidades particulares son particulares de uso para la determinación de la cantidad mínima de identificador o muestra biológica que tiene que ser aplicada en un procedimiento experimental para obtener resultados
 20 fiables. Preferentemente, estas modalidades son de uso particular para determinar la cantidad de identificador o muestra biológica que permiten resultados fiables con una probabilidad de aproximadamente 60 %, aproximadamente 75 %, aproximadamente 85 %, aproximadamente 95 %, aproximadamente 98 %, aproximadamente 99 %, o aproximadamente 100 %.

Se describe que, la prueba de un procedimiento experimental en el campo de análisis de la metilación comprende determinar la probabilidad para identificar una muestra, particularmente en un conjunto de muestras mezcladas como se especificó anteriormente. Como consecuencia, la determinación de la probabilidad de identificar una muestra, particularmente en un conjunto de muestras mezcladas comprende poner en contacto al menos un identificador con un reactivo de bisulfito.
 30

Se describe que la prueba de un procedimiento experimental comprende determinar la probabilidad de una inhibición de la amplificación. Como consecuencia, uno o más identificadores se aplican a un procedimiento experimental en lugar de una muestra biológica (muestra de identificador). Una inhibición de la amplificación para una muestra de identificador está presente en donde al menos un identificador aplicado no se detecta durante una amplificación previamente establecida basada en la detección o cuantificación. La probabilidad de una inhibición de la amplificación se determina multiplicando la relación entre el número de intentos de detección sin éxito y el número total de intentos de detección por el factor 100. Por supuesto, y preferido además, una persona con experiencia en la técnica es consciente de otros algoritmos adecuados. Preferentemente, para determinar la probabilidad de inhibición de la amplificación, una o más muestras de identificador se aplican al procedimiento experimental y al menos dos identificadores se someten a la correspondiente amplificación previamente establecida basada en detecciones o cuantificaciones. La probabilidad de una inhibición de la amplificación se determina después promediando las probabilidades de una inhibición de la amplificación determinada para cada identificador considerado. Por supuesto, se prefieren además otros algoritmos adecuados por una persona con experiencia en la técnica que sea consciente.
 35

Se describe que la prueba de un procedimiento experimental en el campo de análisis de la metilación comprende determinar la probabilidad de una inhibición de la amplificación como se especificó anteriormente. Como consecuencia, la determinación de la probabilidad de una inhibición de la amplificación comprende poner en contacto al menos un identificador con un reactivo de bisulfito.
 40

Se describe que la prueba de un procedimiento experimental comprende calibrar el procedimiento experimental. Como consecuencia, al menos uno o más identificadores sustituyen una muestra biológica (muestra de identificador) y al menos una muestra de identificador se aplica a un procedimiento experimental. La calibración del procedimiento experimental se realiza con la modificación de las diferentes etapas individuales del procedimiento experimental tal que uno o más identificadores aplicados se detectan con una cierta probabilidad predefinida, que la cantidad de uno o más identificadores aplicados determinada en la reacción de cuantificación se encuentran dentro de un cierto intervalo predefinido, o ambos. La probabilidad predefinida y el intervalo de cuantificación predefinido se determinan por al menos una corrida del procedimiento experimental optimizado. Esta modalidad es particularmente preferida cuando se establece o restablece un procedimiento experimental, por ejemplo, pero no se limitan a, después de un cambio de ubicación o después de un período de tiempo sin realizar el procedimiento.
 45

Se describe que la prueba de un procedimiento experimental en el campo de análisis de la metilación comprende
 50

calibrar el procedimiento experimental como se especificó anteriormente. Por consiguiente, la calibración de un procedimiento experimental comprende poner en contacto al menos un identificador con un reactivo de bisulfito.

5 Se describe que la prueba de un procedimiento experimental comprende determinar la necesidad de normalización para dicho procedimiento experimental. Como consecuencia, al menos uno o más identificadores sustituyen una muestra biológica (muestra de identificador) y al menos una muestra de identificador se aplica a un procedimiento experimental. Los identificadores aplicados se cuantifican antes o después de las etapas individuales del procedimiento experimental o al final. La necesidad de la normalización se determina en donde las cantidades de uno o más identificadores cuantificados no están dentro de un cierto intervalo predefinido. En muchos casos, pero no se limitan a ellos, el intervalo se determina mediante el procesamiento posterior, análisis o interpretaciones de los datos y no por el procedimiento experimental en sí. En donde se determina la necesidad, se prefieren además algoritmos adecuados para la normalización por una persona con experiencia en la técnica que está consciente de, o es capaz de ajustar.

15 Se describe que la prueba de un procedimiento experimental en el campo de análisis de la metilación comprende determinar la necesidad de la normalización de dicho procedimiento experimental como se especificó anteriormente. Por ejemplo, pero no se limitan a este, la cuantificación del efecto de una digestión sensible a la metilación se puede normalizar por uno o más identificadores aplicados que contienen un sitio de reconocimiento para la enzima o enzimas usadas. De acuerdo con una modalidad preferida particular, la determinación de la necesidad de la normalización de un procedimiento experimental comprende poner en contacto al menos un identificador con un reactivo de bisulfito.

20 Se describe que la prueba de un procedimiento experimental comprende determinar la probabilidad de la contaminación por arrastre. Como consecuencia, al menos uno o más identificadores sustituyen una muestra biológica (muestra de identificador) y al menos una muestra de identificador se aplica secuencialmente a al menos dos corridas del procedimiento experimental. De ese modo dichas corridas del procedimiento experimental pueden comprender reacción(es) iguales o similares o no. Una contaminación por arrastre para una muestra de identificador se determina en donde se detecta un identificador que se aplicó en una corrida anterior. Una muestra se considera como libre de una contaminación por arrastre en donde no se detecta ningún identificador que sea indicativo de una corrida anterior. La probabilidad de la contaminación por arrastre para un procedimiento experimental se determina multiplicando la relación del número de muestras contaminadas de arrastre y el número total de muestras por el factor 100. Por supuesto, y preferido además, una persona con experiencia en la técnica es consciente de otros algoritmos adecuados.

30 Se describe que la prueba de un procedimiento experimental en el campo de análisis de la metilación comprende determinar la probabilidad de la contaminación por arrastre como se especificó anteriormente. Como consecuencia, la determinación de la probabilidad de la contaminación por arrastre comprende poner en contacto al menos un identificador con un reactivo de bisulfito.

35 Se describe que la prueba de un procedimiento experimental comprende determinar la eficacia de una reacción, de una etapa de dicho procedimiento experimental, del procedimiento experimental completo, o combinaciones de estos. Como consecuencia, al menos uno o más identificadores sustituyen una muestra biológica (muestra de identificador). Al menos una muestra de identificador se sometió al procedimiento experimental que comprende al menos una reacción o etapa, dicha etapa que comprende al menos una reacción. La eficacia se determina considerando la cantidad de al menos un identificador antes y después de una reacción, antes y después de una etapa, o al inicio y al final del procedimiento experimental. La eficacia se determina por la relación de la cantidad de un identificador antes de la reacción y la cantidad de dicho identificador o su derivado después de la reacción. La eficacia de una etapa del procedimiento se determina por la relación de la cantidad de un identificador antes de la etapa y la cantidad de dicho identificador o su derivado después de dicha etapa. La eficacia de un procedimiento experimental se determina por la relación de la cantidad de un identificador al inicio del procedimiento experimental y la cantidad de dicho identificador o su derivado al final del procedimiento experimental. Alternativamente, la eficacia de una etapa de un procedimiento experimental se determina multiplicando las eficacias de todas las reacciones que forman parte de dicha etapa entre sí. Análogamente, la eficacia de un procedimiento experimental completo se determina ya sea a) multiplicando las eficacias de todas las etapas que son parte del procedimiento experimental entre sí, o b) multiplicando las eficacias de todas las reacciones que son parte del procedimiento experimental entre sí. Una persona con experiencia en la técnica es consciente de otros algoritmos adecuados. Estos se prefieren también con la presente.

45 Se describe que la prueba de un procedimiento experimental en el campo del análisis de la metilación comprende determinar la eficacia de una reacción, de una etapa de dicho procedimiento experimental, del procedimiento experimental completo, o combinaciones de estos. Como consecuencia, la eficacia de una reacción, etapa de procedimiento, o procedimiento experimental se determina en donde la dicha comprende poner en contacto al menos un identificador con un reactivo de bisulfito.

50 Se describe que la prueba de un procedimiento experimental comprende optimizar el procedimiento experimental. Como consecuencia, al menos uno o más identificadores sustituyen una muestra biológica (muestra de identificador) y al menos una muestra de identificador se aplica a un procedimiento experimental. El procedimiento experimental se optimiza mediante la modificación de al menos una etapa o reacción del procedimiento experimental. Esta modificación se lleva a cabo de acuerdo con los diferentes objetivos, por ejemplo, pero no se limitan a, para una cantidad máxima de un identificador o su derivado al final del procedimiento experimental. Por supuesto, y preferido además, una persona

con experiencia en la técnica es consciente de otros objetivos. Es consciente además de cómo modificar una o más reacción(es) o uno o más etapa(s) para lograr un determinado objetivo.

5 Se describe que el ensayo de un procedimiento experimental en el campo de análisis de la metilación comprende optimizar el procedimiento experimental como se especificó anteriormente. Como consecuencia, la optimización del procedimiento experimental comprende poner en contacto al menos un identificador con un reactivo de bisulfito.

10 Se describe que el ensayo de un procedimiento experimental comprende evaluar el éxito de una etapa de hibridación. Como consecuencia, al menos uno o más identificadores sustituyen una muestra biológica (muestra de identificador) y al menos una muestra de identificador se aplica a un procedimiento experimental. Este procedimiento experimental comprende una etapa de hibridación que se puede caracterizar por sí misma por diferentes subetapas como preparación de ADN, prehibridación, hibridación, etapas de lavado, detección. En correspondencia cualquier material, solución o sustancias se pueden usar para la etapa de hibridación mientras que sea posible la hibridación del identificador aplicado procesado y el ADN procesado respectivo derivados de la(s) muestra(s) biológica(s), respectivamente.

15 Se describe que la prueba de un procedimiento experimental en el campo del análisis de la metilación comprende evaluar el éxito de una etapa de hibridación de un procedimiento experimental como se especificó anteriormente. Como consecuencia, la evaluación del éxito de una etapa de hibridación comprende poner en contacto al menos un identificador con un reactivo de bisulfito.

Adicionalmente, los aspectos particulares de la invención se refieren a controlar un proceso o método.

25 Los siguientes problemas técnicos subyacen en las modalidades de la invención para el control de la precisión de un proceso o método. Muchas rutinas de laboratorio requieren el procesamiento paralelo de las muestras, particularmente un gran número de muestras. Este es particularmente el caso para fines de diagnóstico, pronóstico o tamizaje. Debido al gran número de muestras dichos procesos o métodos son altamente accesibles para los errores. Tales errores son por ejemplo, pero no se limitan al intercambio de muestra o contaminaciones cruzadas. Este error puede ocurrir en diferentes niveles de análisis, por ejemplo pero no se limitan a la recolección de muestra, preparación de muestra, extracción del ADN/ARN, modificación del ADN/ARN, amplificación del ADN/ARN, o caracterización del ADN/ARN como PCR, hibridación o secuenciación. Adicionalmente, debido al gran número de muestras y tal vez un número limitado de identificadores moleculares aplicables, puede que no sea posible asignar un identificador único a cada muestra. Este es, por ejemplo, pero no se limita a, el caso, en donde el proceso o método comprende una etapa de PCR en tiempo real. Sólo un número limitado de colorantes es detectable en el análisis de PCR en tiempo real, pero hasta 384 muestras diferentes se pueden medir en una única corrida.

30 La solución de dichos problemas es usar un pequeño número de identificadores moleculares por ejemplo, 1-10 para añadirlo/los en las muestras en un orden definido. Aunque el número de muestras es mayor que el número de identificadores se espera un patrón específico de identificadores al final del proceso. Cada trastorno de las muestras es más fácilmente reconocible por un orden inesperado de los identificadores que se identifican a su vez de acuerdo con un método adecuado.

35 La ventaja particular de esta modalidad es que se necesita un menor número de identificadores moleculares para controlar un proceso o método es decir, para excluir los errores de un proceso o método. Esto resulta, entre otros, en menos esfuerzos de manipulación, costos, etapas de procesamiento y un menor tiempo de análisis.

40 Se describe en la presente un método para controlar la precisión de un proceso o método. Preferentemente, dicho proceso o método es un proceso o método de gran productividad. Preferentemente, dicho proceso o método es un proceso o método de análisis de ADN, ADN o ARN genómico. Preferentemente, dicho proceso o método es un proceso o método para el análisis de la metilación. El método de la invención comprende en orden arbitrario lo siguiente:

- 45
- A) El suministro de un conjunto muestras de al menos dos o más muestras biológicas, que comprenden ADN o ARN.
 - B) La asignación de uno o más identificadores para el conjunto de muestras, en donde preferentemente los identificadores son ácidos nucleicos o al menos en parte ácidos nucleicos. De ese modo la muestras del conjunto quedan caracterizadas por un patrón.
 - 55 C) La corrida de un procedimiento experimental, en donde se analizan todas las muestras proporcionadas. Este análisis comprende para cada muestra el análisis de la muestra de ADN o ARN proporcionada, al menos un identificador asignado, o ambos. Preferentemente, este flujo de trabajo permite la detección o cuantificación de la metilación, el identificador, o ambos. Preferentemente, el análisis de la muestra de ADN o ARN y la detección o
 - 60 cuantificación del identificador se realizan simultáneamente.

Un método de la invención es un método para controlar la precisión de un proceso o método, que comprende proporcionar un conjunto de muestras de al menos 2, 3, 4, 100, 200, 400, o 800 muestras biológicas, en donde cada muestra comprende un ácido nucleico;

- aplicar al menos un identificador al conjunto de muestras, en donde al menos un identificador aplicado no interfiere con el análisis posterior, y en donde los identificadores aplicados generan un patrón de identificación a través de las muestras;
- 5 someter cada muestra a una reacción de detección o cuantificación específica para uno o más identificadores aplicados;
- someter cada muestra a análisis;
- deducir la precisión de dicho proceso o método a partir de las señales de los identificadores detectados o cuantificados de las muestras.
- 10 De acuerdo con una modalidad preferida, al menos un identificador se aplica a cada muestra del conjunto de muestras.
- De acuerdo con una modalidad preferida, el método de la invención es un método para controlar la precisión de un proceso o método. Dicho método comprende lo siguiente:
- 15 (A) El suministro de un conjunto de muestras de 2, 3, 4, 10, 30, 60, 100, 200, 400, 800, 1000, 1500, 4000, 10000 o más muestras. De ese modo cada muestra comprende un nucleico ácido que se analiza. Preferentemente, dicho ácido nucleico es ADN o ARN genómico. Por supuesto, y es obvio para aquellos con experiencia en la materia que dicha modalidad se puede aplicar también a procesos o métodos, en donde se analizan proteínas, péptidos, compuestos metabólicos, hormonas, lípidos, células, o combinaciones de estos.
- 20 (B) La aplicación de al menos un identificador para el conjunto de muestras. Preferentemente sólo un identificador se aplica al conjunto de muestra. Preferentemente sólo un único identificador se aplica a cada muestra del conjunto. Preferentemente el número total de identificadores diferentes aplicados es menor que el número total de muestras. Con la máxima preferencia el número total de identificadores diferentes sólo es 2, 3, 4, 5, 6, 7, 8, 9, 10.
- 25 El identificador o identificadores aplicados están caracterizados además porque permiten su posterior análisis y dan lugar a un patrón de identificación de las muestras. Preferentemente, dicho patrón es un patrón espacial o geométrico. Preferentemente, dicho patrón es de cualquier orden abstracto por ejemplo, pero no se limita al orden numérico o alfabético. Preferentemente, cada 2^{da}, 3^{ra}, 4^{ta}, 5^{ta}, 6^{ta}, 7^{ma}, 8^{va}, 9^{na}, 10^{ma}, etc. muestra se codifica por el mismo identificador o grupo de identificadores. Preferentemente, las muestras se colocan en un orden hexagonal y el mismo
- 30 identificador o identificadores se aplican a todas las muestras de una fila o una columna. Preferentemente, las muestras se colocan en un orden radial y el mismo identificador o identificadores se aplican a todas las muestras que tienen la misma distancia a un punto de referencia, por ejemplo, el centro. En una modalidad particular, las muestras se codifican por dos o más grupos de identificadores. Por ejemplo, pero no se limita a, las muestras orientadas hexagonalmente se codifican por dos grupos de identificadores, en donde el primer grupo codifica cada fila y el segundo de los grupos codifica cada columna. Preferentemente, cada fila, columna o ambos se codifican por identificadores, en donde se
- 35 pueden formar los subgrupos del conjunto de muestras, cada muestra de un subgrupo se codifica por una combinación específica de identificadores. Preferentemente uno o más identificadores se aplican al conjunto de muestras, por el cual sólo cada 2^{da}, 3^{ra}, 4^{ta}, 5^{ta}, 6^{ta}, 7^{ma}, 8^{va}, 9^{na}, 10^{ma}, etc. muestra se codifica por uno o más identificadores y todas las otras muestras del conjunto se obtienen sin identificador. De ese modo, de manera correspondiente, se genera un patrón de
- 40 identificación.
- De acuerdo con la invención del método para controlar la precisión de un proceso o método, uno o más identificadores aplicados son identificador(es) como se describió anteriormente en el método para identificar al menos una muestra biológica en el campo de análisis de la metilación.
- 45 (C) El sometimiento de cada muestra a una reacción de detección o cuantificación específica para uno o más identificadores aplicados. De ese modo la reacción de detección o cuantificación es cualquier tipo de reacción de detección o cuantificación. Preferentemente, la reacción de detección o cuantificación es una reacción de detección o cuantificación como se ha descrito anteriormente para el método de identificación de al menos una muestra biológica en el campo de análisis de metilación.
- 50 (D) El sometimiento de cada muestra al análisis. De ese modo cada muestra se analiza mediante cualquier tipo de análisis, proceso o método. Preferentemente, dicho análisis se lleva a cabo como se describió anteriormente en el método para identificar al menos una muestra biológica en el campo de análisis de la metilación. Particularmente se analiza cada muestra con respecto a la metilación de uno o más dinucleótidos CpG.
- 55 (E) La deducción de la corrección del proceso o método a partir de las señales de los identificadores detectados o cuantificados de las muestras.
- 60 De acuerdo con una modalidad preferida, la deducción de la precisión de dicho proceso o método a partir de las señales de los identificadores detectados o cuantificados de las muestras, comprende determinar la presencia de un proceso o método libre de error, en donde dichas señales generan un patrón que se corresponde al patrón de identificación como generado inicialmente mediante la aplicación de los identificadores a las muestras; o determinar la ausencia de un proceso o método libre de error, en donde dichas señales generan un patrón que no se corresponde con el patrón de
- 65 identificación generado inicialmente mediante la aplicación de los identificadores a las muestras.

- En una modalidad preferida, la precisión de dicho proceso o método se deduce a partir de las señales de los identificadores detectados o cuantificados de las muestras. Esta evaluación se logra comparando el patrón de las señales derivadas con el patrón de identificación generado por el identificador o identificadores aplicados. En el caso de que orden o posición geométrica de las muestras respecto una a la otra no se altera durante la corrida del proceso o método, el patrón de las señales se puede comparar directamente con el patrón de identificación original. En el caso de que se ha alterado el orden o posición geométrica de las muestras respecto una a la otra, las alteraciones tienen que ser consideradas en comparación con el patrón de identificación original. La presencia de una corrida precisa del proceso o método, es decir libre de error se deduce, en donde el patrón de las señales es idéntico - ninguna alteración del orden o posiciones de la muestra -, o asemeja - alteración del orden o posiciones de la muestra - el patrón de identificación original. Por otra parte, se deduce la ausencia de una corrida precisa del proceso o método, es decir libre de error, en donde el patrón de las señales no es idéntico - ninguna alteración del orden o posiciones de la muestra -, o no asemeja - alteración del orden o posiciones de la muestra - el patrón de identificación original.
- De acuerdo con una modalidad preferida, el proceso o método es un proceso o método de gran productividad. Preferentemente es un proceso o método en el campo de análisis de la metilación y con la máxima preferencia es un proceso o método de gran productividad en el campo de análisis de la metilación.
- De acuerdo con la invención, dichas modalidades para el control de la precisión de un proceso o método es aplicable para asegurar la calidad o tamizar la precisión de las corridas del proceso con fines de diagnóstico, pronóstico o tamizaje. Entre otras, es particularmente adecuado para el aplicación en laboratorios de referencia.
- Estuche.
- Se describe además un estuche, que comprende un recipiente y uno o más de los siguientes:
 al menos un ácido nucleico que comprende al menos una sección de la secuencia polimórfica;
 al menos un ácido nucleico que comprende al menos una sección de la longitud polimórfica;
 al menos un plásmido que comprende al menos una sección de la secuencia polimórfica;
 al menos un plásmido que comprende al menos una sección de la longitud polimórfica;
 al menos un ácido nucleico que comprende al menos una sección de la secuencia polimórfica y una sección de la longitud polimórfica;
 al menos un oligonucleótido que contiene el sitio de inicio objetivo-específico y al menos una sección de la secuencia polimórfica;
 al menos un oligonucleótido para amplificar al menos una sección de la secuencia de ácido nucleico polimórfico, dicho oligonucleótido comprende ADN y/o análogos de ADN como por ejemplo, pero no se limitan a PNA, LNA, HNA, fosfotioato de ADN, metilfosfonato de ADN;
 al menos un oligonucleótido para amplificar al menos una sección de longitud de ácido nucleico polimórfico, dicho oligonucleótido comprende ADN y/o análogos de ADN como por ejemplo, pero no se limitan a PNA, LNA, HNA, fosfotioato de ADN , metilfosfonato de ADN;
 al menos un ácido nucleico para la hibridación en al menos una sección de la secuencia de ácido nucleico polimórfico;
 al menos un ácido nucleico para la hibridación en al menos una sección de la longitud de ácido nucleico polimórfico;
 al menos un anticuerpo específico para uno seleccionado del grupo que comprende una proteína, un péptido, una etiqueta, un colorante, un sacárido, una hormona, un lípido, una partícula o combinaciones de estos;
 al menos un ácido nucleico que comprende además una proteína, péptido, etiqueta, colorante, sacárido, hormona, lípido, ácido nucleico, etiqueta de masa, partícula o combinaciones de estos; y
 una descripción para llevar a cabo el método de la invención. Preferentemente, un dicho estuche comprende además una descripción para la interpretación de los resultados obtenidos por medio de las modalidades descritas en la presente.
- Un estuche descrito comprende
 al menos un ácido nucleico que comprende al menos una variante de un polimorfismo de secuencia, al menos una variante de un polimorfismo de la longitud, o ambos, y
 al menos un oligonucleótido para la amplificación de al menos una variante de un polimorfismo de secuencia, al menos un oligonucleótido para la amplificación de al menos una variante de polimorfismo de longitud, o ambos. Un estuche particular comprende además al menos un ácido nucleico para la hibridación en al menos una variante de un polimorfismo de secuencia, al menos un ácido nucleico para la hibridación en al menos una variante de un polimorfismo de longitud, o ambos. Preferentemente, dichos oligonucleótidos y/o ácidos nucleicos comprenden ADN y/o análogos de ADN como por ejemplo, pero no se limitan a PNA, LNA, HNA, fosfotioato de ADN, metilfosfonato de ADN.
- Otro estuche descrito comprende
 al menos un ácido nucleico que comprende al menos una variante de un polimorfismo de secuencia, al menos una variante de un polimorfismo de la longitud, o ambos, y
 al menos un ácido nucleico para la hibridación en al menos una variante de un polimorfismo de secuencia, al menos un ácido nucleico menos para la hibridación en al menos una variante de un polimorfismo de la longitud, o ambos. Un estuche particular preferido comprende además al menos un oligonucleótido para amplificar al menos una variante de un polimorfismo de secuencia, al menos un oligonucleótido para amplificar por lo menos una variante de un

polimorfismo de la longitud, o ambos. Preferentemente, dichos oligonucleótidos y/o ácidos nucleicos comprenden ADN y/o análogos de ADN como por ejemplo, pero no se limitan a PNA, LNA, HNA, fosfotioato de ADN, metilfosfonato de ADN.

5 Para dichos estuches descritos, se prefiere además que al menos dicho ácido nucleico que es uno o más plásmidos o se deriva de uno o más plásmidos. Como consecuencia, preferentemente, dichos oligonucleótidos son capaces de amplificar al menos un ácido nucleico. Preferentemente además, dichos ácidos nucleicos son variantes de un polimorfismo, por el cual cada variante es un identificador.

10 Otro estuche descrito comprende un conjunto de partículas, por el cual cada parte del conjunto comprende al menos una partícula de al menos un tamaño, y por el cual uno o más partículas de diferentes partes son de diferentes tamaños.

15 Otro estuche descrito comprende un conjunto de colorantes, por el cual cada parte del conjunto comprende al menos un colorante de al menos un color, y por el cual uno o más colores de diferentes partes son de diferentes colores.

20 Otro estuche descrito comprende un conjunto de anticuerpos y epítomos correspondientes, por el cual cada parte del conjunto comprende al menos un epítomo que se detecta por al menos un anticuerpo definido, y por el cual uno o más epítomos de las diferentes partes se detectan por diferentes anticuerpos.

25 Un estuche descrito es un estuche para la identificación de una muestra biológica, en donde la muestra comprende el ADN genómico diferencialmente metilado al menos en una posición. Preferentemente, un estuche de este tipo se usa en el campo de análisis de la metilación.

Particularmente, un estuche de este tipo se usa para la detección de intercambio de la muestra, contaminación cruzada, o ambos.

30 Particularmente un estuche de este tipo se usa para la identificación de una muestra en un conjunto de muestra mezclada.

Particularmente un estuche de este tipo se usa para la detección de una inhibición de la amplificación.

35 Particularmente, un estuche de este tipo se usa para la determinación de la velocidad de conversión de ADN.

Particularmente, un estuche de este tipo se usa para la normalización de una muestra, calibración de una muestra, o ambos.

40 Particularmente, un estuche de este tipo se usa para la identificación de una contaminación por arrastre.

Particularmente, un estuche de este tipo se usa para la evaluación del éxito de una etapa de hibridación.

45 Uso de un método o un estuche de la invención.

Los métodos descritos en la presente se usan preferentemente para el análisis de al menos un estado de la metilación del ADN, al menos un nivel de metilación del ADN, o al menos un patrón de metilación del ADN. Por supuesto, se prefieren además las combinaciones de los citados.

50 Preferentemente, las modalidades descritas en la presente se usan para al menos uno seleccionado del grupo que comprende la detección del intercambio de muestra; detección de la contaminación cruzada; identificación de una muestra en un conjunto de muestras mezcladas; detección de inhibición de la amplificación; determinación de la velocidad de conversión del ADN; normalización de una muestra; calibración de una muestra; identificación de la contaminación por arrastre, evaluación del éxito de una etapa de hibridación o combinaciones de estos.

55 Un método de acuerdo con la invención se puede usar para al menos uno de los siguientes con respecto a un diagnóstico de una enfermedad individual o del paciente, pronóstico de una enfermedad, predicción de una respuesta al tratamiento, diagnóstico de una predisposición para una enfermedad, diagnóstico de la progresión de una enfermedad, evaluación de una enfermedad, estadificación de una enfermedad, clasificación de una enfermedad, caracterización de una enfermedad, o combinaciones de estos, en donde la enfermedad es una enfermedad saludable o un evento adverso, el evento adverso comprende al menos una categoría seleccionada del grupo que comprende: interacciones no deseadas del fármaco; enfermedades de cáncer, enfermedades proliferativas o enfermedades asociadas con estas; mal funcionamiento del CNS; daño o enfermedad; síntomas de agresión o alteraciones del comportamiento; clínica; consecuencias psicológicas y sociales de los daños cerebrales; alteraciones de la personalidad y trastornos psicóticos; 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 del desarrollo; mal funcionamiento, daño o enfermedad de la piel, de los músculos, del tejido conjuntivo o de los huesos; mal funcionamiento endocrino y/o metabólico, daño o enfermedad; y dolores de cabeza o mal funcionamiento sexual.

5 Por otra parte, se describe un método que se usa preferentemente para distinguir tipos de células o tejidos, o para la investigación de la diferenciación celular.

Definiciones.

10 En aspectos particulares, el término "identificador" se refiere a, pero no se limita a, una molécula que tiene propiedades químicas, físicas, o biológicas únicas, cuando se compara con otras moléculas. Se refiere además a una molécula que es inequívocamente asignada a una muestra. De acuerdo con la invención, el término "identificador" se refiere a una molécula que es al menos en partes un ácido nucleico o un análogo de ácido nucleico.

15 En aspectos particulares, el término "variantes de polimorfismo" o "polimorfismo" se refiere a, pero no se limita a, uno de dos o más formas alternativas o alelos de ácidos nucleicos o partes de ácidos nucleicos que difieren en la secuencia de nucleótidos o tienen un número variable de nucleótidos, particularmente de nucleótidos repetidos. De acuerdo con la invención, esto se refiere preferentemente a la secuencia (polimorfismo de nucleótido simple, polimorfismo de secuencia) o a la longitud (polimorfismo de longitud, polimorfismo de delección).

20 En aspectos particulares, el término "estado de metilación" se refiere a, pero no se limita a, la presencia o ausencia de metilación de un nucleótido simple en una única molécula de ADN, dichos nucleótidos que sean capaces de ser metilados.

25 En aspectos particulares, el término "nivel de metilación" se refiere a, pero no se limita a, la ocupación de metilación promedio en un nucleótido simple en una pluralidad de moléculas de ADN, dichos nucleótidos que sean capaces de ser metilados.

30 En aspectos particulares, el término "patrón de metilación" se refiere a, pero no se limita a, el estado de metilación de una serie de nucleótidos situados en cis en una única molécula de ADN, dichos nucleótidos que sean capaces de ser metilados.

35 En aspectos particulares, el término "muestra remota" incluye, pero no se limita a, una muestra que tiene ADN genómico, en donde la muestra se toma a partir de un sitio (por ejemplo, órgano, tejido, fluido corporal, grupo de células, célula, etc.) que es remota con respecto a o que es distinta del sitio de la célula, grupo de células, tejido u órgano a partir del cual se originó dicho ADN genómico.

40 En aspectos particulares, el término "contaminación cruzada" se refiere a, pero no se limita a, una adición no deseada de uno o más componentes de una muestra a otra muestra. De ese modo las dos muestras se recogen, procesan, y/o analizan al menos en partes en paralelo por ejemplo, pero no se limitan, como muestras del mismo conjunto de muestras

45 En aspectos particulares, el término "contaminación por arrastre" se refiere a, pero no se limita a, una adición no deseada de uno o más componentes de una muestra a otra muestra. De ese modo las dos muestras se recogen, procesan, y/o analizan al menos en partes una después de la otra por ejemplo, pero no se limitan, como muestras de conjuntos de muestras diferentes.

50 En aspectos particulares, el término "procedimiento experimental" se refiere a, pero no se limita a, cualquier combinación de reacciones químicas, biológicas o físicas.

55 En aspectos particulares, el término "diferenciales metilados" se refiere a, pero no se limita a, un estado de una base de un nucleótido, el nucleótido siendo parte de un ácido nucleico, preferentemente de un ADN, particularmente, de un ADN genómico. De ese modo dicho estado se caracteriza en que la base correspondiente es metilada o no metilada. Preferentemente, la metilación o no metilación es característica de un individuo, la muestra correspondiente se toma a partir de, su estado de salud, el momento en que se toma la muestra, o combinaciones de estos.

Ejemplos

60 Ejemplo 1: Fragmentos específicos de planta para la identificación de la contaminación de la muestra y equivocación de la muestra durante el análisis de metilación del ADN

65 El gen celulosa sintetasa de *Arabidopsis thaliana* (sec. con núm. de ident.: 1) At1g55850 se chequeó para homologías de secuencias con el genoma humano usando una búsqueda de BLAST (<http://Avww.ncbi.nlm.nih.gov/BLAST/Blast.cgi>). Se diseñaron los iniciadores que permiten la amplificación de fragmentos de diferentes longitudes mediante la combinación del iniciador 1 con el iniciador 2; iniciador 1 con el iniciador 3; iniciador 1 con el iniciador 4; iniciador 1 con

el iniciador 5; iniciador 1 con el iniciador 6; iniciador 1 con el iniciador 7; iniciador 1 con el iniciador 8 y el iniciador 1 con el iniciador 9. Las combinaciones se resumen en la Tabla 2.

5 Tabla 2 Iniciador específico de planta diseñado

Nombre	Secuencia.	tamaño resultante de fragmento
Iniciador 1 Sec. con núm. ident.: 2	5'ccgctgcttactgtcttcc3'	
Iniciador 2 Sec. con núm. ident.: 3	5'acagcttagccacctctca3'	66 pb
Iniciador 3 Sec. con núm. ident.: 4	5'ctccggtattgtcccagt3'	122 pb
Iniciador 4 Sec. con núm. ident.: 5	5'agcatcccactgtgaaaacc3'	167 pb
Iniciador 5 Sec. con núm. ident.: 6	5'atggtccatggtttctcg3'	196 pb
Iniciador 6 Sec. con núm. ident.: 7	5'ttcccttcttccatctacca3'	229 pb
Iniciador 7 Sec. con núm. ident.: 8	5'ttttcttgataaatacaccaacg3'	271 pb
Iniciador 8 Sec. con núm. ident.: 9	5'cattgctccagcctgaagt3'	311 pb
Iniciador 9 Sec. con núm. ident.: 10	5'ccaagtttagtatgattttccaca3'	369 pb

Adicionalmente, se diseñaron 8 dominios diferentes, que contienen un sitio de unión al oligonucleótido libre de citosina (subrayado en la Tabla 3), un sitio de reconocimiento para *Sca I* (subrayado y en negrita en la Tabla 3), un sitio de corte para *Swa I* (en negrita en la Tabla 3) y un único sitio de identificación (doble subrayado en la Tabla 3). pGem tiene un sitio de corte único para *Sca I*. En ese sentido, el éxito de la clonación con un fragmento que contiene un sitio único para *Sca I* se puede reconocer por análisis en gel después de un tratamiento con *Sca I*. El sitio de corte de *Swa I* es estable durante el tratamiento con bisulfito y se puede usar para destruir las contaminaciones del PCR con bisulfito.

Tabla 3 Dominio iniciador

5

Nombre	Secuencia.	tamaño del fragmento
dominio-iniciador 1 sec. con núm. de ident.: 11	<u>5'GTGATGTGAGTTAATGATGGG</u> <u>cgcgctgctactgtctcc3'</u>	
dominio-iniciador 2 sec. con núm. de ident.: 12	<u>5'CCCTAACCTTAACATCTTCCAAGTACTATTTAAATAACCATAC</u> <u>TATACCAAATAATCACAGCTTAGCCACCTCCTCA3'</u>	66 pb
dominio-iniciador 3 sec. con núm. de ident.: 13	<u>5'AACCTTACTTTACCATACTCTAGTACTATTTAAATAACCATAC</u> <u>TATACCAAATAATCctcgggtattcgtcccagt3'</u>	122 pb
dominio-iniciador 4 sec. con núm. de ident.: 14	<u>5'ATATAATCCAATAACCCCAAGTACTATTTAAATAACCATACT</u> <u>ATACCAAATAATCagcatcccactgtgaaaacc3'</u>	167 pb
dominio-iniciador 5 sec. con núm. de ident.: 15	<u>5'CACACCACCCAAAAACTAGTACTATTTAAATAACCATACTATA</u> <u>CAAAATAATCataattccataatttctca3'</u>	196 pb
dominio-iniciador 6 sec. con núm. de ident.: 16	<u>5'CACAATTACACATCCCAATAAACTTAGTACTATTTAAATAACC</u> <u>ATACTATACCAAATAATCttccctctcttccatctacca3'</u>	229 pb
dominio-iniciador 7 sec. con núm. de ident.: 17	<u>5'CCCCACAATCAAACATACCATAGTACTATTTAAATAACCATAC</u> <u>TATACCAAATAATCttttctctgataaaatacaccacg3'</u>	271 pb
dominio-iniciador 8 sec. con núm. de ident.: 18	<u>5'TACAATCCAACCTTAAAACCACTCAGTACTATTTAAATAACCAT</u> <u>ACTATACCAAATAATCcattgctccagccttgaagt3'</u>	311 pb
dominio-iniciador 9 sec. con núm. de ident.: 19	<u>5'CTCAACTCAATAAACCTTTACACAGTACTATTTAAATAACCAT</u> <u>ACTATACCAAATAATCccaagtttagtatgatttcccaca3'</u>	369 pb

45

50

55

60

65

Fragmentos específicos de plantas se generarán por el uso de las siguientes combinaciones de iniciadores: dominio-iniciador 1 + dominio-iniciador 2; dominio-iniciador 1 + dominio-iniciador 3; dominio-iniciador 1 + dominio-iniciador 4; dominio-iniciador 1 + dominio-iniciador 5; dominio-iniciador 1 + dominio-iniciador 6; dominio-iniciador 1 + dominio-iniciador 7; dominio-iniciador 1 + dominio-iniciador 8 y dominio-iniciador 1 + dominio-iniciador 9. La reacción en cadena de la polimerasa se realizará en un volumen total de 25 µl que contiene 10 ng de ADN de *Arabidopsis thaliana*, 1 U Hotstart de Taq polimerasa (Qiagen), 10 pmol de cada iniciador directo e inverso, 1x tampón de PCR (Qiagen) y 0.2 mmol/l de cada dNTP (MBI Fermentas). El ciclado se realizará usando un termociclador (Eppendorf) bajo las siguientes condiciones: 15 min a 95 °C y 15 ciclos a 95 °C durante 1 min, 60 °C durante 45 seg y 72 °C durante 1:30 min y 30 ciclos a 95 °C durante 1 min, 72 °C durante 1:30 min. 10 µl de la mezcla de PCR se cargará en un gel de agarosa a 2.5 % y los fragmentos de tamaño esperado se cortarán del gel, purificarán usando un estuche de extracción en gel (Qiagen) y usarán para el clonaje-TA (Promega). El éxito de la clonación en un vector pGEM se verificará con el tratamiento de *Sca I* y secuenciación. En este sentido, se crearán 8 plásmidos identificadores diferentes que contiene un polimorfismo de secuencia y un polimorfismo de longitud.

2000 copias de dos plásmidos diferentes se añadirán a cada muestra y se realizarán la desparafinación, extracción de ADN y tratamiento con bisulfito junto con la muestra analizada. Después del iniciador independiente del tratamiento con bisulfito se usará para analizar la identidad de las muestras usando los siguientes iniciadores: iniciador-CF 1 (sec. con núm. de ident.: 20) GTGATGTGAGTTAATGATGGG y iniciador-CF 2 (sec. con núm. de ident.: 21) AACCATACTATACCAAATAATC. La reacción en cadena de la polimerasa se realizará en un volumen total de 25 µl que contiene 5 µl de eluato bisulfito, 1 U Hotstart de Taq polimerasa (Qiagen), 10 pmol de cada iniciador directo y

reverso, 1x tampón de PCR (Qiagen) y 0.2 mmol/l de cada dNTP (MBI Fermentas). El ciclado se realizará usando un termociclador (Eppendorf) bajo las siguientes condiciones: 15 min a 95 °C y 45 ciclos a 95 °C durante 1 min, y 55 °C durante 45 seg y 72 °C durante 1:30 min. 5 µl de mezcla de PCR se cargará en un gel de agarosa a 2.5 % y la identidad de la muestra se analizará mediante el tamaño del fragmento (por ejemplo 66 pb y 311 pb) después de la electroforesis en gel. La contaminación de la muestra con productos de PCR se puede identificar por las bandas adicionales en el gel de agarosa (por ejemplo 66 pb; 122 pb y 311 pb). Después del tratamiento con bisulfito se analizará la metilación de la muestra en una reacción de duplex usando los siguientes iniciadores.

APC-F (sec. con núm. de ident.: 22) Cy5-GGAGAGAGAAGTAGTTGTGTAATT y

APC-R (sec. con núm. de ident.: 23) ACTACACCAATACAACCACATATC;

ID-iniciador 1 (sec. con núm. de ident.: 24) Cy5-tgtTttgattTgtTggTtga y

ID-iniciador 2 (sec. con núm. de ident.: 25) ccaacAcAttAAAaActctcc.

Cada letra mayúscula representa una C convertida; sólo se amplificará completo el ADN convertido. La reacción en cadena de la polimerasa se realizará en un volumen total de 25 µl que contiene 5 µl de eluato bisulfito, 1 U Hotstart de Taq polimerasa (Qiagen), 5 pmol de cada iniciador directo y reverso, 1x tampón de PCR (Qiagen) y 0.3 mmol/l de cada dNTP (MBI Fermentas). El ciclado se realizará usando un termociclador (Eppendorf) bajo las siguientes condiciones: 15 min a 95 °C y 45 ciclos a 95 °C durante 1 min, y 55 °C durante 45 seg y 72 °C durante 1:30 min.

La conversión con bisulfito e identificación de la muestra se analizará en un micromatriz usando sondas 1 a 8:

sonda 1 (sec. con núm. de ident.: 26) NH2-TGGAAGATGTTAAGGTTAGGG;

sonda 2 (sec. con núm. de ident.: 27) NH2-AGAGTATGGTAAAGTAAGGTT;

sonda 3 (sec. con núm. de ident.: 28) NH2-TGGGGGTTATTGGATTATAT;

sonda 4 (sec. con núm. de ident.: 29) NH2-AGTTTTTGGGTGGTGTG;

sonda 5 (sec. con núm. de ident.: 30) NH2-AAGTTTATTGGGATGTGTAATTGTG;

sonda 6 (sec. con núm. de ident.: 31) NH2-ATGGTATGTTTATTGGGGG;

sonda 7 (sec. con núm. de ident.: 32) NH2-GAGTGGTTTTAAGTTGGATTGTA;

sonda 8 (sec. con núm. de ident.: 33) NH2-GAGTGGTTTTAAGTTGGATTGTA;

sonda 9 (sec. con núm. de ident.: 34) NH2-GTGTAAGGTTTTATTGAGTTGAG.

Las hibridaciones se llevan a cabo de acuerdo con los procedimientos estándar. Figura 4 muestra dibujos esquemáticos de una hibridación tales. En A se muestra la orientación de la sonda en la matriz. B y C muestran las hibridaciones de muestras. En B se usan dos plásmidos que se generan por el dominio iniciador 1 + dominio iniciador 2 y dominio iniciador 1 + dominio iniciador 3. En C se usan dos plásmidos que se generan por el dominio iniciador 1 + dominio iniciador 2 y dominio iniciador 1 + dominio iniciador 4. Las sondas 1 a 8 se hibridan con solamente un plásmido de identificación molecular. La sonda 9 se hibrida con todos los plásmidos.

En la Figura 5 se visualiza la detección de una contaminación. Figura 5 muestra un dibujo esquemático de una micromatriz de hibridación detectando una contaminación de la muestra. Se usó una combinación de dos plásmidos.

El sistema es capaz de generar 28 combinaciones diferentes de dos plásmidos diferentes. En ese sentido, se permite tanto la identificación de la muestra como la contaminación.

El gen de la sintetasa celulosa de *Arabidopsis thaliana* (sec. con núm. de ident.: 1) At1g55850

5 5'-ctctatccctctcacctctcacttggcaccgttgcagagagagaaccaaacatggtaaacaagacgaccggattagaccggttcatg
 aagccgacggtagaacggcttttgagactaggagaagaaccggtagagtgattgogtaccggttttctcagcctcggtttcgtgtatctgtt
 gatttggttctacagaattggtagattggtagataaccgtaccgttttagatcgattaactggtttgatgtttattgtggagatttggttcggttatatt
 10 gggtagtcacacaatctccgggtggaatccggttggcgatttccctctcggatagactcctcggagatacggaaagcgaacctccgaggct
 cgacgtcttctgttgcacggcggatccggtagtgagccgctgttgggtgtaaacacagctcttctgtgacggctcttgactaccaccgg
 agaaactcgcctttatctcagatgacgggtgctgagctgacgttctatgctctcaccggaggcagctgagttgctaaaactgggttccctt
 15 ctgcaagaagtcaacgttagccaacatctccgctgcttactgtctccaaggcaaaactgtctgattctcggctgaggagggtggctaagc
 tgtatagagaaatggcggcgaggattgaaacggcggcgagactgggacgaataccggaggaggcggggtgaagtacggtagcgggt
 tttcacagtgggatgctgacgctactcgaagaaccatggaaccattctcaagtttggtagatggaagagaagggaatacaatagcaata
 20 ccaacgttgggtgattatcaagagaaaagagacctcaacatcatcataactcaaggctggagcaatgaacgcattgctgagggttctcga
 aaattacttggggaaaatcatactaaactggactgtgatgtacgcaaaactcaaagtcaacacgcgacgcgctctgcatcctcctcg
 atgagaaaaggggaaaagagattgcttctgagcttccgagcttggtaacaatgltacaagaaatgattgtatggaagcatgatgaggt
 25 aggaattgatgtggaattctggattggatggaaatgggtgcttatacattggaactggatgcttccagagaagagatgtagctgtggaag
 aaagtatggagaggaagaagaagaagaagaatctgagagaattcacgaaaatttagagcctgagatgaitaaggctctcgcgagctgca
 ctatgaggaaaacactcaatggggaaaggagatgggtgtgaaataggttcccggtagaggatgtaataactggttgacgattcagtgct
 30 gcggtatggaaatcagcctacctgaaccggaaaagcaagcatttctggggtagcgcgaccatttgcataaatgctagtgcagcaga
 ggagatggtcagagggagacttccagattatgcttcaagtagtccggttggtaggaaaaggaaagatcagtttaggactgatacttgg
 tactgttgcattgtcttggctccactctcactaccgtgctcatttactctgtttgactctctgtcttcaaaggcattcctctgtttcaaaggct
 35 cgagctcgtggttattccggttggatagctcactgttgcagctaccgcalatagcctagccgagttcttggg'gocggaggacgttccgtggat
 ggtggaacgagcaaaaggtatgtgcttataagaagaacaagctcgttctttcggatattatggaca cgattaagaagclactggagttctgag
 tctgcttgtgatcacagcaaaagtagcagaagaagaagcagcagagagatacaagggaagaggtaatggagttggagtgaggctcc
 40 catgttctcgtcctcggaaactcggtagtctcaatctctctcgtcgcgagcgggttgcgagactgttccggagacgggtggagattgaaa
 acaatggggatgcaattgtgataacaggagtactagttgcataaactggcctctgtataaaggtagttgttgaggcaagacaaggaaag
 atgccaatgagcgttacagttaaatcagttgtagcttctctcgtcctgacctgttagcgttttgaagattgattaacaacagtcaaaaagta
 45 atcaaaaataatgaccagcagttataatgtaatttct-3'

Ejemplo 2: Análisis múltiple de metilación del ADN mediante el uso de iniciadores de dominio con identificadores moleculares.

Dos muestras se mezclan con iniciadores-libre de citosina (200 pmol cada uno) que contienen un dominio de identificación molecular. Cada muestra se mezcla con un conjunto diferente de iniciadores.

Conjunto iniciador 1:

conjunto 1F (sec. con núm. de ident.: 35) 5'TGATGGGAGAGTGAGTAGGA3';

conjunto 1R (sec. con núm. de ident.: 36) 5'TGGAAGATGTAAAGGTTAGGGTCACTTCTAACTCTACCACTTA3';

Conjunto iniciador 2:

conjunto 2F (sec. con núm. de ident.: 37) 5'TGATGGGAGAGTGAGTAGGA3';

conjunto 2R (sec. con núm. de ident.: 38) 5'AGAGTATGGTAAAGTAAAGTTTCACTTCTAACTCTACCACTTA3':

Después del tratamiento de bisulfito con el estuche EpiTect (Qiagen) las muestras se amplificaron como sigue: la reacción en cadena de la polimerasa se realiza en un volumen total de 25 µl que contiene 5 µl de eluato de bisulfito, 1 U de Taq polimerasa Hotstart (Qiagen), tampón 1x PCR (Qiagen) y 0.2 mmol/l cada dNTP (MBI Fermentas). El ciclo se realiza usando un termociclador (Eppendorf) bajo las siguientes condiciones: 15 min a 95 °C y 45 ciclos a 95 °C durante

1 min, y 55 °C durante 45 seg y 72 °C durante 1:30 min. Las mezclas de amplificación se mezclan y se hibridan simultáneamente en un micromatriz con las siguientes sondas de captura y las siguientes sondas de detección:

5 sonda de captura 1 (sec. con núm. de ident.: 39) NH2-CCCTAACCTTAACATCTTCCA;
 sonda de captura 2 (sec. con núm. de ident.: 40) NH2-AACCTTACTTTACCATACTCT;
 (sonda de captura 1 y sonda de captura 2 son capaces de hibridar en la parte subrayada del conjunto1R y conjunto2R de iniciadores, respectivamente.)

10 sonda de detección 1 (sec. con núm. de ident.: 41)
 Cy5-TAGAAAGTTTACGGTATTTTAAT (detección en caso de metilación);

sonda de detección 2 (sec. con núm. de ident.: 42)
 Cy3-TAGAAAGTTTATGGTATTTTAAT (detección en caso de no metilación).

15 La metilación de cada muestra se puede calcular por la relación de señal de Cy5/Cy3 en la mancha de captura específica. En este sentido, múltiples muestras se pueden analizar en paralelo.

Ejemplo 3: Realización de un flujo de trabajo de detección de metilación usando un plásmido identificación molecular como el control de la hibridación

20 Se generaron dos plásmidos de identificación molecular (denominado 23 y 195). Por lo tanto los dos pares de oligonucleótidos 23sens (sec. con núm. de ident.: 43) AGTACTTGATTTGAATTGTTTTTTTGA / 23anti (sec. con núm. de ident.: 44) CAAAAAACAATTCAAATACAAGTACTA y 195sens (sec. con núm. de ident.: 45) AGTACTGTATTTGGTTGGAGTGGGGA / 195anti (sec. con núm. de ident.: 46) CCCCACTCCAACCAATACAGTACTA se clonaron en el vector pGem®-T, respectivamente. Dichos dos pares de oligonucleótidos son específicos para los oligonucleótidos de un tubo de matriz (ver más abajo). Los plásmidos se aislaron a partir de bacterias transformadas usando un estuche QIAprep Spin Miniprep (Qiagen). 500 ng de ADN de plásmido se linealizó a 37 °C en 20 µl de agua que contiene 5 U de la enzima de restricción Bfu I y tampón 1x NEB 4 (ambos de New England Biolabs). La reacción se detuvo a 80 °C durante 20 min. Los clones se purificaron usando el estuche de purificación-PCR (Qiagen). 100 fg de ADN de plásmido en 5 ng/µl de solución de poli-A (Roche) en un volumen total de 27 µl se trataron con bisulfito usando el estuche EpiTect (Qiagen). El ADN con bisulfito se amplificó usando los siguientes iniciadores MIDBis-1F (sec. con núm. de ident.: 47) TGTGGAATTGTGAGtGGATA y MIDBis-1R (sec. con núm. de ident.: 48) aCATaCTCCaCCaCCATa que son específicos para las secuencias del vector pGem-T. Por lo tanto se aplicaron las siguientes condiciones: volumen total 25 µl; mezcla maestra 1x QIA mPCR MM (Qiagen) 0.2 µmol/l de cada iniciador; activación 95 °C durante 15 min; desnaturalización a 95 °C durante 30 seg; hibridación a 61 °C durante 45 seg; extensión a 72 °C durante 1 min. Las etapas de 2 -4 se repitieron 40 veces. Por último se realizó una extensión a 72° durante 10 min. PCRs se analizaron en un gel de agarosa y posteriormente se usaron para la hibridación. La Figura 6 muestra amplificados del plásmido tratado con bisulfito linealizado 23 y el plásmido tratado con bisulfito linealizado 195, respectivamente.

40 La hibridación se realizó en tubos de matriz proporcionados por Clondiag Chip Technologies GmbH. Estos tubos contienen una micromatriz de baja densidad con sondas de captura para la hibridación específica de la metilación. Los tubos de matriz se prehibridaron con 200 µl de tampón de hibridación (2xSSPE; tritón al 0.005 %) a 30 °C durante 5 min. Cada producto de PCR se diluyó de 1 a 100 en tampón de hibridación y desnaturalizó durante 10 min a 99 °C antes de la hibridación. Las hibridaciones se realizaron durante 1h 10 min en un volumen total de 100 µl a 35 °C. Los tubos de la matriz se lavaron tres veces con tampón de lavado (2xSSC) a 20 °C durante 5 min. Posteriormente, los tubos de matriz se bloquearon con la solución de bloqueo (Pierce) y se incubaron con la solución de conjugado (conjugado de poliestreptavidina peroxidasa de rábano picante en tampón 2xSSPE/tritón al 0.005 %) durante 30 min a 30 °C. Los tubos de la matriz se lavaron tres veces con tampón de lavado a 20 °C durante 5 min. 100 µl de sustrato azul verdadero se añadieron (Pierce) en cada tubo, antes los tubos se escanearon en un escáner de ATS (Clondiag Chip Technologies). Los resultados se muestran en la Figura 7. Los amplificados de cada uno de los dos plásmidos de identificación molecular hibridan específicamente dos oligonucleótidos del tubo de matriz (manchas oscuras marcadas por cuadrantes). Las manchas oscuras en la esquina de la imagen muestran las manchas de control necesarias para escanear los tubos de la matriz. Las manchas claras representan la hibridación inespecífica.

55 Ejemplo 4: Control de la precisión de un análisis por PCR en tiempo real

16 muestras diferentes se miden por triplicado en un PCR en tiempo real.

60 (A) Las muestras se numeran de 1 a 16. Cuatro identificadores diferentes se usan para codificar las muestras. De ese modo cada muestra 4^{ta} incluye el mismo identificador:

65

ES 2 546 848 T3

Número de la muestra	identificador añadido
1, 5, 9, 13	Identificador W
2, 6, 10, 14	Identificador X
3, 7, 11, 15	Identificador Y
4, 8, 12, 16	Identificador Z

Las muestras con identificadores añadidos se someten al análisis de PCR en tiempo real, en donde se determina un polimorfismo de un sitio intrínseco del ADN muestra, así como la identidad del identificador. De acuerdo con el análisis de PCR en tiempo real de las muestras 1^{ra}, 2^{da}, 3^{ra}, ..., 16^{ta} comprenden el siguiente identificador:

1^o réplica

Muestra	Identificador identificado
2 ^o 5 ^o , 9 ^o , 13 ^o	Identificador W
1 ^o , 6 ^o , 10 ^o , 14 ^o	Identificador X
3 ^o , 7 ^o , 11 ^o , 15 ^o	Identificador Y
4 ^o , 8 ^o , 12 ^o , 16 ^o	Identificador Z

2^o réplica

Muestra	Identificador identificado
2 ^o , 5 ^o , 9 ^o , 13 ^o	Identificador W
1 ^o , 6 ^o , 10 ^o , 14 ^o	Identificador X
3 ^o , 7 ^o , 11 ^o , 15 ^o	Identificador Y
4 ^o , 8 ^o , 12 ^o , 16 ^o	Identificador Z

3^o réplica

Muestra	Identificador identificado
2 ^o , 5 ^o , 9 ^o , 13 ^o	Identificador W
1 ^o , 6 ^o , 10 ^o , 14 ^o	Identificador X
3 ^o , 7 ^o , 11 ^o , 15 ^o , 16 ^o	Identificador Y
4 ^o , 8 ^o , 12 ^o , 16 ^o	Identificador Z

A partir de esto se convierte en obvio de que dos errores ocurrieron debido a cambios inesperados en el orden de los identificadores identificados. Un intercambio de muestra entre las muestras 1 y 2 tuvo lugar antes de que las muestras se dividieran en triplicado. Adicionalmente, es obvio que muestra 16 presentó una contaminación cruzada, ya sea con la muestra 3, 7, 11, 15 o combinaciones de estos durante la corrida de la 3^{ra} réplica.

(B) Alternativamente, las muestras (números 1-16) se ordenaron en un cierto orden en una placa de microtitulación. Tres identificadores diferentes se usan para codificar las muestras. De ese modo cada 3^{ra} muestra del conjunto incluye el mismo identificador:

Número de la muestra	identificador añadido
1, 4, 7, 10, 13, 16	Identificador X
2, 5, 8, 11, 14	Identificador Y
3, 6, 9, 12, 15	Identificador Z

La Figura 8 (a) da una vista general esquemática sobre el patrón de identificador generado.

Las muestras con identificadores añadidos se someten al análisis de PCR en tiempo real, en donde se determina un polimorfismo de un sitio intrínseco del ADN muestra, así como la identidad del identificador. La Figura 8 (b) muestra una vista general esquemática de los resultados de la determinación de la identidad del identificador, cada resultado se asigna a la posición de la muestra en la placa de microtitulación. Debido a que el patrón del identificador está en un orden inesperado, se detecta fácilmente un error. Es obvio que se cambian las muestras 5 y 6 en la primera réplica (posiciones B2 y B3), y las muestras 12 y 13 en la tercera réplica (posiciones D11 y E9). Aun si la identificación de una muestra individual no se salva 100 % (por ejemplo, un cambio de muestra 1 y 3 no se pueden detectar en este ejemplo) se reconocerá casi todo el proceso.

Listado de secuencias

Listado de secuencias

<110> Epigenomics AG

<120> UN MÉTODO PARA IDENTIFICAR UNA MUESTRA BIOLÓGICA PARA EL ANÁLISIS DE LA METILACIÓN

<160> 42

<210> 1

<211> 2309

<212> ADN

<213> Homo Sapiens

<400> 1

```

ctcttatccc tctcaccttc tcacttggca ccggttcaga gagagaacca aacatggtaa      60
acaaagacqa ccggattaga ccggttcatg aagccgacgg tgaaccgctt tttagacta      120
ggagaagaac cggtagagtg attgcgtacc ggtttttctc agcctcgggt ttctgtgtga      180
tctgtttgat ttggtctac agaattgggt agattgggtg taaccgtacc gtttagatc      240
gattaatctg gtttgttatg tttattgtgg agatttgggt cggtttatat tgggtagtca      300
cacaatcttc ccggtggaat ccggtttggc gatttccctt ctccgataga ctctctcgga      360
gatacggaaq cgaacctccg aggctcgagc tcttcggttg cacggcggat ccggtgattg      420
ägccgcögtf gfttgggtgä aäcacagtct taccgtgac ggctcttgac taöccäccgg      480
agaaactcgc cgtttatctc tcagatgacg gtggctctga gctgacgttc tatgctctca      540
cöqagggcagc tgaqtttgcct aaaacttggg ttccctctcg caagaagtcc aacgttgagc      600
cääcätctcc cöctcgttac ttgtcttcca agqcaaactg tcttqattct qcöqctqaqg      660
agggtggctaa gctgfataga gaäatggcgg cöggaggattgä aacggcggcg ägäctgggäc      720
qaätaccqga qqagggcggg gtgaagtacg gtgacgggtt ttcacagtgg gatgctgacg      780
ctactcqaäq äääccatqgä accattcttc aaqt:ttqqt aqatqqaqä qaaqqqäata      840
caatagcäaf accaacgffg gtgtatttat cäägagaäaa gägaöctcää äatcäfcata      900
acttcäaqgc tqgaqcaatg aacgcattgc tgagggttcc ttcgaaaatt acttqtggga      960
aaatcatact aääcttggac tgtgatatgt äcgcääacaa ctcääagtca acacöcgäcö      1020
cgctctgcat cctcctcgat gagaaagagg gaaaagagat tgctttcgtg cagtttccgc      1080
aqtgttttqa caatgttaca agaaatgatt tgtatggag catgatgca qtagqaattg      1140
afgtggaajt tcttggattg gatggaaatg gtgg:ccgtt atacattgga äctggatgct      1200
ttcacagaag agatgtgatc tgtggaagaa agtatggaga ggaagaagaa qaagaagaat      1260
ctqaqqaat tcacgaaaat tttagacctg agatgattaa ggctctcgcq agctgcactt      1320
atgäggäaaa cactcaatgg ggaagggagä tgggtgtgaa ätatggttgc cöggfagagg      1380
atgtaataac tggtttgacg attcagtgtc gccgatggaa atcagcctac ctgaaccögg      1440
aaaagcaaqc atttctcggg gttagcgcga ccaatttgca tcaaatgcta qtgcagcaga      1500
ggagätggfc agagggagac ttccagatta tgctttcgaä gtatagfcöc gtttggtafg      1560
gaaaaggaaa gatcagttta ggactgatac ttggttactg ttgctattgt ctttgggctc      1620
cattctcact äcctgtgctc atttactctg ttttqacttc tctctgtctc ttcaaaggca      1680
ttcctctggt tccaaaggte tcgagctcgt ggtttattcc gtttggatac gtoactggtg      1740
cagctaccgc atatagccta gccgagttct tgtggtgcgg agggacgttc cgtggatggt      1800
qqäaccgaqca aaggatgtgg ctttatagaa gaacaagctc gttcttttc qqatttatgg      1860
äcacgätfaa gaagctactt ggagtttctg agtctgcgtt tgtgatcaca gcaaaagtäg      1920
cagaagaaga agcagcagag agatacaagg aagagtaat ggagtttggä gtggagtctc      1980
ccatgtttct cgtcctcggä acactcggta tgcctaatct ctctgcttc gccgcägcgg      2040
ttgcgagact tgtttccggä gacggtgag atttqaaaac aatggggatg caatttgtgä      2100
taacaggagt actagtgtc ataaactggc ctctgtataa aggtatggtg ttgaggcaag      2160
acaaaggaaa gatgccaatg agcgttacag ttaaatcagt tgttttagct ttatctgctt      2220
qtacctgttt agcgtttttg taagattgat taacaacagt caaaaaagta atcaaaataa      2280
tgaccaqcgag ttataaatatg taattttct

```

<210> 2
 <211> 20
 <212> ADN
 <213> Homo Sapiens
 5 <400> 2
 ccgctgctta ctgtcttcc 20
 <210> 3
 <211> 20
 <212> ADN
 10 <213> Homo Sapiens
 <400> 3
 acagcttagc cacctcctca 20
 <210> 4
 <211> 19
 15 <212> ADN
 <213> Homo Sapiens
 <400> 4
 ctccggtatt cgtcccagt 19
 <210> 5
 20 <211> 20
 <212> ADN
 <213> Homo Sapiens
 <400> 5
 agcatcccac tgtgaaaacc 20
 25 <210> 6
 <211> 20
 <212> ADN
 <213> Homo Sapiens
 <400> 6
 30 atggttccat ggtttctcg 20
 <210> 7
 <211> 22
 <212> ADN
 <213> Homo Sapiens
 35 <400> 7
 ttcccttctc ttccatctac ca 22
 <210> 8
 <211> 25
 <212> ADN
 40 <213> Homo Sapiens
 <400> 8
 ttttctcttg ataaatacac caacg 25
 <210> 9
 <211> 20

ES 2 546 848 T3

<212> ADN
 <213> Homo Sapiens
 <400> 9
 cattgctcca gccttgaagt 20
 5 <210> 10
 <211> 25
 <212> ADN
 <213> Homo Sapiens
 <400> 10
 10 ccaagttag tatgatttc ccaca 25
 <210> 11
 <211> 41
 <212> ADN
 <213> Homo Sapiens
 15 <400> 11
 gtgatgtgag ttaatgatgg gccgctgctt acttgccttc c 41
 <210> 12
 <211> 78
 <212> ADN
 20 <213> Homo Sapiens
 <400> 12
 ccctaacctt aacatcttcc aagtactatt taataacca tactatacca aaataatcac 60
 agcttagcca cctcctca 78
 <210> 13
 <211> 77
 25 <212> ADN
 <213> Homo Sapiens
 <400> 13
 aaccttactt taccatactc tagtactatt taataacca tactatacca aaataatcct 60
 ccqatattca tcccaqt 77
 <210> 14
 30 <211> 77
 <212> ADN
 <213> Homo Sapiens
 <400> 14
 atataatcca ataaccoccca agtactat'tt aaataaccat actataccaa aataatcagc 60
 atcccactqt qaaaacc 77
 35 <210> 15
 <211> 74
 <212> ADN
 <213> Homo Sapiens
 <400> 15
 40 cacaccaccc aaaaactagt actattttaa taaccatact ataccaaaat aatcatggtt 60
 ccatggtttc ttcg 74

ES 2 546 848 T3

<210> 16
 <211> 84
 <212> ADN
 <213> Homo Sapiens
 5 <400> 16
 caccaattaca catcccaata aacttagtac tatttaaata accatactat accaaaataa 60
 ttttccttc ttttccatct acca 84

 <210> 17
 <211> 83
 <212> ADN
 10 <213> Homo Sapiens
 <400> 17
 ccccaaatc aaacatacca tagtactatt taaataacca tactatacca aaataatctt 60
 ttctcttgat aaatacacca acg 83

 <210> 18
 <211> 80
 15 <212> ADN
 <213> Homo Sapiens
 <400> 18
 tacaatccaa cttaaaacca ctcaqtacta tttaaataac catactatac caaaataatc 60
 cattgctcca gcttgaagt 80

 <210> 19
 20 <211> 85
 <212> ADN
 <213> Homo Sapiens
 <400> 19
 ctcaactcaa taaaccttta cacagtacta tttaaataac catactatac caaaataatc 60
 ccaagtttag tatgatttcc ccaca 85

 25 <210> 20
 <211> 21
 <212> ADN
 <213> Homo Sapiens
 <400> 20
 30 gtgatgtgag ttaatgatgg g 21
 <210> 21
 <211> 23
 <212> ADN
 <213> Homo Sapiens
 35 <400> 21
 aaccatacta taccaaaata ate 23
 <210> 22
 <211> 24
 <212> ADN
 40 <213> Homo Sapiens

<400> 22
 ggagagagaa gtagttgtgt aatt 24
 <210> 23
 <211> 24
 5 <212> ADN
 <213> Homo Sapiens
 <400> 23
 actacaccaa tacaaccaca tatc 24
 <210> 24
 10 <211> 20
 <212> ADN
 <213> Homo Sapiens
 <400> 24
 tgtttgatt ttgtggtga 20
 15 <210> 25
 <211> 21
 <212> ADN
 <213> Homo Sapiens
 <400> 25
 20 ccaacacatt aaaaactctc c 21
 <210> 26
 <211> 21
 <212> ADN
 <213> Homo Sapiens
 25 <400> 26
 tggaagatgt taaggtagg g 21
 <210> 27
 <211> 21
 <212> ADN
 30 <213> Homo Sapiens
 <400> 27
 agagtatggt aaagtaaggt t 21
 <210> 28
 <211> 20
 35 <212> ADN
 <213> Homo Sapiens
 <400> 28
 tgggggttat tggattatat 20
 <210> 29
 40 <211> 17
 <212> ADN
 <213> Homo Sapiens
 <400> 29
 agttttggg tgggtg 17

<210> 30
<211> 25
<212> ADN
<213> Homo Sapiens
5 <400> 30
aagtttattg ggatgtgtaa ttgtg 25
<210> 31
<211> 21
<212> ADN
10 <213> Homo Sapiens
<400> 31
atggtatggt tgattgtggg g 21
<210> 32
<211> 23
15 <212> ADN
<213> Homo Sapiens
<400> 32
gagtggtttt aagttggatt gta 23
<210> 33
20 <211> 23
<212> ADN
<213> Homo Sapiens
<400> 33
gagtggtttt aagttggatt gta 23
25 <210> 34
<211> 23
<212> ADN
<213> Homo Sapiens
<400> 34
30 gtgtaaaggt ttattgagtt gag 23
<210> 35
<211> 19
<212> ADN
<213> Homo Sapiens
35 <400> 35
gatgggagag tgagtagga 19
<210> 36
<211> 43
<212> ADN
40 <213> Homo Sapiens
<400> 36
tggaagatgt taaggtagg gtcacttcta actctaccac tta 43
<210> 37
<211> 20

ES 2 546 848 T3

<212> ADN
<213> Homo Sapiens
<400> 37
tgatgggaga gtgagtagga 20
5 <210> 38
<211> 43
<212> ADN
<213> Homo Sapiens
<400> 38
10 agagtatggt aaagtaaggt ttacttcta actctaccac tta 43
<210> 39
<211> 21
<212> ADN
<213> Homo Sapiens
15 <400> 39
ccctaacctt aacatcttc a 21
<210> 40
<211> 21
<212> ADN
20 <213> Homo Sapiens
<400> 40
aaccttactt taccatactc t 21
<210> 41
<211> 23
25 <212> ADN
<213> Homo Sapiens
<400> 41
tagaaagttt acggtatttt aat 23
<210> 42
30 <211> 23
<212> ADN
<213> Homo Sapiens
<400> 42
tagaaagttt atggtatttt aat 23
35 <210> 43
<211> 29
<212> ADN
<213> Homo Sapiens
<400> 43
40 agtacttga ttggaattgt ttttttga 29
<210> 44
<211> 29
<212> ADN
<213> Homo Sapiens

ES 2 546 848 T3

<400> 44
caaaaaaaaaac aattcaaata caagtacta 29
<210> 45
<211> 26
5 <212> ADN
<213> Homo Sapiens
<400> 45
agtactgtat ttggttgag tgggga 26
<210> 46
10 <211> 26
<212> ADN
<213> Homo Sapiens
<400> 46
ccccactcca accaaataca gtacta 26
15 <210> 47
<211> 20
<212> ADN
<213> Homo Sapiens
<400> 47
20 tgtggaattg tgagtggata 20
<210> 48
<211> 20
<212> ADN
<213> Homo Sapiens
25 <400> 48
acatactccc aaccaccata 20

Reivindicaciones

- 5 1. Un método para identificar al menos una muestra biológica en el campo del análisis de la metilación, que comprende las etapas (a) y (b) en el orden indicado:
 - (a) proporcionar un conjunto de muestras de al menos dos muestras biológicas, en donde al menos una muestra comprende el ADN genómico diferencialmente metilado al menos en una posición;
 - (b) aplicar al menos un identificador para cada muestra, en donde al menos un identificador aplicado no interfiera con el análisis posterior; y en donde al menos un identificador aplicado es un ácido nucleico que no forma una estructura secundaria estable y comprende al menos un sitio de unión de oligonucleótidos libre de citosina, o libre de citosina y libre de guanina; que pone en contacto el ADN de cada muestra con el bisulfito;
 - (c) someter cada muestra a una reacción de detección o cuantificación específica para el(os) sitio(s) de unión de uno o más identificadores aplicados; y
 - (d) someter cada muestra al análisis de la metilación, en donde se detecta o cuantifica la metilación en donde la etapa (c) se lleva a cabo antes, simultáneamente con o después de la etapa (d).
2. Un método de la reivindicación 1, en donde la detección o cuantificación de uno o más identificadores aplicados para cada muestra y el análisis de la metilación de cada muestra se realizan simultáneamente.
- 20 3. Un método de la reivindicación 1, en donde el identificador es al menos en partes parte de una molécula más grande;

parte de una molécula endógena de la muestra respectiva; parte de una molécula exógena añadida a la muestra respectiva; una sección del ADN genómico o ADN genómico total derivado de una planta; una sección de ADN genómico o ADN genómico total derivado de una bacteria; una sección de ADN genómico o ADN genómico total derivado de un no vertebrado; una sección de ADN genómico o ADN genómico total derivado de un vertebrado; una repetición corta en tándem; una variante de un polimorfismo de delección; una variante de un polimorfismo de nucleótido simple; una variante de un polimorfismo de longitud; un ácido nucleico artificial; un ácido nucleico circular; un ADN circular; un plásmido; un polinucleótido; un oligonucleótido; un PNA; un oligómero de PNA; un polímero de PNA; una metilación artificial; o combinaciones de estos.
- 30 4. Un método de la reivindicación 1, en donde diferentes identificadores se asignan a diferentes conjuntos de identificadores de acuerdo con sus respectivas propiedades biológicas, químicas o físicas.
- 35 5. Un método de la reivindicación 4, **caracterizado además porque** un representante de cada uno de al menos dos conjuntos de identificadores está incluido en un plásmido.
6. Un método de la reivindicación 5, en donde el primer conjunto de identificadores comprende un polimorfismo de secuencia y en donde el segundo conjunto de identificadores comprende un polimorfismo de longitud.
- 40 7. Un método de la reivindicación 1, en donde el identificador comprende al menos un sitio de unión de oligonucleótidos que protege las posiciones de citosina convertidas por el bisulfito;

es caracterizado además por una composición de base similar a la del ADN genómico analizado de la muestra proporcionada;

es una secuencia polimórfica de aproximadamente 5, aproximadamente 10, aproximadamente 15, aproximadamente 20, aproximadamente 25, aproximadamente 30, aproximadamente 35, aproximadamente 40, aproximadamente 50, aproximadamente 75, aproximadamente 100, o aproximadamente 200 nucleótidos; tiene un contenido de nucleótidos-citosina y nucleótidos-guanosina de aproximadamente 15 %, aproximadamente 20 %, aproximadamente 30 %, aproximadamente 40 %, aproximadamente 50 %, aproximadamente 60 %, aproximadamente 70 %, o aproximadamente 80 %; o combinaciones de estos.
- 45 50 8. Un método de la reivindicación 1, en donde el identificador es caracterizado además por una composición de base similar a la del ADN genómico analizado de la muestra proporcionada;

es una secuencia polimórfica de aproximadamente 5, aproximadamente 10, aproximadamente 15, aproximadamente 20, aproximadamente 25, aproximadamente 30, aproximadamente 35, aproximadamente 40, aproximadamente 50, aproximadamente 75, aproximadamente 100, o aproximadamente 200 nucleótidos; tiene un contenido de nucleótidos-citosina y nucleótidos-guanosina de aproximadamente 15 %, aproximadamente 20 %, aproximadamente 30 %, aproximadamente 40 %, aproximadamente 50 %, aproximadamente 60 %, aproximadamente 70 %, o aproximadamente 80 %; o combinaciones de estos.
- 55 60 9. Un método de la reivindicación 1, en donde el identificador es una variante de un polimorfismo de secuencia y, además
- 65

comprende aproximadamente 1, aproximadamente 10, aproximadamente 20, aproximadamente 30, aproximadamente 40, aproximadamente 50, aproximadamente 60, aproximadamente 70, aproximadamente 80, aproximadamente 90, o aproximadamente 100 sitios de nucleótidos variables.

- 5 **10.** Un método de la reivindicación 1, en donde el identificador es una variante de un polimorfismo de secuencia y, además,
comprende aproximadamente 5, aproximadamente 10, aproximadamente 15, aproximadamente 20, o
aproximadamente 25 sitios nucleótidos variables;
10 tiene un contenido de nucleótidos-citosina y nucleótidos-guanosina de aproximadamente 20 %, aproximadamente 30 %, aproximadamente 40 %, aproximadamente 50 %, aproximadamente 60 %, aproximadamente 70 %, o aproximadamente 80 %; o ambos.
- 15 **11.** Un método de la reivindicación 1, en donde el identificador es una variante de un polimorfismo de longitud y, además,
tiene una diferencia de longitud de aproximadamente 10, aproximadamente 100, aproximadamente 200,
aproximadamente 300, aproximadamente 400, aproximadamente 500, aproximadamente 600,
aproximadamente 700, aproximadamente 800, aproximadamente 900, o aproximadamente 1000 nucleótidos
20 en comparación con otros identificadores de polimorfismo de longitud de ácido nucleico usados; es de aproximadamente 10, aproximadamente 100, aproximadamente 500, aproximadamente 1.000, aproximadamente 1.500, aproximadamente 2.000, aproximadamente 2.500, aproximadamente 3.000, aproximadamente 3.500, aproximadamente 4.000, aproximadamente 4.500, aproximadamente 5.000, aproximadamente 5.500, aproximadamente 6.000, aproximadamente 6.500, aproximadamente 7.000, aproximadamente 7.500, aproximadamente 8.000, aproximadamente 8.500, aproximadamente 9.000, aproximadamente 9.500, o aproximadamente 10.000 nucleótidos de longitud; se deriva a partir del ADN no-humano; o combinaciones de estos.
- 25 **12.** Un método de la reivindicación 1, en donde el identificador es una variante de un polimorfismo de longitud y, además
es de aproximadamente 5, aproximadamente 25, aproximadamente 50, aproximadamente 75,
30 aproximadamente 100, aproximadamente 125, aproximadamente 150, aproximadamente 175, aproximadamente 200, aproximadamente 225, aproximadamente 250, aproximadamente 275, aproximadamente 300, aproximadamente 325, aproximadamente 350, aproximadamente 375, aproximadamente 400, aproximadamente 425, aproximadamente 450, aproximadamente 475, o aproximadamente 500 nucleótidos de longitud;
35 se deriva a partir del ADN no-humano; tiene un contenido de nucleótidos-citosina y nucleótidos-guanosina de aproximadamente 20 %, aproximadamente 30 %, aproximadamente 40 %, aproximadamente 50 %, aproximadamente 60 %, aproximadamente 70 %, o aproximadamente 80 %; o combinaciones de estos.
- 40 **13.** Un método de la reivindicación 1, en donde el identificador comprende una etiqueta seleccionada del grupo que comprende colorante, colorante fluorescente, colorante quimioluminiscente, Cy5, Cy3, TAMRA, FAM, etiqueta, etiqueta de epitopo, péptido, polipéptido, proteína, sacárido, hormona, lípido, marcador de masa, partícula, partícula de oro, partícula de plata, partícula de platino, código embebido en parafina o combinaciones de estos.
- 45 **14.** Un método de la reivindicación 1, en donde la reacción de detección o cuantificación se lleva a cabo por uno o más medios seleccionados a partir del grupo que comprende: anticuerpo, análisis de inmunolectrotransferencia Western, cromatografía, inmunoensayo, inmunoensayo ELISA, radioinmunoensayo, FPLC, HPLC, luz UV, luz, espectrómetro, MALDI-TOF, ácido nucleico, ADN, PNA, oligonucleótido, oligómero de PNA, método de amplificación, método de PCR, método de amplificación isotérmica, método de NASBA, método de LCR, método de amplificación específica de la metilación, método de MSP (PCR específica de la metilación), método de MSP anidada, método de HeavyMethyl™, método de detección, método de detección específica de la metilación, método de secuenciación de bisulfito, detección por medio de matrices de ADN, detección por medio de micromatrices de oligonucleótidos, detección por medio de micromatrices de isla de CpG, detección por medio de enzimas de restricción, método de detección y amplificación simultánea específica de la metilación y, método de COBRA, PCR en tiempo real, método de PCR en tiempo real HeavyMethyl™, método de MSP Methylight™, método de Methylight™, método de Methylight™ Algo™, método de OM, método de Headloop Methylight™, método de HeavyMethyl™ Methylight™, método de HeavyMethyl™ Scorpion™, método de MSP Scorpion™, método de Headloop Scorpion™, extensión del iniciador sensible a la metilación, y método Ms-SNuPE (extensión del iniciador de nucleótido simple sensible a la metilación).
- 50 **15.** Un método de la reivindicación 1, en donde la reacción de detección o cuantificación comprende un ácido nucleico, ADN, PNA, oligonucleótido, o oligómero de PNA que
- 55
- 60
- 65

es al menos de aproximadamente 10, aproximadamente 15, aproximadamente 20, aproximadamente 25, aproximadamente 30, aproximadamente 35, aproximadamente 40, aproximadamente 50, aproximadamente 60, aproximadamente 70, aproximadamente 80, aproximadamente 90, aproximadamente 100, aproximadamente 150 o aproximadamente 200 nucleótidos de longitud,

tiene un contenido de nucleótidos de citosina y nucleótidos de guanosina de aproximadamente 15 %, aproximadamente 20 %, aproximadamente 30 %, aproximadamente 40 %, aproximadamente 50 %, aproximadamente 60 %, aproximadamente 70 %, aproximadamente 80 %, o aproximadamente 85 %;

tiene una temperatura de fusión de aproximadamente 37 °C, aproximadamente 45 °C, aproximadamente 50 °C, aproximadamente 55 °C, aproximadamente 60 °C, aproximadamente 65 °C, aproximadamente 70 °C, aproximadamente 75 °C, aproximadamente 80 °C, aproximadamente 85 °C, aproximadamente 90 °C, aproximadamente 95 °C, o aproximadamente 99 °C; o combinaciones de estos.

16. Un método de la reivindicación 1, en donde la reacción de detección o cuantificación comprende un oligonucleótido que

es al menos de aproximadamente 5, aproximadamente 10, aproximadamente 15, aproximadamente 20, aproximadamente 25, aproximadamente 30, aproximadamente 35, aproximadamente 40, aproximadamente 50, aproximadamente 60, aproximadamente 70, aproximadamente 80, o aproximadamente 90 nucleótidos de longitud;

tiene un contenido de nucleótidos-citosina y nucleótidos-guanosina de aproximadamente 5 %, de aproximadamente 10 %, aproximadamente 20 %, aproximadamente 30 %, aproximadamente 40 %, aproximadamente 50 %, aproximadamente 60 %, aproximadamente 70 %, aproximadamente 80 %, aproximadamente 90 % o aproximadamente 95 %;

tiene una temperatura de fusión de aproximadamente 37 °C, aproximadamente 45 °C, aproximadamente 50 °C, aproximadamente 55 °C, aproximadamente 60 °C, aproximadamente 65 °C, aproximadamente 70 °C, aproximadamente 75 °C, aproximadamente 80 °C, aproximadamente 85 °C, aproximadamente 90 °C aproximadamente 95 °C, o aproximadamente 99 °C; o combinaciones de estos.

17. Un método de la reivindicación 1, en donde la reacción de detección o cuantificación comprende un oligonucleótido que

es al menos de aproximadamente 16, aproximadamente 20, aproximadamente 25, aproximadamente 30, aproximadamente 35, o aproximadamente 40 nucleótidos de longitud;

tiene un contenido de nucleótidos-citosina y nucleótidos-guanosina de aproximadamente 20 %, aproximadamente 30 %, aproximadamente 40 %, aproximadamente 50 %, aproximadamente 60 %, aproximadamente 70 %, o aproximadamente 80 %; y

tiene una temperatura de fusión de aproximadamente 50 °C, aproximadamente 53 °C, aproximadamente 56 °C, aproximadamente 59 °C, o aproximadamente 62 °C.

18. Un método de la reivindicación 1, en donde la reacción de detección o cuantificación comprende un oligonucleótido que comprende una secuencia de iniciación específica del gen y una secuencia que se hibrida en una variante de un polimorfismo de secuencia.

19. Un método de la reivindicación 1, en donde la reacción de detección o cuantificación comprende un oligonucleótido que comprende dos dominios,

en donde un dominio comprende una secuencia de iniciación específica del objetivo de aproximadamente 10, aproximadamente 15, aproximadamente 20, aproximadamente 25, aproximadamente 30, aproximadamente 35, o aproximadamente 40 nucleótidos, tiene un contenido de nucleótidos-citosina y nucleótidos-guanosina de aproximadamente 20 %, aproximadamente 30 %, aproximadamente 40 %, aproximadamente 50 %, aproximadamente 60 %, aproximadamente 70 %, o aproximadamente 80 %, y tiene una temperatura de fusión de dominio de aproximadamente 50 °C, aproximadamente 52 °C, aproximadamente 54 °C, aproximadamente 56 °C, aproximadamente 58 °C, aproximadamente 60 °C, o aproximadamente 62 °C; y en la presente el otro dominio comprende una secuencia única de aproximadamente 5, aproximadamente 10, aproximadamente 15, aproximadamente 20, aproximadamente 25, aproximadamente 30, aproximadamente 35, aproximadamente 40,

aproximadamente 45, o aproximadamente 50 nucleótidos, es libre de citosinas, guanina, o ambos, y tiene un contenido de nucleótidos-citosina y nucleótidos-guanosina de aproximadamente 20 %, aproximadamente 30 %, aproximadamente 40 %, aproximadamente 50 %, aproximadamente 60 %, aproximadamente 70 %, o aproximadamente 80 %.

20. Un método de la reivindicación 1, en donde el análisis de la metilación comprende al menos uno seleccionado del grupo que comprende la detección del estado de metilación, detección del nivel de la metilación, detección del patrón de la metilación, detección del nivel patrón de la metilación, método de amplificación, método de PCR, método de amplificación isotérmica, método de NASBA, método de LCR, método de amplificación específica de la metilación, método de MSP (PCR específica de la metilación), método de MSP anidada, método de HeavyMethyl™, método de detección, método de detección específica de la metilación, método de secuenciación de bisulfito, detección por medio de matrices de ADN, detección por medio de micromatrices de

oligonucleótidos, detección por medio de micromatrices de isla de CpG, detección por medio de enzimas de restricción, método de detección y amplificación simultánea específica de la metilación y, método de COBRA, PCR en tiempo real, método de PCR en tiempo real HeavyMethyl™, método de MSP Methylight™, método de Methylight™, método de Methylight™ Algo™, método de OM, método de Headloop Methylight™, método de HeavyMethyl™ Methylight™, método de HeavyMethyl™ Scorpion™, método de MSP Scorpion™, método de Headloop Scorpion™, extensión del iniciador sensible a la metilación, y método Ms-SNuPE (extensión del iniciador de nucleótido simple sensible a la metilación).

21. Un método adecuado para la detección del intercambio de muestra, contaminación cruzada, o ambos en el campo de análisis de la metilación, que comprende las etapas del método de la reivindicación 1 y que comprende además las etapas de deducir la presencia de un intercambio de muestra o de una contaminación cruzada a partir de la presencia de al menos un identificador no aplicado a una muestra o la ausencia de un intercambio de muestra o una contaminación cruzada a partir de la ausencia de al menos un identificador no aplicado a una muestra.
22. Un método de la reivindicación 21, en donde la etapa de deducir la presencia o ausencia de un intercambio de la muestra, de una contaminación cruzada, o ambos comprende además deducir el grado de una contaminación cruzada para una única muestra a partir de la cantidad absoluta o relativa de al menos un identificador presente en dicha muestra única.
23. Un método adecuado para la identificación de una muestra en un conjunto de muestras mezclado en el campo de análisis de la metilación, que comprende las etapas del método de la reivindicación 1 y que comprende además las etapas para: identificar una muestra en el conjunto de muestras mezclado mediante la detección de al menos un identificador respectivo aplicado.
24. Un método adecuado para la detección de una inhibición de la amplificación en el campo de análisis de la metilación, que comprende las etapas del método de la reivindicación 1 y que comprende además las etapas de deducir una presencia, ausencia o inhibición parcial de la amplificación a partir de la presencia, ausencia o cantidad de el producto de una reacción de amplificación específica del identificador.
25. Un método adecuado para la normalización, calibración, o ambos en el campo de análisis de la metilación, que comprende las etapas del método de la reivindicación 1 y que comprende además las etapas para normalizar al menos una muestra, calibrar un procedimiento experimental, o ambos de acuerdo con uno o más identificadores detectados o cuantificados en comparación con la cantidad total añadida de uno o más identificadores.
26. Un método adecuado para la detección de una contaminación por arrastre en el campo de análisis de la metilación que comprende las etapas del método de la reivindicación 1 y que comprende además las etapas de deducir la presencia de una contaminación por arrastre de la muestra a partir de la presencia de al menos un identificador no aplicado en dicha muestra, o deducir la ausencia de una contaminación de la muestra de la ausencia de identificadores no aplicados en dicha muestra.
27. Un método adecuado para la evaluación del éxito de una etapa de hibridación en el campo de análisis de la metilación, en donde la reacción de detección o cuantificación comprende una etapa de hibridación, y el método comprende además las etapas del método de la reivindicación 1 y que comprende además las etapas de evaluar el éxito de una etapa de hibridación en donde (a) la presencia de una señal derivada de al menos un identificador aplicado indica la presencia de una etapa de hibridación exitosa, y en donde (b) la ausencia de señal derivada para al menos un identificador aplicado indica la presencia de una etapa de hibridación sin éxito.
28. Un método de las reivindicaciones 21, 23 a 27, que comprende además poner en contacto el ADN de cada muestra y al menos un identificador aplicado con un reactivo o enzima que diferencia entre una posición metilada o una no metilada.
29. Un método adecuado para el control de la precisión de un proceso o método, que comprende las etapas del método de la reivindicación 1, en donde
 - (a) se proporciona un conjunto de muestras de al menos 2, 3, 4, 100 200, 400 o 800 muestras biológicas;
 - (b) en donde los identificadores aplicados generan un patrón de identificación a través de la muestra; y en donde
 - (c) al menos un identificador se aplica a una muestra del conjunto; y el método que comprende además deducir la precisión de dicho proceso o método a partir de las señales de los identificadores detectados o cuantificados de las muestras.

30. Un método de la reivindicación 29, en donde sólo un único identificador se aplica a cada muestra del conjunto de la muestra.

5 31. Un método de la reivindicación 29, en donde deducir la precisión de dicho proceso o método a partir de las señales de los identificadores detectados o cuantificados de las muestras, comprende
determinar la presencia de un proceso o método libre de error, en donde dichas señales generan un patrón que se corresponde con el patrón de identificación generado inicialmente mediante la aplicación de los
10 identificadores a las muestras; o
determinar la ausencia de un proceso o método libre de error, en donde dichas señales generan un patrón que no se corresponde con el patrón de identificación generado inicialmente mediante la aplicación de los
15 identificadores a las muestras.

32. Un método de la reivindicación 31, en donde el proceso o método es un proceso o método de gran
15 productividad.

33. El uso de un método de acuerdo con una de las reivindicaciones anteriores para al menos uno seleccionado
del grupo que comprende la detección del intercambio de muestra; detección de la contaminación cruzada;
20 identificación de una muestra en un conjunto de muestras mezcladas; detección de inhibición de la
amplificación; determinación de la velocidad de conversión del ADN; normalización de una muestra; calibración
de una muestra; identificación de la contaminación por arrastre, control del éxito de una etapa de hibridación o
combinaciones de estos.

25

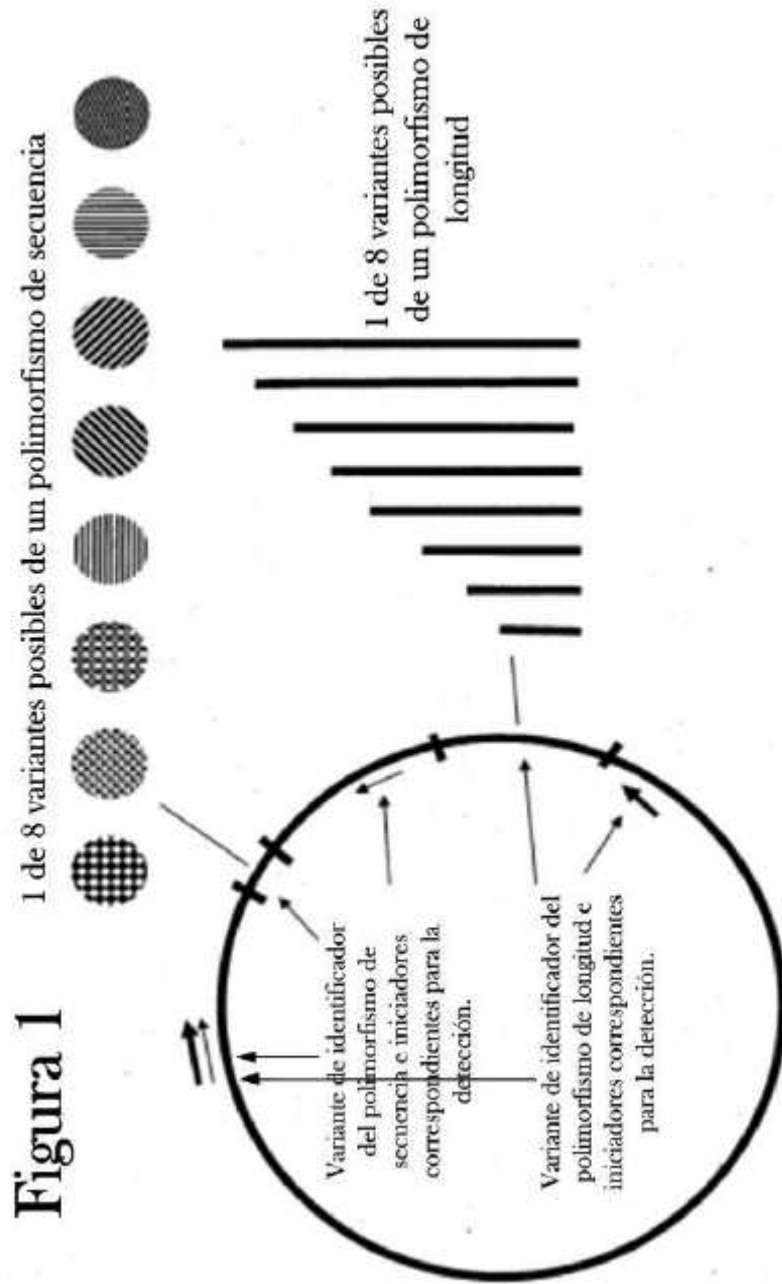


Figura 2

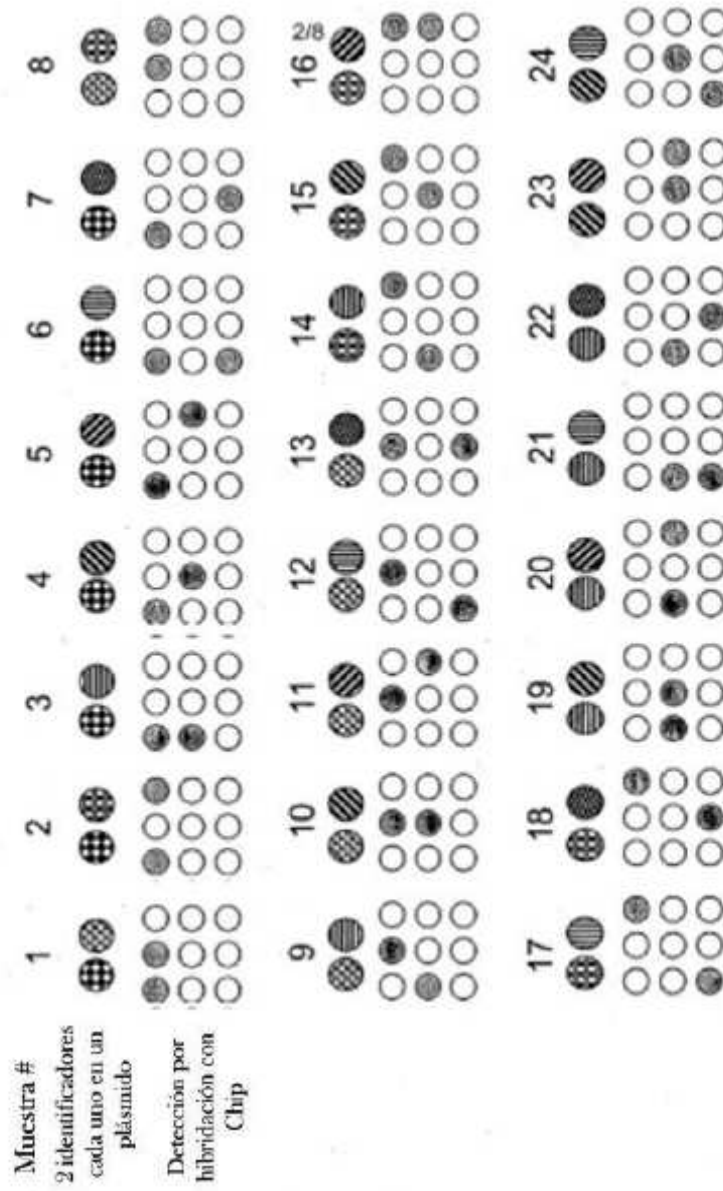


Figura 3

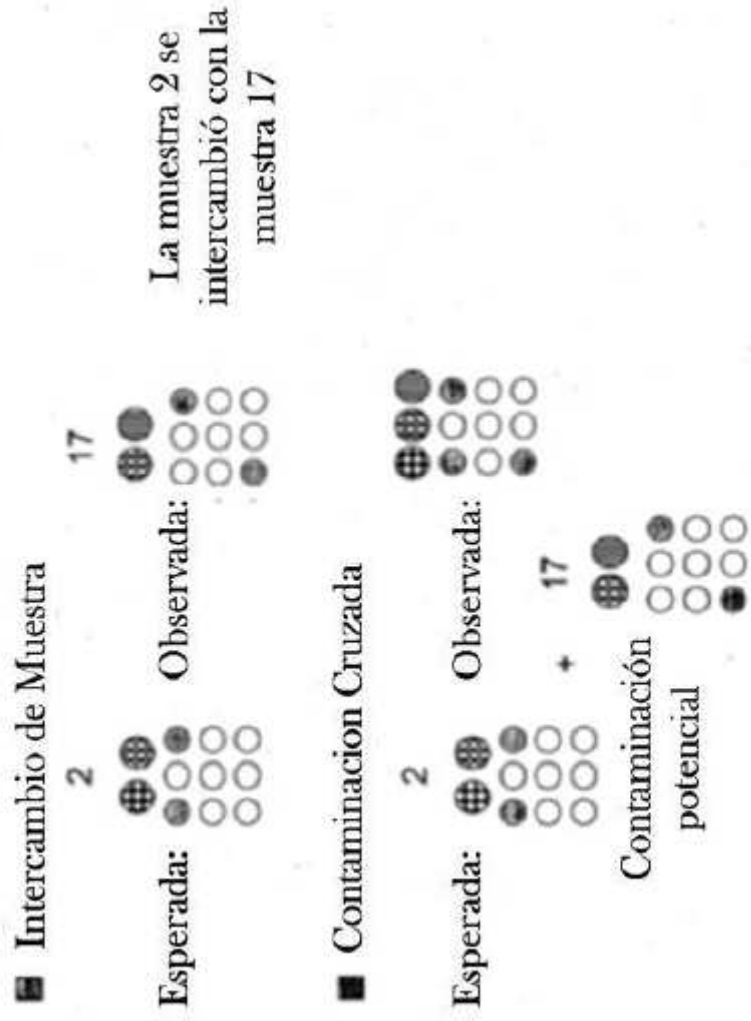


Figura 4

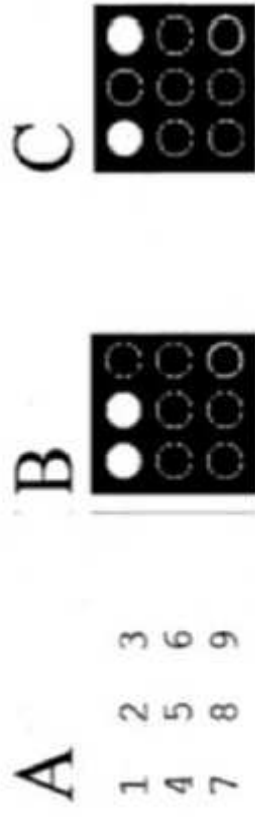


Figura 6



Figura 5

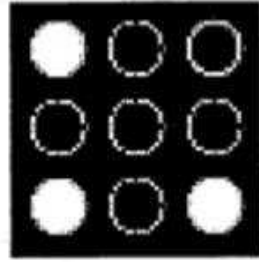
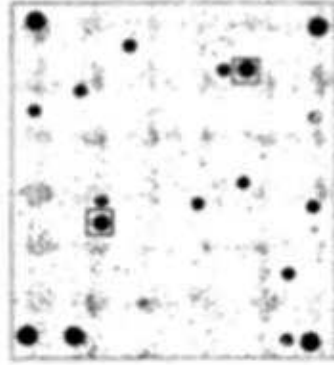


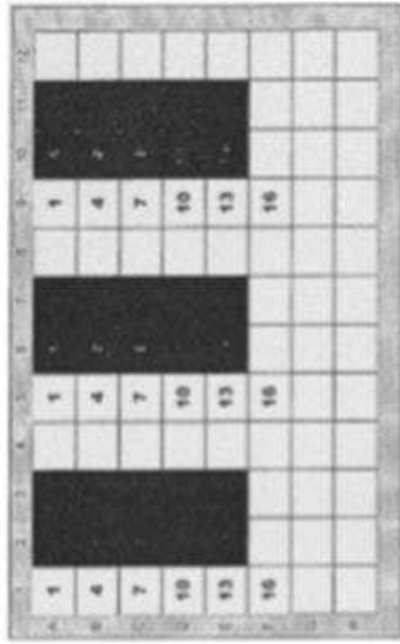
Figura 7



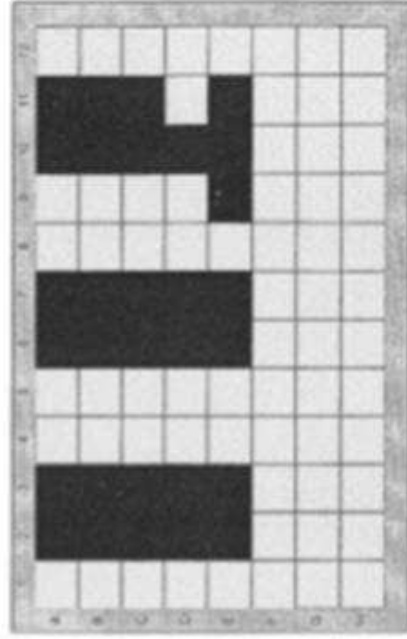
B



A



A



B

Figura 8