

19



OFICINA ESPAÑOLA DE
PATENTES Y MARCAS

ESPAÑA



11 Número de publicación: **2 564 048**

51 Int. Cl.:

C12Q 1/68 (2006.01)

12

TRADUCCIÓN DE PATENTE EUROPEA

T3

96 Fecha de presentación y número de la solicitud europea: **12.05.2000 E 06011777 (7)**

97 Fecha y número de publicación de la concesión europea: **09.12.2015 EP 1710321**

54 Título: **Procedimiento de análisis de metilación del ADN de alto rendimiento**

30 Prioridad:

14.05.1999 US 311912

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

17.03.2016

73 Titular/es:

**UNIVERSITY OF SOUTHERN CALIFORNIA
(100.0%)
3716 SOUTH HOPE STREET SUITE 313
LOS ANGELES, CA 90007-4344, US**

72 Inventor/es:

**LAIRD, PETER W.;
CARROLL, CINDY A. y
DANENBERG, KATHLEEN D.**

74 Agente/Representante:

CARPINTERO LÓPEZ, Mario

ES 2 564 048 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).

DESCRIPCION

Procedimiento de análisis de metilación del ADN de alto rendimiento

Campo técnico de la invención

5 La presente invención proporciona un procedimiento de alto rendimiento y cuantitativo mejorado para determinar patrones de metilación en muestras de ADN genómico. Específicamente, la invención proporciona un procedimiento para tratar muestras de ADN genómico con bisulfato de sodio para crear diferencias en la secuencia dependientes de la metilación, seguido de detección con técnicas de PCR cuantitativa basada en fluorescencia.

Antecedentes de la invención

10 En organismos eucariotas de los órdenes más altos, el ADN se metila solo en las citosinas situadas en posición 5' respecto a la guanosina en el dinucleótido CpG. Esta modificación tiene importantes efectos reguladores en la expresión génica, predominantemente cuando implica a regiones ricas en CpG (islas CpG) situadas en la región promotora de una secuencia génica. Se ha asociado una metilación extensa de las islas CpG con la inactivación transcripcional de genes impresos y genes del cromosoma X inactivo de las hembras seleccionados. La metilación aberrante de islas CpG normalmente no metiladas se ha descrito como un suceso frecuente en células
15 inmortalizadas y transformadas y ha sido frecuentemente asociado con la inactivación transcripcional de genes supresores de tumores en cánceres humanos.

Las ADN metilasas transfieren grupos metilo desde un donador universal de metilos, tal como S-adenosil metionina, a sitios específicos en el ADN. Una función biológica de la metilación del ADN en bacterias es la protección del ADN
20 contra la digestión por enzimas de restricción afines. Las células de mamíferos poseen metilasas que metilan restos de citosina en el ADN que son vecinas al extremo 5' de las guaninas (CpG). Esta metilación puede jugar un papel en la inactivación génica, diferenciación celular, formación de tumores, inactivación del cromosoma X, e impresión genómica. Las islas CpG permanecen no metiladas en las células normales, excepto durante la inactivación del cromosoma X y la impresión parenteral específica, donde la metilación de las regiones reguladoras 5' pueden conducir a una represión transcripcional. La metilación del ADN es también un mecanismo para cambiar la
25 secuencia de bases del ADN sin alterar su función codificante. La metilación del ADN es un cambio heredable, reversible y epigenético. Sin embargo, la metilación del ADN tiene el potencial de alterar la expresión génica, lo que tiene profundas consecuencias genéticas y en el desarrollo.

La reacción de metilación implica sacar una citosina objetivo fuera de una doble cadena intacta para permitir la
30 transferencia de un grupo metilo de la S-adenosilmetionina en una hendidura de la enzima ADN (citosina-5)-metiltransferasa (Klimasauskas y col., *Cell* 76:357-369, 1994) para formar 5-metilcitosina (5-mCyt). Esta conversión enzimática es la única modificación epigenética del ADN conocida que existe en los vertebrados y es esencial para el normal desarrollo embrionario (Bird, *Cell* 70:5-8, 1992; Laird y Jaenisch, *Human Mol. Genet.* 3:1487-1495, 1994; y Li y col., *Cell* 69:915-926, 1992). La presencia de 5-mCyt en los dinucleótidos CpG dio como resultado un agotamiento de 5 veces de esta secuencia en el genoma durante la evolución de los vertebrados, presumiblemente
35 debido a una desaminación espontánea de 5-mCyt sobre T. (Schoreret y col., *Proc. Natl. Acad. Sci. USA* 89:957-961, 1992). Aquellas áreas del genoma que no muestran dicha supresión se denominan "islas CpG" (Bird, *Nature* 321:209-213, 1986; y Gardiner-Garden y col. *J. Mol. Bio.* 196:261-282, 1987). Estas regiones islas CpG comprenden aproximadamente el 1 % de los genomas de los vertebrados y también representan aproximadamente el 15 % de la cantidad total de dinucleótidos CpG (Bird, *Nature* 321:209-213, 1986). Las islas CpG tienen típicamente una longitud
40 de entre 0,2 y 1 kb y se sitúan corriente arriba de muchos genes constitutivos y específicos de tejidos, pero muchas se extienden también dentro de regiones de genes codificantes. Por lo tanto, se piensa que la metilación de restos de citosina dentro de las islas CpG en tejidos somáticos afecta a la función génica alterando la transcripción (Cedar, *Cell* 53:3-4, 1988).

La metilación de restos de citosina contenida dentro de las islas CpG se ha correlacionado inversamente con la
45 actividad génica. Esto podría conducir a disminuir la expresión génica por una diversidad de mecanismos que incluyen, por ejemplo, interrupción de la estructura local de la cromatina, inhibición de factores de transcripción que se unen al ADN, o por reclutamiento de proteínas que interactúan específicamente con secuencias metiladas y previniendo indirectamente la unión de factores de transcripción. En otras palabras, existen varias teorías de cómo la metilación afecta a la transcripción del ARNm y a la expresión génica, pero el mecanismo exacto de acción no está
50 bien entendido. Algunos estudios han demostrado una correlación inversa entre metilación de las islas CpG y la expresión génica, sin embargo, la mayoría de las islas CpG de genes autosómicos se mantienen no metilados en la línea germinal y la metilación de estas islas es normalmente independiente de la expresión génica. Los genes específicos de tejidos no están metilados normalmente en los órganos receptores objetivo, pero si lo están en la línea germinal y en tejidos adultos que no se expresan. Las islas CpG de genes domésticos que se expresan
55 constitutivamente están normalmente no metilados en la línea germinal y en los tejidos somáticos.

La metilación anormal de islas CpG asociadas con genes supresores de tumores puede también causar disminución de la expresión génica. La metilación aumentada de dichas regiones podría conducir a una reducción progresiva de la expresión génica normal, dando como resultado la selección de una población de células que tienen una ventaja

de crecimiento selectiva (es decir, un tumor maligno).

Se considera que un patrón de metilación del ADN alterado, particularmente metilación de restos de citosina, causa inestabilidad genómica y es mutagénico. Esto, presumiblemente, ha llevado a una supresión del 80 % de un sitio aceptor de metil CpG en organismos eucariotas, que metila sus genomas. La metilación de la citosina contribuye además a la generación de polimorfismos y mutaciones en las líneas germinales y a mutaciones de transición que inactivan los genes supresores de tumores (Jones, *Cancer Res.* 56:2463-2467, 1996). Se requiere también la metilación para el desarrollo embrionario de los mamíferos. (Li y col., *Cell* 69:915-926, 1992). Parece que la metilación de regiones promotoras ricas en CpG podría bloquear la actividad transcripcional. Ushijima y col. (*Proc. Natl. Acad. Sci. USA* 94:2284-2289, 1997) caracterizaron y clonaron fragmentos de ADN que muestran cambios en la metilación durante la hepatocarcinogénesis del ratón. Los datos de un grupo de estudios de sitios de metilación alterados en células cancerígenas muestran que no es simplemente el conjunto de niveles de metilación del ADN lo que está alterado en el cáncer, sino los cambios en la distribución de los grupos metilo.

Estos estudios sugieren que la metilación de las secuencias ricas en CpG, conocidas como islas CpG, proporciona una vía alternativa para la inactivación de supresores de tumores. La metilación de oligonucleótidos CpG en los promotores de genes supresores de tumores puede llevar a su inactivación. Otros estudios proporcionan datos de que las alteraciones en el procedimiento normal de metilación están asociadas con inestabilidad genómica (Lengauer, y col., *Proc. Natl. Acad. Sci. USA* 94:2545-2550, 1997). Tales cambios epigenéticos anormales pueden encontrarse en muchos tipos de cáncer y pueden servir como marcadores potenciales para transformación oncogénica, a condición de que haya medios fiables para determinar rápidamente dichos cambios epigenéticos. Por lo tanto, existe una necesidad en la técnica de un procedimiento fiable y rápido (alto rendimiento) para determinar la metilación como la alteración epigenética preferente.

Procedimientos para determinar la metilación del ADN

Existen diversos procedimientos de detección genómica que se han utilizado para identificar sitios de metilación alterados en células cancerosas. Por ejemplo, un procedimiento implica detección genómica por marcado de restricción (Kawai y col., *Mol. Cell. Biol.* 14:7421-7427, 1994), y otro ejemplo implica PCR arbitrariamente cebada sensible a metilación (Gonzalzo y col., *Cancer Res.* 57:594-599, 1997). Se han controlado los cambios en los patrones de metilación en sitios específicos CpG por digestión de ADN genómico con enzimas de restricción sensibles a metilación, seguido de análisis Southern de las regiones de interés (procedimiento de digestión-Southern). El procedimiento de digestión Southern es un procedimiento sencillo, pero tiene desventajas inherentes en que requiere una gran cantidad de ADN de alto peso molecular (al menos o más de 5 pg) y tiene un alcance limitado para el análisis de sitios CpG (como se determina por la presencia de sitios de reconocimiento para enzimas de restricción sensibles a metilación). Otro procedimiento para analizar cambios en los patrones de metilación implica un procedimiento basado en PCR que implica digestión de ADN genómico con enzimas de restricción sensibles a la metilación antes de la amplificación por PCR (Singer-Sam y col., *Nucl. Acids. Res.* 18:687, 1990). Sin embargo, este procedimiento no se ha mostrado eficaz por el alto grado de falsas señales positivas (metilación presente) debidas a una ineficaz digestión enzimática o una sobreamplificación en la posterior reacción de PCR.

Se ha simplificado la secuenciación genómica para el análisis de los patrones de metilación del ADN y la distribución de 5-metilcitosina utilizando tratamiento con bisulfito (Frommer y col., *Proc. Natl. Acad. Sci. USA* 89:1827-1831, 1992). El tratamiento del ADN con bisulfito distingue las citosinas metiladas de las no metiladas, pero originalmente la secuenciación genómica con bisulfito requiere la secuenciación a gran escala de múltiples clones de plásmidos para determinar el conjunto de los patrones de metilación, lo que evita que esta técnica sea útil en el mercado para determinar los patrones de metilación en cualquier tipo de ensayo de diagnóstico rutinario.

Además, se ha informado de otras técnicas que utilizan tratamiento del ADN con bisulfito como un punto de partida para el análisis de metilación. Estos incluyen PCR específica de metilación (MSP) (Herman y col., *Proc. Natl. Acad. Sci. USA* 93:9821-9826, 1992); y digestión con enzimas de restricción de productos de PCR amplificados de ADN transformado con bisulfito (Sadri y Hornsby, *Nucl. Acids. Res.* 24:5058-5059, 1996; y Xiong y Laird, *Nucl. Acids Res.* 25:2532-2534, 1997).

Las técnicas de PCR se han desarrollado para la detección de mutaciones génicas (Kuppuswamy y col., *Proc. Natl. Acad. Sci. USA* 88:1143-1147, 1991) y la cuantificación de la expresión específica de alelos (Szabo y Mann, *Genes Dev.* 9:3097-3108, 1995; y Singer-Sam y col., *PCR Methods Appl.* 1:160-163, 1992). Tales técnicas utilizan cebadores internos, que templan a una plantilla generada por PCR y terminan inmediatamente en el extremo 5' del nucleótido sencillo a ensayar. Sin embargo no se ha probado una técnica de expresión de alelos específica dentro del contexto de detección de patrones de metilación del ADN.

La mayoría de las técnicas de biología molecular utilizadas para analizar loci específicos, tales como islas CpG en ADN genómico complejo, implican alguna forma de amplificación específica de secuencia, tanto si es una amplificación biológica por clonación en *E. coli*, amplificación directa por PCR o amplificación de señal por hibridación con una sonda que puede visualizarse. Ya que la metilación del ADN es añadida después de la replicación por una metiltransferasa dedicada al mantenimiento del ADN, que no está presente tanto en *E. coli* como en la reacción PCR, tal información de metilación se pierde durante la clonación molecular o la amplificación por

5 PCR. Es más, la hibridación molecular no discrimina entre ADN metilado y no metilado, ya que el grupo metilo de la citosina no participa en el apareamiento de bases. La falta de una forma fácil de amplificar la información de metilación en el ADN genómico complejo ha sido probablemente el más importante impedimento en la investigación de la metilación del ADN. Por lo tanto, existe una necesidad en la técnica de mejorar las técnicas de detección de la metilación, especialmente de una manera cuantitativa.

10 Los procedimientos indirectos, para las determinaciones del patrón de metilación del ADN en loci específicos que se han desarrollado, dependen de técnicas que alteran el ADN genómico de una manera dependiente de la metilación, antes del suceso de amplificación. Hay dos procedimientos primarios que se han utilizado para conseguir esta alteración del ADN dependiente de la metilación. La primera es la digestión por una enzima de restricción que está afectada en su actividad por la 5-metilcitosina en el contexto de una secuencia CpG. El corte, o la falta de él, puede revelarse posteriormente por transferencia Southern o por PCR. La otra técnica que ha recibido recientemente un amplio uso es el tratamiento del ADN genómico con bisulfito de sodio. El tratamiento con bisulfito de sodio convierte a todas las citosinas no metiladas en el ADN en uracilo por desaminación, pero deja los restos de citosina metilados intactos. La posterior amplificación por PCR reemplaza los restos de uracilo con timinas y los restos de 5-metilcitosina con citosinas. La diferencia en la secuencia resultante ha sido detectada utilizando técnicas de detección de secuencias de ADN convencionales, principalmente PCR.

15 Muchas técnicas de detección de la metilación del ADN utilizan tratamiento con bisulfito. En la actualidad, a todos los procedimientos basados en el tratamiento con bisulfito les sigue una reacción de PCR para analizar loci específicos dentro del genoma. Existen dos formas principales diferentes en las que puede revelarse la diferencia de secuencia generada por el tratamiento con bisulfito de sodio. La primera es diseñar cebadores de PCR que únicamente templan con ADN transformado metilado o no metilado. Esta técnica se denomina "PCR específica de metilación" o "MSP". El procedimiento utilizado por todas las otras técnicas basadas en el bisulfito (tal como secuenciación genómica con bisulfito, COBRA y MsNuPE) es amplificar el ADN transformado por el bisulfito utilizando cebadores que templan en puntos donde faltan dinucleótidos CpG en la secuencia genómica original. De esta forma, los cebadores de PCR pueden amplificar la secuencia entre los dos cebadores, a pesar del estado de metilación del ADN de esa secuencia en el ADN genómico original. Esto da como resultado un conjunto de diferentes productos de PCR, todos con la misma longitud y que difieren en su secuencia solo en los sitios de metilación potencial del ADN en CpG situados entre los dos cebadores. La diferencia entre estos procedimientos de procesamiento de la secuencia convertida por el bisulfito es que en MSP, la información de metilación se obtiene de la producción o falta de producción de un producto de PCR, mientras que en otras técnicas se genera siempre una mezcla de productos y la mezcla se analiza posteriormente para producir información cuantitativa de la producción relativa de los diferentes estados de metilación.

20 MSP es una técnica cualitativa. No es cuantitativa por dos razones. La primera es que la información de metilación se obtiene de la comparación de dos reacciones de PCR diferentes (la versión metilada y la no metilada). Existen dificultades inherentes en hacer comparaciones cinéticas de dos reacciones de PCR diferentes. El otro problema con MSP es que a menudo los cebadores cubren más de un dinucleótido CpG. La consecuencia es que se pueden generar múltiples variantes de la secuencia, dependiendo del patrón de metilación del ADN en el ADN genómico original. Por ejemplo, si el cebador delantero es un oligonucleótido de 24 meros que cubre 3 CpG, entonces $2^3 = 8$ diferentes secuencias teóricas de permutación podrían surgir en el ADN genómico con la conversión de bisulfito dentro de esta secuencia de 24 nucleótidos. Si solo se hace una reacción completamente metilada y otra completamente sin metilar, entonces solo se está investigando realmente 2 de 8 posibles estados de metilación. La situación se complica más si los estados de metilación intermedia llevan a una amplificación, pero con eficacia reducida. Por lo tanto, la técnica MSP no es cuantitativa. Por lo tanto, existe una necesidad en la técnica de mejorar la técnica MSP y cambiarla para que sea más cuantitativa y facilitar su procedimiento para una mayor producción. La presente invención se refiere a esta necesidad de un ensayo de metilación más rápido y cuantitativo.

Sumario de la invención

La presente invención proporciona un procedimiento para detectar una isla CpG metilada dentro de una muestra de ADN genómico, que comprende y se define por el texto de las reivindicaciones.

Breve descripción de los dibujos

50 La figura 1 muestra un esquema de la tecnología MSP (de la técnica anterior) utilizando cebadores de PCR que inicialmente discriminan entre ADN metilado y no metilado (transformado con bisulfito). La parte superior muestra el resultado del procedimiento MSP cuando el ADN genómico no metilado de cadena sencilla se somete inicialmente a transformación con bisulfito de sodio (desaminación de restos no metilados de citosinas a uracilos) seguido de reacciones de PCR con la plantilla transformada, de tal manera que solo aparece un producto de PCR con cebadores que templan específicamente con ADN transformado (y por lo tanto no metilado). La parte inferior muestra el resultado de contraste cuando se utiliza una muestra de ADN genómico metilado de cadena sencilla. De nuevo, el procedimiento proporciona primero tratamiento con bisulfito seguido de reacciones de PCR, de tal manera que solo aparece un producto de PCR con cebadores que templan específicamente con ADN no transformado (y por tanto metilado inicialmente).

La figura 2 muestra un procedimiento alternativo para evaluar la metilación del ADN en ADN genómico tratado con bisulfito de sodio, utilizando cebadores de PCR no discriminantes (con respecto al estado de metilación) directos e inversos para amplificar un locus específico. En esta ilustración, se proporciona ADN genómico desnaturalizado (por ejemplo, cadena sencilla), que tiene un estado de metilación mixto, como se encontraría típicamente en una muestra de análisis. La muestra se transforma en una reacción convencional con bisulfito de sodio y los productos mixtos se amplifican por una reacción de PCR, utilizando cebadores que no se solapan con ningún dinucleótido CpG. Esto produce un conjunto imparcial (con respecto al estado de metilación) heterogéneo de productos de PCR. El conjunto mixto o heterogéneo puede analizarse después con una técnica capaz de detectar diferencias en la secuencia, incluyendo la secuenciación directa del ADN, subclonación de fragmentos de PCR seguido de secuenciación de clones representativos, reacción de extensión de cebadores de nucleótidos sencillos (MS-SNuPE), o digestión con enzimas de restricción (COBRA).

La figura 3 muestra un diagrama de flujo del procedimiento de la invención en varias, pero no todas, realizaciones alternativas para análisis de productos de PCR. No se muestran en esta figura variaciones en la metodología de detección, tales como el uso de tecnología de sonda dual (Lightcycler®) o cebadores fluorescentes (Sunrise® technology). Específicamente, el procedimiento de la invención comienza con una muestra mixta de ADN genómico que es transformado en una reacción con bisulfito de sodio en un conjunto mixto de diferencias de secuencia dependientes de la metilación de acuerdo con procedimientos convencionales (el procedimiento del bisulfito transforma los restos no metilados de citosina en uracilo). Después se realiza una reacción PCR basada en fluorescencia en una reacción "imparcial" de PCR con cebadores que no se solapan con sitios conocidos de metilación CpG (parte izquierda de la figura 3) o en una reacción "parcial" con cebadores que se solapan con dinucleótidos CpG conocidos (parte derecha de la figura 3). La discriminación de secuencia puede producirse tanto al nivel del procedimiento de amplificación (C y D) como al nivel del procedimiento de detección fluorescente (B), o ambos (D). En la parte izquierda (B), se muestra un ensayo cuantitativo para el patrón de metilación en la muestra de ADN genómico, en el que la discriminación de secuencia ocurre a nivel de hibridación de la sonda. En esta versión, la reacción de PCR proporciona una amplificación imparcial en presencia de una sonda fluorescente que se solapa con un sitio supuesto de metilación particular. Un control imparcial para la cantidad de ADN aportado lo proporciona una reacción en la que ni los cebadores ni las sondas se superponen sobre ningún dinucleótido CpG (A). Alternativamente, como se muestra en la parte derecha de la figura 3, se consigue un ensayo cualitativo para la metilación genómica utilizando sondas del conjunto parcial de PCR con oligonucleótidos control que no "cubren" sitios conocidos de metilación (C; una versión basada en fluorescencia de la técnica MSP que no forma parte de la invención), o con oligonucleótidos que cubren sitios potenciales de metilación (D).

La figura 4 muestra un organigrama que es una visión de conjunto del procedimiento de la invención empleando una sonda "TaqMan®" en el procedimiento de amplificación. En resumen, el ADN genómico de doble cadena se trata con bisulfito de sodio y es objeto de uno o dos conjuntos de reacciones de PCR utilizando sondas TaqMan®; concretamente con cebadores parciales y sonda TaqMan® (columna de la izquierda) o cebadores imparciales y sonda TaqMan® (columna de la derecha). La sonda TaqMan® está etiquetada doblemente con un "informador" fluorescente (etiquetado "R" en la figura 4) y con moléculas "interruptoras" (etiquetadas "O"), y se diseña para ser específica para una región relativamente rica en contenido de GC, de forma que se funda a una temperatura aproximadamente 10 °C más alta en el ciclo de PCR que los cebadores directos e inversos. Esto le permite permanecer hibridado completamente durante las etapas de templado/extensión de la PCR. Como la Taq polimerasa sintetiza enzimáticamente una nueva cadena durante la PCR, alcanzará eventualmente a la sonda TaqMan® templada. La actividad Taq polimerasa 5' a 3' endonucleasa desplazará después a la sonda TaqMan® al digerirla, liberando la molécula informadora fluorescente para detección cuantitativa de su señal ahora no interrumpida, utilizando un sistema fluorescente en tiempo real como se describe en este documento.

La figura 5 muestra una comparación del ensayo de la invención con un ensayo COBRA convencional. El panel A muestra un gel COBRA utilizado para determinar el nivel de metilación del ADN en el locus ESR1 en ADN de estado de metilación desconocido (esperma, no metilado) y HCT116 (metilado). Las cantidades relativas de los productos cortados se indican debajo del gel. Un fragmento de 56 pb representa moléculas de ADN en las que el sitio TaqI proximal a la sonda de hibridación está metilado en el ADN genómico original. El fragmento de 86 pb representa moléculas de ADN en las que el sitio proximal TaqI no está metilado y el sitio distal si está metilado. El panel B resume los resultados de COBRA y los compara con los resultados obtenidos con la versión metilada y no metilada del procedimiento de ensayo de la invención. Los resultados se expresan como proporciones entre las reacciones específicas de metilación y una reacción de control. Para las muestras tratadas con bisulfito, la reacción de control fue un ensayo MYOD1 como se describe en el ejemplo 1. Para las muestras no tratadas, se utilizaron como control los cebadores ACTB descritos para las reacciones RT-PCR para verificar la aportación de muestras de ADN no transformado. (Los cebadores ACTB no abarcan un intrón). "No PCR" indica que no se obtuvo producto de PCR en ADN genómico no transformado con cebadores COBRA diseñados para amplificar secuencias de ADN transformado con bisulfito.

La figura 6 ilustra una determinación de la especificidad de los oligonucleótidos. Se analizaron ocho combinaciones diferentes de cebadores directos, sondas y cebadores inversos en muestras de ADN con

metilación conocida o falta de metilación en el locus ESR1. El panel A muestra la nomenclatura utilizada para las combinaciones de los oligos ESR1. "U" se refiere a la secuencia de oligos que templea con ADN no metilado transformado con bisulfito, mientras que "M" se refiere a la versión metilada. La posición 1 indica el cebador directo de PCR, la posición 2 la sonda, y la posición 3 el cebador inverso. Las combinaciones utilizadas para las ocho reacciones se muestran a continuación representando cada pareja de barras experimentos duplicados. Los resultados se expresan como proporciones entre los valores de ESR1 y los valores de control de MYOD1. El panel B representa un análisis de ADN de esperma humano. El panel C representa un análisis de ADN obtenido de la línea celular de un cáncer colorrectal humano HCT116.

La figura 7 muestra un ensayo de la reproducibilidad de las reacciones. Los ensayos se realizaron con ocho reacciones independientes para determinar la reproducibilidad en muestras de origen complejo. Se utilizaron para este propósito un adenocarcinoma colorrectal primario humano y mucosa normal emparejada (muestras 10N y 10T mostradas en la figura 8). Los resultados mostrados en esta figura representan los valores sin procesar obtenidos en el ensayo. Los valores se han normalizado en placa pero no se han corregido para ADN aportado. Las barras indican los valores medios obtenidos en las ocho reacciones diferentes. Las barras de error representan el error estándar de la media.

La figura 8 ilustra una comparación de la expresión de MLH1, la inestabilidad de los microsatélites y la metilación del promotor de MLH1 de 25 muestras emparejadas colorrectales humanas. El organigrama superior muestra los niveles de expresión de MLH1 medido por RT-PCR cuantitativa en tiempo real (TaqMan®) en muestras emparejadas normales (barras sombreadas) y muestras de tumor colorrectal (barras negras). Los niveles de expresión se exponen como una proporción entre las medidas de MLH1 y ACTB. El estado de inestabilidad de los microsatélites (MSI) se indica por los círculos situados entre los dos organigramas. Un círculo negro denota MSI positiva, mientras que un círculo abierto indica que la muestra es MSI negativa, como se determina por análisis de los loci BAT25 y BAT26. El organigrama inferior muestra el estado de metilación del locus MLH1 como se determina por un procedimiento de la invención. Los niveles de metilación se representan como la proporción entre la reacción de MLH1 metilado y la reacción de MYOD1.

Descripción detallada de la invención

La presente invención proporciona un procedimiento rápido, sensible y reproducible con alta productividad para detectar los patrones de metilación en muestras de ácido nucleico. La invención proporciona la modificación dependiente de la metilación del ácido nucleico, y después utiliza procedimientos de amplificación, detección de ácidos nucleicos o ambos para distinguir entre restos metilados y no metilados presentes en la muestra original de ácido nucleico. En una realización preferente, la invención proporciona la determinación del estado de metilación de islas CpG dentro de muestras de ADN genómico.

En contraste con procedimientos anteriores de determinación de patrones de metilación, la detección de los ácidos nucleicos metilados es relativamente rápida y se basa en un desplazamiento mediado por amplificación de sondas específicas de oligonucleótidos. En una realización preferente, la amplificación y detección, de hecho, se producen simultáneamente según los medido por una PCR cuantitativa en tiempo real basada en fluorescencia ("RT-PCR") utilizando sondas TaqMan® de oligonucleótidos específicas, etiquetadas doblemente. Las sondas desplazables pueden diseñarse específicamente para distinguir entre sitios CpG metilados y no metilados presentes en la muestra original de ácido nucleico no modificado.

Como la técnica de PCR específica de metilación ("MSP"; Patente de Estados Unidos N° 5.786.146), la presente invención proporciona ventajas significativas sobre procedimientos previos basados en PCR y otros procedimientos (por ejemplo, análisis de Southern) utilizados para determinar los patrones de metilación. La presente invención es sustancialmente más sensible que un análisis Southern, y facilita la detección de un bajo número (porcentaje) de alelos metilados en muestras de ácidos nucleicos muy pequeñas, así como las muestras embebidas en parafina. Es más, en el caso de ADN genómico, el análisis no está limitado a secuencias de ADN reconocidas por endonucleasas de restricción sensibles a la metilación, permitiendo de este modo un mapeado fino de los patrones de metilación a través de regiones ricas en CpG más amplias. La presente invención elimina también los resultados de cualquier falso positivo, debido a digestiones incompletas por enzimas de restricción sensibles a metilación, inherentes en procedimientos previos de PCR basada en metilación.

La presente invención ofrece también ventajas significativas sobre la tecnología MSP. Se puede aplicar como un procedimiento cuantitativo para medir las cantidades de metilación, y es sustancialmente más rápido. Un avance importante sobre la tecnología MSP es que el gel de electroforesis no es solo una tarea manual que consume tiempo y que limita las capacidades de alto rendimiento, sino que la manipulación y apertura de los tubos de reacción de PCR aumenta la posibilidad de no identificación de la muestra y aumenta enormemente la posibilidad de contaminar futuras reacciones de PCR con productos traza de PCR. El procedimiento convencional para evitar la contaminación de la PCR por incorporación de uracilo y el uso de Uracilo-ADN-Glicoxilasa (AmpErase) es incompatible con la tecnología de bisulfito, debido a la presencia de uracilo en el ADN tratado con bisulfito. Por lo tanto, el evitar la contaminación por productos de PCR en una aplicación de alto rendimiento con ADN tratado con bisulfito es un mayor desafío técnico que la amplificación de ADN no modificado. La presente invención no requiere ninguna manipulación o procesamiento post-PCR. Esto no solo reduce enormemente la cantidad de trabajo implicado en el

análisis de ADN tratado con bisulfito, sino que proporciona también un medio de evitar la manipulación de productos de PCR que puedan contaminar futuras reacciones.

5 Dos factores limitan a MSP, en el mejor de los casos, a aplicaciones semi-cuantitativas. Primero, la información de metilación MSP se obtiene de la comparación de dos reacciones de PCR diferentes (las versiones metiladas y no metiladas). Existen dificultades inherentes en hacer comparaciones cinéticas entre dos reacciones de PCR diferentes sin un procedimiento altamente cuantitativo de seguimiento de la reacción de amplificación, tal como la PCR cuantitativa en tiempo real. El otro problema se refiere al hecho de que la amplificación MSP se realiza por medio de oligonucleótidos específicos de CpG; esto es, por cebadores parciales. A menudo, la secuencia de ADN cubierta por tales cebadores contiene más de un dinucleótido CpG con la consecuencia de que la secuencia amplificada representará solo una de las múltiples secuencias potenciales variantes presentes, dependiendo del patrón de metilación de ADN en el ADN genómico original. Por ejemplo, si el cebador primario es un oligonucleótido de 24 meros que cubre 3 CpG, entonces $2^3 = 8$ diferentes permutaciones teóricas de la secuencia podían surgir en el ADN genómico después de la transformación dentro de esta secuencia de 24 nucleótidos. Si solo se realiza una reacción de metilación completa y una reacción de no metilación completa, entonces solo se analizan 2 de 8 estados de metilación posibles.

10 La situación se complica adicionalmente si los estados de metilación intermedia se amplifican de forma no específica por los cebadores completamente metilados o no metilados. Por consiguiente, la patente MSP describe explícitamente una técnica no cuantitativa basada en la existencia o no existencia de un producto de PCR en la reacción de metilación completa contra la reacción de no metilación completa, en lugar de una comparación de la cinética de las dos reacciones.

20 En contraste, una realización de la presente invención proporciona la amplificación imparcial de todos los posibles estados de metilación utilizando cebadores que no cubren ninguna secuencia CpG en la secuencia de ADN original no modificada. Hasta el punto de que todos los patrones de metilación se amplifican de igual forma, la información cuantitativa sobre los patrones de metilación del ADN pueden después distinguirse del conjunto de PCR resultante por cualquier técnica capaz de detectar diferencias en la secuencia (por ejemplo, PCR basada en fluorescencia).

25 Además, la presente invención es sustancialmente más rápida que MSP. Como se indica anteriormente, MSP depende de la existencia o no existencia de un producto de PCR en la reacción metilada frente a la no metilada para determinar el estado de metilación de una secuencia CpG cubierta por un cebador. Minimamente, esto requiere la realización de un análisis electroforético en gel de agarosa o poliacrilamida (véase Patente de Estados Unidos N° 5.786.146, FIGs 2A-2E, y 3A-3E). Es más, la determinación del estado de metilación de cualquier sitio CpG dentro de una región dada amplificada por MSP requeriría análisis adicionales tales como : (a) análisis con endonucleasas de restricción (por ejemplo, análisis COBRA; Xiong y Laird, *Nucleic Acids Res.* 25:2532-2534, 1997) antes o después de la amplificación y la modificación del ácido nucleico, con la condición de que la región de secuencia no modificada de interés contenga sitios sensibles a la metilación, o que la modificación (por ejemplo, con bisulfito) de como resultado la creación o destrucción de sitios de restricción; (b) reacciones de extensión del cebador de nucleótidos sencillo (MS-SNuPE; Gonzalzo y Jones, *Nucleic Acids Res* 25:2529-2531, 1997); o (c) secuenciación del ADN de los productos de amplificación. Tales análisis adicionales no solo son sujeto de errores (digestión de enzimas de restricción incompleta), sino que también añaden un tiempo sustancial y están a expensas del procedimiento de determinación del estado de metilación de CpG de, por ejemplo, muestras de ADN genómico.

30 40 En contraste, en una realización preferente de la presente invención, la amplificación y la detección ocurren simultáneamente como medidas por una PCR cuantitativa en tiempo real basada en fluorescencia, utilizando sondas específicas de oligonucleótidos etiquetadas doblemente. En principio, el estado de metilación de cualquier secuencia específica de una sonda dentro de una región amplificada puede determinarse contemporáneamente por amplificación, sin requerimiento de una posterior manipulación o análisis.

45 50 Como divulgan los inventores de la MSP, "la única técnica que puede proporcionar análisis más directo que la MSP para la mayoría de los sitios CpG dentro de una región definida es la secuenciación genómica." (Patente de Estados Unidos N° 5.786.146 en 5, línea 15-17). La presente invención proporciona, de hecho, un procedimiento para la secuenciación directa parcial de sitios CpG modificados dentro de una región conocida (secuenciada previamente) de ADN genómico. De este modo, se construyen una serie de sondas TaqMan® específicas de CpG, cada una correspondiente a un sitio de metilación particular en una región dada de ADN amplificado. Esta serie de sondas se utilizan después en reacciones de amplificación paralelas, utilizando alícuotas de una muestra sencilla y modificada de ADN, para determinar simultáneamente el patrón completo de metilación presente en la muestra de ADN genómico original no modificado. Esto se realiza en una fracción del tiempo y el gasto requeridos para la secuenciación directa de la muestra de ADN genómico, y es sustancialmente más sensible. Es más, una realización de la presente invención proporciona una valoración cuantitativa de tal patrón de metilación.

60 La presente invención ha identificado 4 procedimientos de la técnica y kits de diagnóstico asociado, utilizando un agente modificante del ácido nucleico dependiente de la metilación (por ejemplo, bisulfito) para determinar cuantitativa y cualitativamente el estado de metilación de CpG en muestras de ácido nucleico (por ejemplo, muestras de ADN genómico). Los cuatro procedimientos están resumidos en la figura 3 y etiquetados al pie con letras de la A a la D. En conjunto, la discriminación de secuencias metiladas de CpG se diseña para que exista a nivel de la

amplificación, sonda de hibridación o a ambos niveles. Por ejemplo, las aplicaciones C y D utilizan cebadores “parciales” que distinguen entre ácido nucleico modificado metilado o no metilados y proporcionan la discriminación de secuencias metiladas de CpG a nivel de la amplificación por PCR. El procedimiento B utiliza cebadores “imparciales” (que no cubren sitios de metilación CpG), para proporcionar la amplificación imparcial de ácidos nucleicos modificados, pero utiliza preferentemente sondas que distinguen entre ácidos nucleicos modificados metilados y no metilados para proporcionar discriminación cuantitativa de secuencias CpG metiladas a nivel de detección (por ejemplo, solo a nivel de hibridación de sondas fluorescente (o luminiscente)). El procedimiento A no proporciona, por sí mismo, discriminación de secuencias metiladas de CpG tanto a nivel de detección como de amplificación, pero soporta y valida las otras tres aplicaciones proporcionando reacciones de control para ADN aportado.

Procedimiento D. En una primera realización (figura 3, aplicación D), la invención proporciona un procedimiento para detectar cualitativamente un ácido nucleico que contiene CpG metiladas, incluyendo el procedimiento: poner en contacto una muestra que contiene ácido nucleico con un agente modificante que modifica las citosinas no metiladas para producir un ácido nucleico transformado; amplificar el ácido nucleico transformado por medio de dos cebadores de oligonucleótidos en presencia de una sonda de hibridación de oligonucleótidos específica, en la que ambos cebadores y sonda distinguen entre ácido nucleico modificado metilado y no metilado; y detectar el ácido nucleico “metilado” basado en la amplificación mediada por el desplazamiento de la sonda.

El término “modifica”, como se utiliza en este documento, significa la transformación de una citosina no metilada en otro nucleótido por el agente modificante, distinguiendo dicha conversión citosinas metiladas de las no metiladas en la muestra original de ácido nucleico. Preferentemente, el agente transforma la citosina no metilada en uracilo. Preferentemente, el agente utilizado para la modificación de la citosina no metilada es bisulfito de sodio, sin embargo, puede ser sustituido en el procedimiento de la invención por otros agentes modificantes que modifiquen selectivamente las citosinas no metiladas, pero no las citosinas metiladas. El bisulfito de sodio reacciona fácilmente con el doble enlace 5, 6 de la citosina, pero no con la citosina metilada, para producir una citosina sulfonada intermedia que sufre desaminación en condiciones alcalinas para producir uracilo (ejemplo 1). Ya que la Taq polimerasa reconoce el uracilo como timina y 5 metilcitidina (m5C) como citidina, la combinación secuencial del tratamiento con bisulfito de sodio y la amplificación por PCR da como resultado la conversión última de restos de citosina no metilada en timina (C→U→T) y restos de citosina metilada (“mC”) en citosina (mC→mC→C). Por lo tanto, el tratamiento del ADN genómico con bisulfito de sodio crea diferencias en la secuencia dependientes de la metilación por conversión de citosinas no metiladas en uracilo y al hacer la PCR el producto resultante contiene citosina solo en las posiciones donde existe citosina metilada en el ácido nucleico no modificado.

Los “cebadores” de oligonucleótidos, como se utiliza en este documento, significa moléculas de ácido ribonucleico o desoxirribonucleico lineales, de cadena sencilla y oligoméricos capaces de hibridación específica de secuencia (templado) con cadenas complementarias de ácido nucleico modificado o no modificado. Como se utiliza en este documento, los cebadores específicos son preferentemente ADN. Los cebadores de la invención se adhieren a oligonucleótidos de secuencia apropiada y suficientemente largos para proporcionar una eficiente y específica iniciación de la polimerización (extensión del cebador) durante el procedimiento de la amplificación. Como se utiliza en el procedimiento de la invención, los cebadores de oligonucleótidos contienen típicamente 12-30 nucleótidos ó más, aunque pueden contener menos nucleótidos. Preferentemente, el cebador contiene 18-30 nucleótidos. La longitud exacta depende de múltiples factores incluyendo la temperatura (durante la amplificación), el tampón y la composición de nucleótidos. Preferentemente, los cebadores son de cadena sencilla aunque pueden utilizarse cebadores de doble cadena si las cadenas se separan primero. Los cebadores pueden prepararse utilizando cualquier procedimiento adecuado, tales como procedimientos fosfotriéster o fosfodiéster convencionales o realizaciones automáticas que son comúnmente conocidas en la técnica.

Como se utiliza en las realizaciones de la invención de este documento, los cebadores específicos se diseñan preferentemente para que sean sustancialmente complementarios a cada cadena del locus genómico de interés. Típicamente, un cebador es complementario a la cadena negativa (-) del locus (la cadena “inferior” de una molécula de ADN de doble cadena situada horizontalmente) y el otro es complementario a la cadena positiva (+) (cadena “superior”). Como se utiliza en la realización de la aplicación D, los cebadores se diseñan preferentemente para solapar sitios potenciales de metilación del ADN (nucleótidos CpG) y distinguir específicamente el ADN modificado metilado del no metilado. Preferentemente, esta discriminación de secuencias se basa en temperaturas de templado diferentes de oligonucleótidos perfectamente emparejados frente a oligonucleótidos desemparejados. En la realización de la aplicación D, los cebadores se diseñan típicamente para solapar de una a varias secuencias CpG. Preferentemente se diseñan para solapar de 1 a 5 secuencias CpG y más preferentemente de 1 a 4 secuencias CpG. En contraste, en una realización cuantitativa de la invención, los cebadores no se solapan con ninguna secuencia CpG.

En el caso de conjuntos de cebadores completamente “no metilados” (complementarios a cadenas de ácido nucleico modificado no metilado), los cebadores anti-sentido contienen restos de adenosina (“As”) en lugar de restos de guanosina (“Gs”) en la correspondiente secuencia de la cadena (-). Estas As sustituidas en el cebador anti-sentido serán complementarias a los restos de uracilo y timidina (“Us” y “Ts”) en la región correspondiente de cadena (+) resultante de la modificación con bisulfito de los restos de C no metilados (“Cs”) y la posterior amplificación. Los cebadores sentido, en este caso, se diseñan preferentemente para sean complementarios a los productos de

extensión del cebador anti-sentido, y contienen Ts en lugar de Cs no metilada en la secuencia correspondiente de la cadena (+). Estas Ts sustituidas en el cebador con sentido serán complementarias a la As, incorporada en los productos de extensión del cebador anti-sentido en posiciones complementarias a Cs (Us) modificadas en la cadena (+) original.

- 5 En el caso de cebadores completamente metilados (complementarios a cadenas de ácido nucleico que contienen CpG metilados), los cebadores anti-sentido no contienen As en lugar de Gs en la correspondiente secuencia de la cadena (-), que son complementarias a Cs metiladas (es decir, secuencias mCpG) en la cadena (+) original. De forma similar, los cebadores sentido en este caso no contendrán Ts en lugar de Cs metilada en la correspondiente secuencia de mCpG de la cadena (+). Sin embargo, las Cs que no están en las secuencias CpG en regiones cubiertas por los cebadores completamente metilados, y que no están metiladas, se representarán en el juego de cebadores completamente metilados como se describe anteriormente para los cebadores no metilados.

10 Preferentemente, como se emplea en la realización de la aplicación D, el procedimiento de amplificación proporciona amplificar ácido nucleico modificado con bisulfito por medio de dos cebadores de oligonucleótidos en presencia de una sonda específica de hibridación de oligonucleótidos. Ambos cebadores y sonda distinguen entre ácidos nucleicos modificados metilados y no metilados. Es más, la detección del ácido nucleico “metilado” se basa en fluorescencia de sonda mediada por amplificación. En una realización, la fluorescencia se genera por la degradación de la sonda por la actividad 5' a 3' exonucleasa de la enzima polimerasa. En otra realización, la fluorescencia se genera por transferencia de energía fluorescente efectuada entre dos sondas de hibridación adyacentes (Lightcycler® technology) o entre una sonda de hibridación y un cebador. En otra realización, la fluorescencia se genera por el mismo cebador (Sunrise® technology). Preferentemente, el procedimiento de amplificación es una reacción en cadena enzimática que utiliza los cebadores de oligonucleótidos para producir cantidades exponenciales del producto de amplificación, de un locus objetivo, relativo al número de etapas involucradas en la reacción.

15 Como se describe anteriormente, un miembro del conjunto de cebadores es complementario a la cadena (-), mientras que el otro es complementario a la cadena (+). Los cebadores se eligen para agrupar el área de interés a ser amplificada; esto es, el “amplicon”. La hibridación de los cebadores con los ácidos nucleicos objetivo desnaturalizados, seguido de la extensión del cebador con una ADN polimerasa y nucleótidos, da como resultado la síntesis de nuevas cadenas de ácidos nucleicos correspondientes al amplicon. Preferentemente, la ADN polimerasa es Taq polimerasa, como se utiliza comúnmente en la técnica. Aunque puede sustituirse por polimerasas equivalentes con actividad 5' a 3' nucleasa. Ya que las nuevas secuencias del amplicon son también plantillas para los cebadores y la polimerasa, los repetidos ciclos de desnaturalización, templado del cebador y extensión resultan en una producción exponencial del amplicon. El producto de la reacción en cadena es un dúplex de ácido nucleico separado, correspondiente a la secuencia del amplicon, con un final definido por los extremos de los cebadores específicos empleados. Preferentemente, el procedimiento de amplificación utilizado es la PCR (Mullis y col., *Cold Spring Harb. Symp. Quant. Biol.* 51:263-273; Gibbs, *Anal. Chem.* 62:1202-1214, 1990), o más preferentemente, realizaciones automatizadas de la misma que son comúnmente conocidas en la técnica.

20 Preferentemente, las diferencias en las secuencias dependientes de metilación se detectan por procedimientos basados en PCR cuantitativa basada en fluorescencia (PCR cuantitativa en tiempo real, Heid y col., *Genome Res.* 6:986-994, 1996; Gibson y col., *Genome Res.* 6:995-1001, 1996) (por ejemplo, “TaqMan®”, “Lightcycler®”, y “Sunrise®” technologies). Para las tecnologías “TaqMan®” y “Lightcycler®”, la discriminación de las secuencias puede producirse por alguna o ambas de estas dos etapas: (1) etapa de amplificación o (2) etapa de detección de fluorescencia. En el caso de la tecnología “Sunrise®”, las etapas de amplificación y fluorescencia son las mismas. En el caso de la hibridación FRET, se pueden utilizar sondas de formato Lightcycler®, uno o ambos oligonucleótidos FRET para distinguir la diferencia en la secuencia. Más preferentemente, el procedimiento de amplificación, como empleado en todas las realizaciones de la invención de este documento, es aquel que utiliza PCR cuantitativa en tiempo real basada en fluorescencia (Heid y col., *Genome Res.* 6:986-994, 1996) que emplea una sonda de oligonucleótidos fluorescente doblemente etiquetada (TaqMan® PCR, utilizando un sistema de detección de la secuencia ABI Prism 7700, Perkin Elmer Applied Biosystem, Foster City, California).

25 La reacción PCR “TaqMan®” utiliza un par de cebadores de amplificación junto con un oligonucleótido monoextensible interrogante, llamado sonda “TaqMan®”, que se diseña para hibridar con una secuencia rica en GC localizada entre los cebadores directo e inverso (por ejemplo, sentido y anti-sentido). La sonda “TaqMan®” además comprende un “resto informador” fluorescente y un “resto interruptor” covalentemente unidos a restos de unión (por ejemplo, fosforoamidas) sujetadas a nucleótidos del oligonucleótido “TaqMan®”. Ejemplos de moléculas interruptoras e informadoras adecuadas son: los colorantes 6FAM informadores fluorescentes 5' (“FAM”; 2,7 dimetoxi-4,5dicloro-6-carboxi-fluoresceína) y TET y el colorante TAMRA informador 3' (6-carboxitetrametilrodamina) (Livak y col., *PCR Methods Appl.* 4:357-352, 1995; Gibson y col., *Genome Res.* 6:995-1001; 1996, Heid y col., *Genome Res.* 6:986-994, 1996).

30 Un procedimiento para diseñar sondas TaqMan® apropiadas implica utilizar una herramienta de software facilitadora, tal como “Primer Expres”, que puede determinar las variables de situación de islas de CpG dentro de secuencias ricas en GC para proporcionar diferencias en la temperatura de fusión de al menos 10 °C (relativas a las temperaturas de fusión del cebador), debido tanto a secuencia específica (unión más fuerte de GC, en relación a los pares de bases AT), o a la longitud del cebador.

La sonda "TaqMan®" puede cubrir o no sitios de metilación conocidos CpG, dependiendo del procedimiento de invención particular utilizado. Preferentemente, en la realización de la aplicación D, la sonda "TaqMan®" se diseña para que distinga entre ácido nucleico modificado metilado o no metilado por solapamiento de 1 a 5 secuencias CpG. Como se describe anteriormente para los conjuntos de cebadores completamente metilados y completamente no metilados, las sondas "TaqMan®" pueden diseñarse para que sean complementarias tanto a ácidos nucleicos no modificados, o, por las apropiadas sustituciones de bases, a secuencias modificadas con bisulfito que estaban completamente metiladas o completamente no metiladas en la muestra de ácido nucleico original no modificado.

Cada cebador de oligonucleótidos o sonda en la reacción PCR "TaqMan®" puede extenderse en cualquier lugar desde ninguno a muchos dinucleótidos CpG, que dan como resultado cada uno dos variaciones de secuencia diferentes siguiendo el tratamiento con bisulfito (^mCpG, o UpG). Por ejemplo, si un oligonucleótido se extiende por 3 dinucleótidos CpG, entonces el número de posibles variantes de la secuencia que surgen en el ADN genómico es de $2^3 = 8$ secuencias diferentes. Si los cebadores directos e inversos se extienden cada uno por 3 CpG y la sonda de oligonucleótidos (o ambos oligonucleótidos juntos en el caso del formato FRET) se extiende por otros 3, entonces el número total de permutaciones de la secuencia se convierte en $8 \times 8 \times 8 = 512$. En teoría, se podrían diseñar reacciones de PCR separadas para analizar cuantitativamente las cantidades relativas de cada una de estas 512 variantes de secuencia. En la práctica, se puede obtener una cantidad sustancial de información de metilación del análisis de un número mucho menor de variantes de secuencia. Por lo tanto, en su forma más simple, el procedimiento de la invención puede realizarse diseñando reacciones para las variantes completamente metiladas y no metiladas que representan las variantes de secuencia más extremas en un ejemplo hipotético (véase figura 3, aplicación D). La proporción entre estas dos reacciones, o alternativamente la proporción entre la reacción metilada y una reacción de control (figura 3, aplicación A), pueden proporcionar una media del nivel de metilación del ADN en ese locus. En la figura 4 se muestra una visión general más detallada de la versión cualitativa.

La detección de la metilación en la realización de la aplicación D, como en otras realizaciones de este documento, se basa en el desplazamiento mediado por amplificación de la prueba. En teoría, el procedimiento de desplazamiento de la sonda puede diseñarse para dejar la sonda intacta, o que tenga como resultado la digestión de la sonda. Preferentemente, como se utiliza en este documento, el desplazamiento de la sonda se produce por digestión de la sonda durante la amplificación. Durante la fase de extensión del ciclo de PCR, la sonda de hibridación fluorescente se corta por la actividad nucleolítica 5' a 3' de la ADN polimerasa. En el corte de la sonda, la emisión del resto informador ya no se transfiere eficazmente al resto interruptor, dando como resultado un aumento del espectro de emisión fluorescente del resto informador a 518 nm. La intensidad de fluorescencia del resto interruptor (por ejemplo TAMRA), cambia muy poco durante el curso de la amplificación por PCR. Pueden influir varios factores sobre la eficacia de las reacciones de PCR "TaqMan®", incluyendo: concentraciones de magnesio y sal, condiciones de la reacción (tiempo y temperatura), secuencias del cebador; y tamaño del objetivo de PCR (es decir, tamaño del amplicon) y la composición. La optimización de estos factores para producir una óptima intensidad de fluorescencia para un locus genómico dado es obvia para un experto en la técnica de PCR, y las condiciones preferentes se ilustran más adelante en los "ejemplos" de este documento. El amplicon puede variar en tamaño entre 50 a 8.000 pares de bases, o mayor, pero puede ser más pequeño. Típicamente, el amplicon es de 100 a 1000 pares de bases, y preferentemente es de 100 a 500 pares de bases. Preferentemente, la reacción se controla en tiempo real realizando una amplificación por PCR que utiliza placas y tapas ópticas de 96 pocillos, y un detector de secuencia (Prisma ABI) para permitir la medida continua de los espectros fluorescentes de los 96 pocillos del ciclador térmico durante la amplificación por PCR. Preferentemente, el procedimiento D se realiza en combinación con el procedimiento A (figura 3) para proporcionar controles de la cantidad de ácido nucleico aportado, y normalizar datos de placa a placa.

Aplicación C. El procedimiento de la invención puede ser modificado para evitar la discriminación de la secuencia a nivel de la detección del producto de PCR. Por lo tanto, en una realización adicional cualitativa del procedimiento (figura 3, aplicación C), solo se diseñan los cebadores para cubrir dinucleótidos CpG, y la discriminación de la secuencia ocurre solamente a nivel de la amplificación. Preferentemente, la sonda utilizada en esta realización es todavía una sonda TaqMan®, pero se diseña para que no se solape con ninguna secuencia CpG presente en el ácido nucleico original no modificado. La realización de la aplicación C representa una versión de alto rendimiento basada en fluorescencia y en tiempo real de la tecnología MSP, en la que se consigue una mejora sustancial reduciendo el tiempo requerido para la detección de secuencias metiladas de CpG. Preferentemente, las reacciones se controlan en tiempo real realizando una amplificación por PCR que utiliza placas y tapas ópticas de 96 pocillos y un detector de secuencia (prisma ABI) para permitir una medida continua de los espectros de fluorescencia de los 96 pocillos del ciclador térmico durante la amplificación por PCR. Preferentemente, el procedimiento C se realiza en combinación con el procedimiento A para proporcionar controles de la cantidad de ácido nucleico aportado y para normalizar datos de placa en placa.

Aplicación B. El procedimiento de la invención puede también modificarse para evitar la discriminación de la secuencia a nivel de la amplificación PCR (figura 3, A y B). En una realización cuantitativa del procedimiento (figura 3, aplicación B), la sonda se diseña solo para cubrir dinucleótidos CpG, y la discriminación de la secuencia ocurre únicamente a nivel de la hibridación de la sonda. Preferentemente, se utilizan sondas TaqMan®. En esta versión, las variantes de la secuencia que resultan de la etapa de transformación con bisulfito se amplifican con igual eficacia; siempre que no existan sesgos de amplificación inherentes (Warnecke y col. *Nucleic Acids Res.* 25:4422-4426, 1997). El diseño de sondas diferentes para cada una de las diferentes variantes de secuencia asociadas con un

patrón de metilación particular (por ejemplo $2^3 = 8$ sondas en el caso de 3 CpG) permitiría una determinación cuantitativa de la prevalencia relativa de cada permutación de secuencia en el conjunto mixto de productos de PCR. Preferentemente, las reacciones se controlan en tiempo real realizando una amplificación por PCR utilizando placas y tapas ópticas de 96 pocillos y un detector de secuencia (Prisma ABI) para permitir una medida continua de los espectros fluorescentes de los 96 pocillos del ciclador térmico durante la amplificación por PCR. Preferentemente, el procedimiento B se realiza en combinación con el procedimiento A para proporcionar controles de la cantidad de ácido nucleico aportado y para normalizar datos de placa en placa.

Aplicación A. El procedimiento A (figura 3) no proporciona, por sí mismo, discriminación de la secuencia de CpG metilada tanto a nivel de amplificación como de detección, pero da soporte y validez a las otras tres aplicaciones proporcionando reacciones de control de la cantidad de ADN aportado, y para normalizar datos de placa a placa. Por lo tanto, ni los cebadores ni la sonda recubren ningún dinucleótido CpG, luego la reacción representa una amplificación imparcial y la medida de la amplificación utilizando PCR cuantitativa en tiempo real basada en fluorescencia sirve como un control para la cantidad de ADN aportado (figura 3, aplicación A). Preferentemente, el procedimiento A no solo carece de los dinucleótidos CpG en los cebadores y la sonda(s), sino que tampoco contiene ningún CpG dentro del amplicon para evitar cualquier efecto diferencial del tratamiento con bisulfito en el procedimiento de amplificación. Preferentemente, el amplicon para el procedimiento A es una región de ADN que no es frecuentemente objeto de alteraciones en el número de copias, tales como amplificación o delección de genes.

Los resultados obtenidos con la versión cualitativa de la tecnología se describen en los ejemplos a continuación. Se han analizado con excelentes resultados docenas de muestras de tumores humanos utilizando esta tecnología. La alta productividad utilizando una máquina TaqMan® permite la realización de 1100 análisis en tres días con una máquina TaqMan®.

Ejemplo 1

Se realizó un experimento inicial para validar la estrategia de la invención para la valoración del estado de metilación de islas CpG en ADN genómico. Este ejemplo muestra una comparación entre ADN de esperma humano (conocido por estar altamente no metilado) y ADN HCT116 (de una línea celular colorrectal humana, conocida por estar altamente metilada en muchos sitios CpG) con respecto al estado de metilación de islas CpG específicas hipermetiladas de cuatro genes diferentes. Se utilizó el análisis COBRA (análisis de restricción combinado con bisulfito; Xiong y Laird, *Nucleic Acids Res.* 25:2532-2534, 1997) como una medida independiente del estado de metilación. Aislamiento del ADN y tratamiento con bisulfito. En resumen, el ADN genómico se aisló de esperma humano o de células HCT116 con el procedimiento convencional de la digestión con la proteinasa K y extracción con fenolcloroformo (Wolf y col., *Am. J. Hum. Genet.* 51:478-485, 1992). El ADN se trató después con bisulfito de sodio por desnaturalización inicial en NaOH 0,2 M, seguido de adición de bisulfito de sodio e hidroquinona (a concentraciones finales de 3,1 M y 0,5 M respectivamente), incubación durante 16 h a 55 °C, desalinización (sistema de lavado de ADN, Promega), desulfonación con NaOH 0,3 M y precipitación final con etanol. (Xiong y Laird, *supra*, *citing Sadri* y Hornsby, *Nucleic Acids Res.* 24:5058-5059, 1996; véase también Fronmer y col., *Proc. Natl. Acad. Sci. USA* 89:1827-1831, 1992). Después del tratamiento con bisulfito, el ADN fue objeto de un análisis COBRA como el descrito previamente (Xiong y Laird, *supra*) o del procedimiento de amplificación de la invención utilizando PCR cuantitativa en tiempo real basada en fluorescencia (Heid y col., *Genome Res.* 6:986-994, 1996; Gibson y col. *Genome Res.* 6:995-1001, 1996).

Reacciones COBRA y MsNuPE. Los genes ESR1 y APC se analizaron utilizando COBRA (Análisis combinado de restricción de Bisulfito). Para el análisis COBRA, se introdujeron en el ADN genómico diferencias en la secuencia dependientes de metilación por tratamiento convencional con bisulfito, de acuerdo con el procedimiento descrito por Frommer y col. (*Proc. Natl. Acad. Sci. USA* 89:1827-1831, 1992). (se añadió 1 ug de ADN de esperma de salmón como un vehículo antes de que el ADN genómico se tratara con bisulfito de sodio). La amplificación por PCR del ADN transformado por el bisulfito se realizó utilizando cebadores específicos para las islas CpG de interés, seguido de digestión con enzimas de restricción, electroforesis en gel y detección utilizando sondas de hibridación etiquetadas. El conjunto de cebadores directos e inversos utilizados para los genes ESR1 y APC son: TCCTAAACTACTACTCTCC [SEC. ID NO 35], GGTTATTTGGAAAAAGAGTATAG [SEC. ID NO 36] (promotor ESR1); y AGAGAGAAGTAGTTGTGTTAAT [SEC. ID NO 37], ACTACACCAATACAACCACAT [SEC. ID NO 38] (promotor APC), respectivamente.

Los productos de PCR de ESR1 se digirieron con endonucleasas de restricción TaqI y BstUI, mientras que los productos de APC se digirieron con TaqI y SfaNI, para medir la metilación de 3 sitios de metilación CpG para APC y 4 sitios CpG para ESR1. Se hizo una electroforesis con los productos de PCR digeridos en gel de poliacrilamida desnaturizante y se transfirieron a una membrana de nylon (Zetabind; American Bioanalytical) por electrotransferencia. Las membranas se hibridaron con un oligonucleótido etiquetado en el extremo 5' para visualizar los fragmentos de interés digeridos y no digeridos. Las sondas utilizadas son de la siguiente manera: ESR1, AAACCAAACTC [SEC. ID NO. 39]; y APC, CCCACACCAACCAAT [SEC. ID NO 40]. La cuantificación se realizó con el Phosphoimager 445SI (Molecular Dynamics). Los cálculos se realizaron en Microsoft Excel. El nivel de metilación del ADN en los sitios CpG investigados se determinó calculando el porcentaje de los fragmentos de PCR digeridos (Xiong y Laird, *supra*).

MLH1 y CDKN2A se analizaron utilizando MsSNuPE (ensayo de extensión del cebador de nucleótido sencillo sensible a metilación), realizado como describen Gonzalzo y Jones (*Nucleic Acids Res.* 25:2529-2531). La amplificación por PCR del ADN transformado por el bisulfito se realizó utilizando cebadores específicos para las islas CpG de interés, y la detección se realizó utilizando cebadores específicos adicionales (sondas de extensión).

5 Los cebadores directos e inversos utilizados para los genes MLH1 y CDKN2A son: GGAGGTTATAAGAGTAGGGTTAA [SEC. ID NO. 41], CCAACCAATAAAACAAAATACC [SEC. ID NO 42] (promotor MLH1); GTAGGTGGGGAGGAGTTAGTT [SEC. ID NO. 43], TCTAATAACCAACCAACCCCTCC [SEC. ID NO 44] (promotor CDKN2A); y TTGTATTATTTGTTTTTTTGGTAGG [SEC. ID NO 45], CAACTTCTCAAATCATCAATCCACAC [SEC. ID NO 46] (exón 2 de CDKN2A), respectivamente. Las sondas MsSNuPE de extensión se localizan inmediatamente en la posición 5' del CpG a analizar, y las secuencias son:

10 TTTAGTAGAGGTATATAAGTT [SEC. ID NO. 47], TAAGGGGAGAGGAGGAGTTTGAGAAG [SEC. ID NO. 48] (sitios promotores 1 y 2 de MLH1, respectivamente); TTTGAGGGATAGGGT [SEC. ID NO 49], TTTTAGGGGTGTTATATT [SEC. ID NO 50], TTTTTTTGGAAAGATAT [SEC. ID NO 51] (sitios promotores 1, 2 y 3, respectivamente) y GTTGGTGGTGTGTAT [SEC. ID NO 52], AGGTTATGATGGGTAG [SEC. ID NO 53],

15 TATTAGAGGTAGTAATTATGTT [SEC. ID NO 54] (sitios 1, 2 y 3 del exón 2, respectivamente). Se establecieron un par de reacciones para cada muestra utilizando 32p-dCTP o 32p-dTTP para la extensión del nucleótido simple. Los cebadores MsSNuPE extendidos (sondas) se separaron por gel de poliacrilamida desnaturalizante. La cuantificación se realizó utilizando el Phosphoimager.

Análisis de metilación de la invención. El ADN genómico transformado por el bisulfito se amplificó utilizando cebadores de PCR específicos de locus que flanquean una sonda de oligonucleótidos con un colorante fluorescente informador en 5' (6FAM) y un colorante interruptor en 3' (TAMRA) (Livak y col., *PCR methods Appl.* 4:357-362, 1995) (las sondas y cebadores utilizados para los análisis de metilación se enumeran en "Genes, MethyLight Primers and Probe Sequences", en este documento, *infra*). En este ejemplo, los cebadores directo e inverso y las sondas fluorescentes correspondientes se diseñaron para discriminar entre moléculas de ADN transformado por bisulfito completamente metiladas o completamente no metiladas (véase la discusión del diseño del cebador en "Descripción Detallada de la Invención, Procedimiento D", en este documento). Los cebadores y una sonda se diseñaron también para una extensión del gen MYOD1 (gen de diferenciación miogénica), completamente desprovisto de dinucleótidos CpG como una reacción control para la cantidad de ADN aportado. Las reacciones paralelas se realizaron utilizando los procedimientos de la invención con las muestras metiladas y no metiladas (D), u oligos de control (A) de ADN de esperma y HCT116 tratado con bisulfito. Los valores obtenidos para las reacciones metiladas y no metiladas se normalizaron con los valores de las reacciones de control de MYOD1 para dar proporciones que se muestran en la tabla 1 (a continuación).

En un protocolo TaqMan®, la actividad 5' a 3' nucleasa de la ADN Taq polimerasa corta la sonda y libera al informador, cuya fluorescencia se detecta con el detector láser del sistema de detección de secuencia ABI Prism 7700 (Perkin-Elmer, Foster City, CA). Después de cruzar un umbral de detección de fluorescencia, la amplificación por PCR da como resultado una señal proporcional a la cantidad de producto de PCR generado. La cantidad inicial de molde puede obtenerse del número de ciclo al cual la señal fluorescente cruza un umbral en la fase exponencial de la reacción de PCR. Se incluyeron varias muestras de referencia en cada placa de ensayo para verificar la consistencia de placa a placa. Las placas se normalizaron una con otra utilizando estas muestras de referencia. La amplificación por PCR se realizó utilizando placas y tapas ópticas de 96 pocillos con una mezcla final de reacción de 25 ul constituida por 600 nM de cada cebador, 200 nM de la sonda, 200 uM cada uno de dATP, dGTP, dCTP, 400 uM de dUTP, 5,5 mM de MgCl₂, 1X de Tampón A TaqMan® que contiene un colorante de referencia, y ADN transformado por bisulfito y ADN no transformado por bisulfito en las siguientes condiciones: 50 °C durante 2 min, 95 °C durante 10 min, seguido de 40 ciclos de 95 °C durante 15 s y 60 °C durante 1 min.

Genes, cebadores MethyLight y secuencias de sondas. Se eligieron 4 genes humanos para el análisis: (1) APC (coli poliposis adenomatosa) (Hiltunen y col., *Int. J. Cancer* 70:644-648, 1997), (2) ESR1 (receptor de estrógeno) (Issa y col., *Nature Genet.* 7:536-40, 1994); (3) CDKN2A (p16) (Ahuja, *Cancer Res.* 57:3370-3374, 1997); y (4) hMLH1 (reparador de desemparejamientos) (Herman y col., *Proc. Natl. Acad. Sci USA* 95:6870-6875, 1998; Veigt y col., *Proc. Natl. Acad. Sci. USA.* 95:8698-8702, 1998). Se eligieron estos genes porque contienen islas CpG hipermetilizables que son conocidas por sufrir metilación *de novo* en el tejido colorrectal humano en todas las muestras normales y tumorales. El gen humano APC, por ejemplo, se ha vinculado con el desarrollo del cáncer colorrectal y los sitios CpG en las secuencias reguladoras del gen se conocen por ser distintivamente más metiladas en carcinomas de colon, pero no en carcinomas premalignos; en relación con la mucosa normal del colon (Hiltunen y col., *supra*). El gen humano ESR contiene una isla CpG en su extremo 5', que se convierte en cada vez más metilada con la edad en la mucosa colorrectal y está fuertemente metilada en todos los tumores colorrectales humanos analizados (Issa y col., *supra*). El gen reparador de desemparejamientos MLH1 juega un papel fundamental en el desarrollo de casos esporádicos de tumores colorrectales deficientes en la reparación de desemparejamientos (Thibodeau y col., *Science* 260:816-819, 1993). Se ha informado de que MLH1 puede silenciarse transcripcionalmente por hipermetilación del ADN de su región promotora, llevando a inestabilidad del microsatélite (MSI) (Kane y col., *Cancer Res.* 57:808-811, 1997; Ahuja y col., *supra*; Cunningham y col., *Cancer Res.* 58:3455-3460, 1998; Herman y col., *supra*; Veigl y col., *supra*).

Se utilizaron 5 conjuntos de cebadores de PCR y sondas, diseñadas específicamente para secuencias de ADN transformado por bisulfito: (1) un conjunto representa el ADN completamente metilado y completamente no metilado

para el gen ESR1; (2) un conjunto completamente metilado para el gen MLH1; (3) un conjunto completamente metilado y completamente no metilado para el gen APC; y (4) un conjunto completamente metilado y completamente no metilado para el gen CDKN2A (p16); y (5) una referencia interna para el gen MYOD1 como control para el ADN aportado. Los cebadores metilados y no metilados y las correspondientes sondas se diseñaron para solapar 1 a 5 sitios potenciales de dinucleótidos CpG. La referencia interna de cebadores y sondas de MYOD1 se diseñaron para cubrir una región del gen MYOD1 completamente carente de cualquier dinucleótido CpG para permitir una amplificación imparcial por PCR del ADN genómico, sin reparar en el estado de metilación. Como se indica anteriormente, las reacciones de PCR TaqMan® paralelas se realizaron con cebadores específicos para las secuencias de genes transformadas por bisulfito metiladas y/o no metiladas y con los cebadores de referencia de MYOD1. Las secuencias del cebador y de la sonda se enumeran a continuación. En todos los casos, el primer cebador de la lista es el cebador de PCR directo, el segundo es la sonda TaqMan®, y el tercero es el cebador de PCR inverso. ESR1 metilado. (GGCGTTTCGTTTTGGGATTG [SEC. ID NO. 1], 6FAM 5'-CGATAAAACCGAACGACCCGACGA-3' TAMRA [SEC. ID NO 2], GCCGACACGCGAACTCTAA [SEC. ID NO. 3]); ESR1 no metilado (ACACATATCCCACCAACACACAA [SEC. ID NO. 4], 6FAM 5'-CAACCCTACCCCAAAAACCTACAAATCCAA-3'TAMRA [SEC. ID NO 5], AGGAGTTGGTGGAGGGTGT [SEC. ID NO.6]); MLH1 metilado (CTATCGCCGCTCATCGA [SEC. ID NO. 7], 6FAM 5'-CGCGACGTCAAACGCCACTACG-3' TAMRA [SEC. ID NO. 8], CGTTATATATCGTTCGTAGTATTCGTGTTT [SEC. ID NO 9]); APC metilado (TTATATGTTCGGTTACGTGCGTTTATAT [SEC. ID NO 10], 6FAM 5'-CCCGTCGAAAACCCGCCGATTA-3' TAMRA [SEC. ID NO 11], GAACCAAAACGCTCCCAT [SEC. ID NO 12]), APC no metilado (GGTTGTGAGGGTATATTTTTGAGG [SEC. ID NO 13], 6FAM 5'-CCCACCCAACCACACAACCTACCTAAC-3' TAMRA [SEC. ID NO 14], CCAACCCACACTCCACAATAAA [SEC. ID NO 15]); CDKN2A metilado (AACAACTCCGACCTCCT [SEC. ID NO 16], 6FAM 5'-ACCGACCCCGAACCGCG-3' TAMRA [SEC. ID NO 17], TGGAAATTTTCGGTTGATTGGTT [SEC. ID NO 18]); CDKN2A no metilado (CAACCAATCAACCAAAAATTCCAT [SEC. ID NO 19], 6FAM 5'-CCACCACCCACTATCTACTCTCCCCTC-3' TAMRA [SEC. ID NO. 20], GGTGGATTGTGTGTTGGTG [SEC. ID NO. 21]); y MYOD1, (CCAACCTCAAATCCCCTCTAT [SEC. ID NO. 22], 6FAM 5'-TCCCTTCTATTCTAAATCCAACCTAAATACCTCC-3' TAMRA [SEC. ID NO. 23], TGATTAATTTAGATTGGGTTAGAGAAGGA [SEC. ID NO. 24]).

Las tablas 1 y 2 muestran los resultados del análisis del ADN de esperma humano y HCT116 para el estado de metilación de las islas CpG dentro de 4 genes; APC, ESR1, CDKN2A (p16), y Hmlh1. Los resultados se expresan como proporciones entre las reacciones metiladas y no metiladas y una reacción de control (MYOD1). La tabla 1 muestra que el ADN de esperma produce una proporción positiva solo con los cebadores y sondas “no metilados”, consecuente con el conocido estado no metilado del ADN de esperma y consecuente con el porcentaje de valores de metilación determinados por el análisis COBRA. Esto es, la iniciación en el ADN tratado con bisulfito se produce desde regiones que contienen citosinas no metiladas en las secuencias CpG en el correspondiente ADN genómico y, por lo tanto, se desaminan (se transforman en uracilo) por el tratamiento con bisulfito.

Tabla 1

Técnica	COBRA o Ms-SNuPE	Reacción metilada*	Reacción no metilada*
GEN			
APC	0 %	0	49
ESR1	0 %	0	62
CDKN2A	0 %**	0	52
hMLH1	ND	0	ND
* Los valores no representan porcentajes, pero los valores en una cantidad arbitraria pueden compararse cuantitativamente para la misma reacción entre diferentes muestras de ADN, después de la normalización con un gen de control. ** Basado en Ms-SNuPE.			

La tabla 2 muestra los resultados de un análisis de ADN Hct116 para el estado de metilación de islas CpG dentro de cuatro genes; APC, ESR1, CDKN2A (p16) y hMLH1. Los resultados se expresan como proporciones entre reacciones específicas de metilación y una reacción de control (MYOD1). Para el gen ESR se obtuvo una proporción positiva solo con los cebadores y sonda “metilada”; consecuente con el conocido estado metilado del ADN HCT116 y el análisis COBRA. Para el gen CDKN2A, el ADN HCT116 produjo proporciones positivas con ambos cebadores y sonda “metilados” y “no metilados”; consecuente con el conocido estado metilado del ADN HCT116, y con el análisis COBRA que indica solo una metilación parcial de esta región del gen. En contraste, el gen APC dio resultados positivos solo con la reacción no metilada. Sin embargo, esto es enteramente consecuente con el análisis COBRA, e indica que esta región del gen APC no está metilada en el ADN HCT116. Esto puede indicar que el

estado de metilación de esta región reguladora particular del gen APC en el ADN de la línea celular HCT116 es más parecido a aquellas de la mucosa normal del colon o adenomas premalignos en lugar de aquellas de carcinomas de colon (conocidas por estar distintivamente más metiladas).

Tabla 2

Técnica	COBRA y/o Ms-SNuPE	Reacción metilada*	Reacción no metilada*
GEN			
APC	2 %	0	81
ESR1	99 %	36	0
CDKN2A	38 %**	222	26
hMLH1	ND	0	ND

* Los valores no representan porcentajes, pero los valores en una unidad arbitraria pueden compararse cuantitativamente para la misma reacción entre diferentes muestras de ADN, después de la normalización con un gen de control.
** Basado en Ms-SNuPE.

5

Ejemplo 2

Este ejemplo es una comparación entre el procedimiento de la invención (A y D en la figura 3) con un procedimiento COBRA independiente (véase "Procedimientos", anteriormente) para determinar el estado de metilación de una isla CpG asociada con el gen del receptor de estrógeno (ESR1) en la línea celular colorrectal humana HCT116 y en ADN de esperma humano. Se ha informado de que esta isla CpG está altamente metilada en HCT116 y no metilada en el ADN de esperma humano (Xiong y Laird, *supra*; Issa y col., *supra*). El análisis COBRA se describió anteriormente. Dos sitios TaqI dentro de esta isla CpG confirman esto, mostrando una carencia de metilación en el ADN de esperma y casi metilación completa en el ADN HCT116 (figura 5A). Adicionalmente, se compararon los resultados utilizando ADN tratado y no tratado con bisulfito.

Para un análisis, se diseñaron cebadores y sondas de ESR1 completamente "metilados" y completamente "no metilados" y de control de MYOD1 como se describe anteriormente en el "ejemplo 1". Se realizaron 3 reacciones diferentes utilizando los oligos "metilados", "no metilados" o de control en ambos ADN de esperma y HCT116. Como en el ejemplo 1, anteriormente, los valores obtenidos para la reacción metilada y no metilada se normalizaron a los valores para la reacción control de MYOD1 para dar las proporciones que se muestran en la figura 5B. El ADN de esperma produjo una proporción positiva solo con los cebadores y sonda no metilados, consecuente con su estado no metilado. En contraste, el ADN HCT116, con alelos metilados ESR1 predominantemente, generó una proporción positiva solo en la reacción metilada (figura 5B). Ambos ADN de esperma y HCT116 produjeron resultados positivos en las reacciones con MYOD1, indicando que había suficiente aporte de ADN para cada muestra. Como se esperaba, el ADN no transformado con bisulfito no se amplificó con los oligonucleótidos metilados ni con los no metilados (figura 5B). Estos resultados son consecuentes con los resultados de COBRA (figura 5A), sugiriendo que el ensayo de la invención puede discriminar entre alelos metilados y no metilados del gen ESR1. Además, las reacciones son específicas de ADN transformado con bisulfito, lo que impide la generación de falsos positivos debido a una transformación con bisulfito incompleta.

Ejemplo 3

Este ejemplo determina la especificidad de los cebadores y sondas de la invención. La figura 6 muestra un ensayo de todas las posibles combinaciones de cebadores y sondas para más tarde examinar la especificidad de los oligonucleótidos metilados y no metilados en ADN de estado de metilación conocido. Se analizaron ocho combinaciones diferentes de cebadores directos e inversos y sondas "metilados" y "no metilados" de ESR1 (como se describe anteriormente en el "ejemplo 1") en diferentes combinaciones en ensayos con ADN de esperma y HCT116, por duplicado. Los ensayos se realizaron como se describe anteriormente en el ejemplo 1. El panel A (figura 6) muestra la nomenclatura utilizada para las combinaciones de los oligos de ESR1. "U" se refiere a la secuencia del oligo que templea con ADN no metilado transformado con bisulfito, mientras que "M" se refiere a la versión metilada. La posición 1 indica el cebador directo de PCR, la posición 2 la sonda y la posición 3 el cebador inverso. Las combinaciones utilizadas para las ocho reacciones se muestran a continuación cada una con un par de barras, representando experimentos duplicados. Los resultados se expresan como proporciones entre los valores de ESR1 y los valores control de MYOD1. El panel B representa un análisis de ADN de esperma humano. El panel C representa un análisis del ADN obtenido de la línea celular del cáncer colorrectal humano HCT116.

Solo las combinaciones completamente no metilada (reacción 1) o completamente metilada (reacción 8) dieron como

resultado una reacción positiva para el esperma y HCT116, respectivamente. Las otras combinaciones fueron negativas, indicando que las condiciones de PCR no permiten el templado débil de los oligonucleótidos desemparejados. Esta selectividad indica que el procedimiento de la invención puede discriminar entre alelos completamente metilados o completamente no metilados con un alto grado de especificidad.

5 Ejemplo 4

Este ejemplo muestra que el procedimiento de la invención es reproducible. La figura 7 ilustra un análisis del estado de metilación del locus de ESR1 en muestras de ADN obtenidas de un adenocarcinoma colorrectal y mucosa normal emparejada obtenidas de algunos pacientes (muestras 10N y 10T en la figura 8) para estudiar una población heterogénea de alelos metilados y no metilados. Las muestras de tejido colorrectal se recogieron como se describe en el ejemplo 5, a continuación. Además, la reproducibilidad del procedimiento de la invención se analizó realizando ocho reacciones independientes para cada ensayo. Los resultados para las reacciones de ESR1 y la reacción control de MYOD1 representan valores absolutos sin procesar para estas reacciones, en lugar de proporciones, así que los errores estándar de las reacciones individuales se pueden evaluar. Los valores se han normalizado con placas, pero no se han corregido para el ADN aportado. Las barras indican los valores medios obtenidos para las ocho reacciones separadas. Las barras de error representan el error estándar de la media.

La figura 7 muestra que el valor medio para la reacción metilada era más alto en el tumor comparado con el tejido normal mientras que la reacción no metilada muestra el resultado opuesto. Los errores estándar observados para las ocho medidas independientes eran relativamente modestos y comparables a aquellos aportados por otros estudios que utilizan la tecnología TaqMan® (Fink y col., *Nature Med.* 4:1329-1333, 1998). Algo de la variabilidad del procedimiento de la invención puede ser resultado de una amplificación de PCR estocástica (PCR parcial), que puede ocurrir a bajas concentraciones de molde. (Warnecke y col., *Nucleic Acids Res.* 25:4422-4426, 1997). En resumen, estos resultados indican que el procedimiento de la invención puede producir resultados reproducibles para muestras de ADN complejo y heterogéneo.

Ejemplo 5

Este ejemplo muestra una comparación de la expresión de MLH1, la inestabilidad del microsatélite y la metilación del promotor MLH1 en 25 muestras colorrectales humanas emparejadas. El mayor beneficio del procedimiento de la invención es la capacidad de una rápida exploración del estado de metilación de tumores humanos de un locus particular. Además, el análisis de la metilación del ADN como un marcador sustitutivo para la expresión génica es una nueva manera de obtener información clínicamente útil sobre tumores. Se analizó la utilidad del procedimiento de la invención interrogando sobre el estado de metilación del promotor de MLH1. El gen reparador de desapareamientos MLH1 juega un papel fundamental en el desarrollo esporádico de tumores colorrectales deficientes en la reparación del desapareamiento (Thibodeau y col., *Science* 260:816-819, 1993). Se ha informado que MLH1 puede silenciarse transcripcionalmente por hipermetilación del ADN de su región promotor, llevando a inestabilidad del microsatélite (MSI) (Kane y col., *Cancer Res* 57:808-811, 1997; Ahuja y col., *Cancer Res* 57:3370-3374, 1997; Cunningham y col., *Cancer Res.* 58:3455-3460, 1998; Herman, J.g. y col., *Proc. Natl. Sci. USA* 95:6870-6875, 1998; Veigl y col., *Proc. Natl. Acad. Sci. USA* 95-8698-8702, 1998).

Utilizando el procedimiento de la invención de alto rendimiento, como se describe en el ejemplo 1 aplicación D, se analizó el estado de metilación de la isla CpG de MLH1 con 50 muestras constituidas por 25 parejas apareadas de adenocarcinoma colorrectal humano y mucosa normal. Se investigaron los niveles de expresión de MLH1 normalizado a ACTB (β -actina) con análisis de RT-PCR cuantitativa (TaqMan®). Además, se analizó el estado de inestabilidad del microsatélite (MSI) de cada muestra por PCR de los loci BAT25 y BAT26 (Parsons y col., *Cancer Res.* 55:5548-5550, 1995). Las veinticinco muestras apareadas de tumores y de tejidos de mucosa normal se obtuvieron de 25 pacientes con adenocarcinoma colorrectal primario. Los pacientes comprendían 16 hombres y 9 mujeres, con un intervalo de edad de 39 a 88 años, con una media de edad de 68,8. La distancia de la mucosa de especímenes con tumor a los normales fue de 10 a 20 cm. Se retiró quirúrgicamente 2 gramos aproximadamente de tejido y se congeló inmediatamente en nitrógeno líquido, almacenándose a -80 °C hasta el aislamiento del ADN y ARN.

Análisis de RT-PCR cuantitativa y de inestabilidad del microsatélite. La cuantificación de los niveles de ARNm se realizó utilizando detección de fluorescencia en tiempo real. Las reacciones TaqMan® se realizaron como se describe anteriormente para el ensayo pero con la adición de 1U de AmpErasa uracil N-glicoxilasa. Después del aislamiento del ARN se preparó el ADNc de cada muestra como se describió previamente (Bender y col., *Cancer Res* 58:95-101, 1998). En resumen, el ARN se aisló lisando el tejido en un tampón que contiene isocianato de guanidina (4 M), N-lauril sarcosina (0,5 %), citrato de sodio (25 mM), y 2-mercaptoetanol (0,1 M), seguido de extracción convencional con fenol-cloroformo, y precipitación en isopropanol al 50 %/ tampón de lisis al 50 %. Para preparar el ADN, las muestras de ARN fueron transcritas inversamente utilizando hexámeros aleatorios, desoxinucleótidos trifosfatos y transcriptasa inversa Superscript® (Life technologies, Inc., Palo Alto, CA). El ADNc resultante se amplificó después con cebadores específicos para MLH1 y ACTB. Se excluyó la contaminación de las muestras de ARN por ADN genómico por el análisis de todas las muestras de ARN sin conversión previa del ADNc. La expresión relativa del gen se determinó basándose en los ciclos umbral (número de ciclos de PCR requeridos para la detección de una sonda específica) del gen MLH1 y del gen de referencia interna ACTB. Las secuencias del

cebador directo, sonda y cebador inverso de los genes ACTB y MLH1 son: ACTB (TGAGCGAGGCTACAGCTT [SEC. ID NO. 25], 6FAM5'-ACCACCACGGCCGAGCGG-3'TAMRA [SEC. ID NO 26], CCTTAATGTCACACACGATT [SEC. ID NO. 27]); y MLH1 (GTTCTCCGGGAGATGTTGCATA [SEC. ID NO 28], 6FAM5CCTCAGTGGCCCTTGGCACAGC-3'TAMRA [SEC. ID NO 29], TGTTGGTGTGAGAAGGTATAACTTG [SEC. ID NO 30]).

La alteración de numerosas secuencias de poliadenina ("pA"), distribuidas ampliamente a lo largo del genoma, es una característica útil para definir tumores con inestabilidad del microsatélite (lonov y col., *Nature* 363:558-561, 1993). La inestabilidad del microsatélite (MSI) se determinó por PCR y análisis de los loci BAT25 (25 pares de bases pA de extensión desde un intrón del oncogén c-kit) y BAT26 (26 pares de bases pA de extensión desde un intrón del gen reparador de desapareamientos hMSH2) como se describió previamente (Parsons y col., *Cancer Res* 55:5548-5550, 1995). En resumen, los segmentos de los loci BAT25 y BAT26 se amplificaron con 30 ciclos utilizando un cebador etiquetado con ³²P y un cebador no etiquetado para cada locus. Las reacciones se resolvieron en geles de urea-formamida y se expusieron en una película. Los cebadores directos e inversos que fueron utilizados para la amplificación de BAT25 y BAT26 fueron: BAT25 (TCGCCCTCCAAGAATGTAAGT [SEC. ID NO 31], TCTGCATTTTAACTATGGCTC [SEC. ID NO 32]); y BAT26 (TGACTACTTTTGGACTTCAGCC [SEC. ID NO 33], AACCATTC AACATTTTAAACCC [SEC. ID NO 34]).

La figura 8 muestra la correlación entre la expresión del gen MLH1, el estado de MSI y la metilación del promotor de MLH1, como se determina por el procedimiento de la invención. El organigrama superior muestra los niveles de expresión de MLH1 medidos por RT-PCR cuantitativa en tiempo real (TaqMan®) en muestras apareadas normales (barras sombreadas) y muestras de tumores colorrectales (barras negras). Los niveles de expresión se disponen como una proporción entre las medidas de MLH1 y ACTB. El estado de inestabilidad del microsatélite (MSI) se indica por los círculos situados entre los dos organigramas. Un círculo negro denota positividad MSI, mientras que un círculo blanco indica que la muestra es MSI negativa, como se determina por análisis de los loci BAT26 y BAT25. El organigrama inferior muestra el estado de metilación del locus de MLH1 como se determina por el procedimiento de la invención. Los niveles de metilación se representan como la proporción entre la reacción metilada de MLH1 y la reacción de MYOD1.

Cuatro tumores colorrectales tuvieron niveles de metilación significativos elevados comparados con el tejido normal correspondiente. Uno de estos tumores (tumor 17) exhibió un grado particularmente alto de metilación de MLH1, como se valora por el procedimiento de la invención. El tumor 17 fue la única muestra que fue MSI positiva (círculo negro) y mostró un silenciamiento transcripcional de MLH1. Los restantes tumores metilados expresaron MLH1 a niveles modestos y fueron MSI negativos (círculo blanco). Estos resultados muestran que MLH1 estaba metilado en los dos alelos en el tumor 17, dando como resultado un silencio epigenético y la consecuente inestabilidad del microsatélite, mientras que los otros tumores mostraron menor grado de hipermetilación del promotor de MLH1 y podrían tener un solo alelo metilado, permitiendo la expresión del alelo inalterado. Por consiguiente, el procedimiento de la invención fue capaz de generar rápidamente información biológica significativa, tal como hipermetilación de islas CpG en tumores humanos, que están asociados con el silenciamiento transcripcional de genes relevantes en el proceso del cáncer.

LISTADO DE SECUENCIAS

(1) INFORMACIÓN GENERAL:

- (i) INVENTORES: Peter W. Laird, Cindy A. Eads y Kathleen D. Danenberg
- (ii) TÍTULO DE LA INVENCION: PROCEDIMIENTO PARA ANÁLISIS DE METILACIÓN DEL ADN DE ALTO RENDIMIENTO
- (iii) NÚMERO DE SECUENCIAS: 54
- (iv) DIRECCIÓN DE CORRESPONDENCIA:
 - (A) DESTINATARIO: Davis Wright Tremaine LLP
 - (B) CALLE: 1501 Fourth Avenue 2600 Century Square
 - (C) CIUDAD: Seattle
 - (D) ESTADO: Washington
 - (E) PAÍS: USA
 - (F) CÓDIGO POSTAL (ZIP): 98101-1688
- (v) FORMA LEGIBLE POR ORDENADOR:
 - (A) TIPO DE MEDIO: Disquete de 3,5 pulgadas con 1,44 MB de almacenamiento

- (B) ORDENADOR: PC compatible
- (C) SISTEMA OPERATIVO: Windows 95
- (D) SOFTWARE: Word 97

(vi) DATOS DE LA SOLICITUD PRESENTE:

- 5
- (A) NÚMERO DE SOLICITUD:
 - (B) FECHA DE PRESENTACIÓN:
 - (C) CLASIFICACIÓN:

(vii) DATOS DE LA SOLICITUD ANTERIOR: N/A

- 10
- (A) NÚMERO DE SOLICITUD: N/A
 - (B) FECHA DE PRESENTACIÓN: N/A

(viii) INFORMACIÓN DEL ABOGADO/AGENTE:

- (A) NOMBRE: Jeffrey B. Oster
- (B) NÚMERO DE REGISTRO: 32585
- (C) NÚMERO DE REFERENCIA/EXPEDIENTE: 47675-9WO

15 (ix) INFORMACIÓN DE TELECOMUNICACIÓN:

- (A) TELÉFONO: (206) 628-771
- (B) TELEFAX: (206) 628-7699

(2) INFORMACIÓN PARA LA SEC. ID NO: 1:

(i) CARACTERÍSTICAS DE LA SECUENCIA:

- 20
- (A) LONGITUD: 19 pares de bases
 - (B) TIPO: ácido nucleico
 - (C) CADENA: sencilla
 - (D) TOPOLOGÍA: lineal

(ii) TIPO DE MOLÉCULA: ADN

25 (iii) HIPOTÉTICA: No

(xi) DESCRIPCIÓN DE LA SECUENCIA: SEC. ID NO: 1:

GGCGTTCGTT TTGGGATTG 19

(2) INFORMACIÓN PARA LA SEC. ID NO: 2:

(i) CARACTERÍSTICAS DE LA SECUENCIA:

- 30
- (A) LONGITUD: 24 pares de bases
 - (B) TIPO: ácido nucleico
 - (C) CADENA: sencilla
 - (D) TOPOLOGÍA: lineal

(ii) TIPO DE MOLÉCULA: ADN

35 (iii) HIPOTÉTICA: No

(ix) CARACTERÍSTICA:

((a) NOMBRE/LLAVE: sustitución 5' con un colorante fluorescente informador 6FAM (2,7-dimetoxi-4,5-dicloro-6-carboxi-fluoresceína-forforoamidita-citosina); sustitución 3' con un resto interruptor colorante TAMRA (6-carboxitetrametilrodamina).

(xi) DESCRIPCIÓN DE LA SECUENCIA: SEC. ID NO: 2:

5 CGATAAAACC GAACGACCCG ACGA 24

(2) INFORMACIÓN PARA LA SEC. ID NO: 3:

(i) CARACTERÍSTICAS DE LA SECUENCIA:

(A) LONGITUD: 19 pares de bases

(B) TIPO: ácido nucleico

10 (C) CADENA: sencilla

(D) TOPOLOGÍA: lineal

(ii) TIPO DE MOLÉCULA: ADN

(iii) HIPOTÉTICA: No

(xi) DESCRIPCIÓN DE LA SECUENCIA: SEC. ID NO 3:

15

GCCGACACGC GAACTCTAA 19

(2) INFORMACIÓN PARA LA SEC. ID NO: 4:

(i) CARACTERÍSTICAS DE LA SECUENCIA:

(A) LONGITUD: 23 pares de bases

20 (B) TIPO: ácido nucleico

(C) CADENA: sencilla

(D) TOPOLOGÍA: lineal

(ii) TIPO DE MOLÉCULA: ADN

(iii) HIPOTÉTICA: No

25 (xi) DESCRIPCIÓN DE LA SECUENCIA: SEC. ID NO 4:

ACACATATCC CACCAACACA CAA 23

(2) INFORMACIÓN PARA LA SEC. ID NO: 5:

(i) CARACTERÍSTICAS DE LA SECUENCIA:

(A) LONGITUD: 30 pares de bases

30 (B) TIPO: ácido nucleico

(C) CADENA: sencilla

(D) TOPOLOGÍA: lineal

(ii) TIPO DE MOLÉCULA: ADN

(iii) HIPOTÉTICA: No

35 (ix) CARACTERÍSTICA:

((a) NOMBRE/LLAVE: sustitución 5' con un colorante fluorescente informador 6FAM (2,7-dimetoxi-4,5-dicloro-6-carboxi-fluoresceína-forforoamidita-citosina); sustitución 3' con un resto interruptor colorante TAMRA (6-carboxitetrametilrodamina).

(xi) DESCRIPCIÓN DE LA SECUENCIA: SEC. ID NO 5:

CAACCCTACC CCAAAAACCT ACAAATCCAA 30

(2) INFORMACIÓN PARA LA SEC. ID NO: 6:

(i) CARACTERÍSTICAS DE LA SECUENCIA:

- 5 (A) LONGITUD: 21 pares de bases
 (B) TIPO: ácido nucleico
 (C) CADENA: sencilla
 (D) TOPOLOGÍA: lineal

(ii) TIPO DE MOLÉCULA: ADN

10 (iii) HIPOTÉTICA: No

(xi) DESCRIPCIÓN DE LA SECUENCIA: SEC. ID NO 6:

AGGAGTTGGT GGAGGGTGTT T 21

(2) INFORMACIÓN PARA LA SEC. ID NO: 7:

(i) CARACTERÍSTICAS DE LA SECUENCIA:

- 15 (A) LONGITUD: 18 pares de bases
 (B) TIPO: ácido nucleico
 (C) CADENA: sencilla
 (D) TOPOLOGÍA: lineal

(ii) TIPO DE MOLÉCULA: ADN

20 (iii) HIPOTÉTICA: No

(xi) DESCRIPCIÓN DE LA SECUENCIA: SEC. ID NO 7:

CTATCGCCGC CTCATCGT 18

(2) INFORMACIÓN PARA LA SEC. ID NO: 8:

(i) CARACTERÍSTICAS DE LA SECUENCIA:

- 25 (A) LONGITUD: 22 pares de bases
 (B) TIPO: ácido nucleico
 (C) CADENA: sencilla
 (D) TOPOLOGÍA: lineal

(ii) TIPO DE MOLÉCULA: ADN

30 (iii) HIPOTÉTICA: No

(ix) CARACTERÍSTICA:

((a) NOMBRE/LLAVE: sustitución 5' con un colorante fluorescente informador 6FAM (2,7-dimetoxi-4,5-dicloro-6-carboxi-fluoresceína-forforoamidita-citosina); sustitución 3' con un resto interruptor colorante TAMRA (6-carboxitetrametilrodamina).

35 (xi) DESCRIPCIÓN DE LA SECUENCIA: SEC. ID NO 8:

CGCGACGTCA AACGCCACTA CG 22

(2) INFORMACIÓN PARA LA SEC. ID NO: 9:

- (i) CARACTERÍSTICAS DE LA SECUENCIA:
- (A) LONGITUD: 30 pares de bases
 - (B) TIPO: ácido nucleico
 - (C) CADENA: sencilla
 - (D) TOPOLOGÍA: lineal
- 5
- (ii) TIPO DE MOLÉCULA: ADN
- (iii) HIPOTÉTICA: No
- (xi) DESCRIPCIÓN DE LA SECUENCIA: SEC. ID NO 9:
- CGTTATATAT CGTTCGTAGT ATTCGTGTTT 30
- 10 (2) INFORMACIÓN PARA LA SEC. ID NO: 10:
- (i) CARACTERÍSTICAS DE LA SECUENCIA:
- (A) LONGITUD: 27 pares de bases
 - (B) TIPO: ácido nucleico
 - (C) CADENA: sencilla
 - (D) TOPOLOGÍA: lineal
- 15
- (ii) TIPO DE MOLÉCULA: ADN
- (iii) HIPOTÉTICA: No
- (xi) DESCRIPCIÓN DE LA SECUENCIA: SEC. ID NO 10:
- 20 TATATGTCG GTTACGTGCG TTTATAT 27
- (2) INFORMACIÓN PARA LA SEC. ID NO: 11:
- (i) CARACTERÍSTICAS DE LA SECUENCIA:
- (A) LONGITUD: 22 pares de bases
 - (B) TIPO: ácido nucleico
 - (C) CADENA: sencilla
 - (D) TOPOLOGÍA: lineal
- 25
- (ii) TIPO DE MOLÉCULA: ADN
- (iii) HIPOTÉTICA: No
- (ix) CARACTERÍSTICA:
- 30 ((a) NOMBRE/LLAVE: sustitución 5' con un colorante fluorescente informador 6FAM (2,7-dimetoxi-4,5-dicloro-6-carboxi-fluoresceína-forfóramidita-citosina); sustitución 3' con un resto interruptor colorante TAMRA (6-carboxitetrametilrodamina).
- (xi) DESCRIPCIÓN DE LA SECUENCIA: SEC. ID NO 11:
- CCCGTCGAAA ACCCGCCGAT TA 22
- 35 (2) INFORMACIÓN PARA LA SEC. ID NO: 12:
- (i) CARACTERÍSTICAS DE LA SECUENCIA:
- (A) LONGITUD: 19 pares de bases

(B) TIPO: ácido nucleico

(C) CADENA: sencilla

(D) TOPOLOGÍA: lineal

(ii) TIPO DE MOLÉCULA: ADN

5

(iii) HIPOTÉTICA: No

(xi) DESCRIPCIÓN DE LA SECUENCIA: SEC. ID NO 12:

GAACCAAAAC GCTCCCAT 19

(2) INFORMACIÓN PARA LA SEC. ID NO: 13:

(i) CARACTERÍSTICAS DE LA SECUENCIA:

10

(A) LONGITUD: 25 pares de bases

(B) TIPO: ácido nucleico

(C) CADENA: sencilla

(D) TOPOLOGÍA: lineal

(ii) TIPO DE MOLÉCULA: ADN

15

(iii) HIPOTÉTICA: No

(xi) DESCRIPCIÓN DE LA SECUENCIA: SEC. ID NO 13:

GGGTTGTGAG GGTATATTTT TGAGG 25

(2) INFORMACIÓN PARA LA SEC. ID NO: 14:

(i) CARACTERÍSTICAS DE LA SECUENCIA:

20

(A) LONGITUD: 28 pares de bases

(B) TIPO: ácido nucleico

(C) CADENA: sencilla

(D) TOPOLOGÍA: lineal

(ii) TIPO DE MOLÉCULA: ADN

25

(iii) HIPOTÉTICA: No

ix) CARACTERÍSTICA:

((a) NOMBRE/LLAVE: sustitución 5' con un colorante fluorescente informador 6FAM (2,7-dimetoxi-4,5-dicloro-6-carboxi-fluoresceína-forforamidita-citosina); sustitución 3' con un resto interruptor colorante TAMRA (6-carboxitetrametilrodamina).

30

(xi) DESCRIPCIÓN DE LA SECUENCIA: SEC. ID NO 14:

CCCACCCAAC CACACAACCT ACCTAACC 28

(2) INFORMACIÓN PARA LA SEC. ID NO: 15:

(i) CARACTERÍSTICAS DE LA SECUENCIA:

35

(A) LONGITUD: 22 pares de bases

(B) TIPO: ácido nucleico

(C) CADENA: sencilla

(D) TOPOLOGÍA: lineal

(ii) TIPO DE MOLÉCULA: ADN

(iii) HIPOTÉTICA: No

(xi) DESCRIPCIÓN DE LA SECUENCIA: SEC. ID NO 15:

CCAACCCACA CTCCACAATA AA 22

5 (2) INFORMACIÓN PARA LA SEC. ID NO: 16:

(i) CARACTERÍSTICAS DE LA SECUENCIA:

(A) LONGITUD: 19 pares de bases

(B) TIPO: ácido nucleico

(C) CADENA: sencilla

10 (D) TOPOLOGÍA: lineal

(ii) TIPO DE MOLÉCULA: ADN

(iii) HIPOTÉTICA: No

(xi) DESCRIPCIÓN DE LA SECUENCIA: SEC. ID NO 16:

AACAACGTCC GCACCTCCT 19

15 (2) INFORMACIÓN PARA LA SEC. ID NO: 17:

(i) CARACTERÍSTICAS DE LA SECUENCIA:

(A) LONGITUD: 18 pares de bases

(B) TIPO: ácido nucleico

(C) CADENA: sencilla

20 (D) TOPOLOGÍA: lineal

(ii) TIPO DE MOLÉCULA: ADN

(iii) HIPOTÉTICA: No

(ix) CARACTERÍSTICA:

25 ((a) NOMBRE/LLAVE: sustitución 5' con un colorante fluorescente informador 6FAM (2,7-dimetoxi-4,5-dicloro-6-carboxi-fluoresceína-forforoamidita-citosina); sustitución 3' con un resto interruptor colorante TAMRA (6-carboxitetrametilrodamina).

(xi) DESCRIPCIÓN DE LA SECUENCIA: SEC. ID NO 17:

ACCCGACCCC GAACCGCG 18

(2) INFORMACIÓN PARA LA SEC. ID NO: 18:

30 (i) CARACTERÍSTICAS DE LA SECUENCIA:

(A) LONGITUD: 22 pares de bases

(B) TIPO: ácido nucleico

(C) CADENA: sencilla

(D) TOPOLOGÍA: lineal

35 (ii) TIPO DE MOLÉCULA: ADN

(iii) HIPOTÉTICA: No

(xi) DESCRIPCIÓN DE LA SECUENCIA: SEC. ID NO 18:

TGGAATTTTC GGTGATTGG TT 22

(2) INFORMACIÓN PARA LA SEC. ID NO: 19:

(i) CARACTERÍSTICAS DE LA SECUENCIA:

(A) LONGITUD: 24 pares de bases

5 (B) TIPO: ácido nucleico

(C) CADENA: sencilla

(D) TOPOLOGÍA: lineal

(ii) TIPO DE MOLÉCULA: ADN

(iii) HIPOTÉTICA: No

10 (xi) DESCRIPCIÓN DE LA SECUENCIA: SEC. ID NO 19:

CAACCAATCA ACCAAAAATT CCAT 24

(2) INFORMACIÓN PARA LA SEC. ID NO: 20:

(i) CARACTERÍSTICAS DE LA SECUENCIA:

(A) LONGITUD: 28 pares de bases

15 (B) TIPO: ácido nucleico

(C) CADENA: sencilla

(D) TOPOLOGÍA: lineal

(ii) TIPO DE MOLÉCULA: ADN

(iii) HIPOTÉTICA: No

20 (ix) CARACTERÍSTICA:

((a) NOMBRE/LLAVE: sustitución 5' con un colorante fluorescente informador 6FAM (2,7-dimetoxi-4,5-dicloro-6-carboxi-fluoresceína-fororoamidita-citosina); sustitución 3' con un resto interruptor colorante TAMRA (6-carboxitetrametilrodamina).

(xi) DESCRIPCIÓN DE LA SECUENCIA: SEC. ID NO 20:

25 CCACCACCCA CTATCTACTC TCCCCCTC 28

(2) INFORMACIÓN PARA LA SEC. ID NO: 21:

(i) CARACTERÍSTICAS DE LA SECUENCIA:

(A) LONGITUD: 22 pares de bases

30 (B) TIPO: ácido nucleico

(C) CADENA: sencilla

(D) TOPOLOGÍA: lineal

(ii) TIPO DE MOLÉCULA: ADN

(iii) HIPOTÉTICA: No

(xi) DESCRIPCIÓN DE LA SECUENCIA: SEC. ID NO 21:

35 GGTGGATTGT GTGTGTTTGG TG 22

(2) INFORMACIÓN PARA LA SEC. ID NO: 22:

(i) CARACTERÍSTICAS DE LA SECUENCIA:

(A) LONGITUD: 23 pares de bases

(B) TIPO: ácido nucleico

(C) CADENA: sencilla

(D) TOPOLOGÍA: lineal

5 (ii) TIPO DE MOLÉCULA: ADN

(iii) HIPOTÉTICA: No

(xi) DESCRIPCIÓN DE LA SECUENCIA: SEC. ID NO 22:

CCAACTCCAA ATCCCCTCTC TAT 23

(2) INFORMACIÓN PARA LA SEC. ID NO: 23:

10 (i) CARACTERÍSTICAS DE LA SECUENCIA:

(A) LONGITUD: 36 pares de bases

(B) TIPO: ácido nucleico

(C) CADENA: sencilla

(D) TOPOLOGÍA: lineal

15 (ii) TIPO DE MOLÉCULA: ADN

(iii) HIPOTÉTICA: No

(ix) CARACTERÍSTICA:

((a) NOMBRE/LLAVE: sustitución 5' con un colorante fluorescente informador 6FAM (2,7-dimetoxi-4,5-dicloro-6-carboxi-fluoresceína-forforoamidita-citosina); sustitución 3' con un resto interruptor colorante TAMRA (6-carboxitetrametilrodamina).

20 (xi) DESCRIPCIÓN DE LA SECUENCIA: SEC. ID NO 23:

TCCCTTCCTA TTCCTAAATC CAACCTAAAT ACCTCC 36

(2) INFORMACIÓN PARA LA SEC. ID NO: 24:

(i) CARACTERÍSTICAS DE LA SECUENCIA:

25 (A) LONGITUD: 30 pares de bases

(B) TIPO: ácido nucleico

(C) CADENA: sencilla

(D) TOPOLOGÍA: lineal

(ii) TIPO DE MOLÉCULA: ADN

30 (iii) HIPOTÉTICA: No

(xi) DESCRIPCIÓN DE LA SECUENCIA: SEC. ID NO 24:

TGATTAATTT AGATTGGGTT TGAGAAGGA 30

(2) INFORMACIÓN PARA LA SEC. ID NO: 25:

(i) CARACTERÍSTICAS DE LA SECUENCIA:

35 (A) LONGITUD: 18 pares de bases

(B) TIPO: ácido nucleico

(C) CADENA: sencilla

(D) TOPOLOGÍA: lineal

(ii) TIPO DE MOLÉCULA: ADN

(iii) HIPOTÉTICA: No

(xi) DESCRIPCIÓN DE LA SECUENCIA: SEC. ID NO 25:

5 TGAGCGCGGC TACAGCTT 18

(2) INFORMACIÓN PARA LA SEC. ID NO: 26:

(i) CARACTERÍSTICAS DE LA SECUENCIA:

(A) LONGITUD: 18 pares de bases

(B) TIPO: ácido nucleico

10 (C) CADENA: sencilla

(D) TOPOLOGÍA: lineal

(ii) TIPO DE MOLÉCULA: ADN

(iii) HIPOTÉTICA: No

(ix) CARACTERÍSTICA:

15 ((a) NOMBRE/LLAVE: sustitución 5' con un colorante fluorescente informador 6FAM (2,7-dimetoxi-4,5-dicloro-6-carboxi-fluoresceína-forforoamidita-citosina); sustitución 3' con un resto interruptor colorante TAMRA (6-carboxitetrametilrodamina).

(xi) DESCRIPCIÓN DE LA SECUENCIA: SEC. ID NO 26:

ACCACCACGG CCGAGCGG 18

20 (2) INFORMACIÓN PARA LA SEC. ID NO: 27:

(i) CARACTERÍSTICAS DE LA SECUENCIA:

(A) LONGITUD: 20 pares de bases

(B) TIPO: ácido nucleico

(C) CADENA: sencilla

25 (D) TOPOLOGÍA: lineal

(ii) TIPO DE MOLÉCULA: ADN

(iii) HIPOTÉTICA: No

(xi) DESCRIPCIÓN DE LA SECUENCIA: SEC. ID NO 27:

CCTTAATGTC ACACACGATT 20

30 (2) INFORMACIÓN PARA LA SEC. ID NO: 28:

(i) CARACTERÍSTICAS DE LA SECUENCIA:

(A) LONGITUD: 22 pares de bases

(B) TIPO: ácido nucleico

(C) CADENA: sencilla

35 (D) TOPOLOGÍA: lineal

(ii) TIPO DE MOLÉCULA: ADN

(iii) HIPOTÉTICA: No

(xi) DESCRIPCIÓN DE LA SECUENCIA: SEC. ID NO 28:

GTTCTCCGGG AGATGTTGCA TA 22

(2) INFORMACIÓN PARA LA SEC. ID NO: 29:

(i) CARACTERÍSTICAS DE LA SECUENCIA:

- 5 (A) LONGITUD: 22 pares de bases
 (B) TIPO: ácido nucleico
 (C) CADENA: sencilla
 (D) TOPOLOGÍA: lineal

(ii) TIPO DE MOLÉCULA: ADN

10 (iii) HIPOTÉTICA: No

(ix) CARACTERÍSTICA:

((a) NOMBRE/LLAVE: sustitución 5' con un colorante fluorescente informador 6FAM (2,7-dimetoxi-4,5-dicloro-6-carboxi-fluoresceína-forforoamidita-citosina); sustitución 3' con un resto interruptor colorante TAMRA (6-carboxitetrametilrodamina).

15 (xi) DESCRIPCIÓN DE LA SECUENCIA: SEC. ID NO 29:

CCTCAGTGGG CCTTGGCACA GC 22

(2) INFORMACIÓN PARA LA SEC. ID NO: 30:

(i) CARACTERÍSTICAS DE LA SECUENCIA:

- 20 (A) LONGITUD: 26 pares de bases
 (B) TIPO: ácido nucleico
 (C) CADENA: sencilla
 (D) TOPOLOGÍA: lineal

(ii) TIPO DE MOLÉCULA: ADN

(iii) HIPOTÉTICA: No

25 (xi) DESCRIPCIÓN DE LA SECUENCIA: SEC. ID NO 30:

TGGTGGTGT GAGAAGGTAT AACTTG 26

(2) INFORMACIÓN PARA LA SEC. ID NO: 31:

(i) CARACTERÍSTICAS DE LA SECUENCIA:

- 30 (A) LONGITUD: 20 pares de bases
 (B) TIPO: ácido nucleico
 (C) CADENA: sencilla
 (D) TOPOLOGÍA: lineal

(ii) TIPO DE MOLÉCULA: ADN

(iii) HIPOTÉTICA: No

35 (X) INFORMACIÓN DE PUBLICACIÓN:

(A) AUTORES: Parsons, y col.

(B) TÍTULO: Inestabilidad del microsatélite y mutaciones del factor de crecimiento transformante B tipo II del receptor del gen en cáncer colorrectal.

(C) REVISTA: Cancer Res.

(D) VOLUMEN: 55

(F) PÁGINAS: 5543-5550

(G) FECHA: 01-DIC-1995

5 (xi) DESCRIPCIÓN DE LA SECUENCIA: SEC. ID NO 31:

TCGCCTCCAA GAATGTAAGT 20

(2) INFORMACIÓN PARA LA SEC. ID NO: 32:

(i) CARACTERÍSTICAS DE LA SECUENCIA:

(A) LONGITUD: 21 pares de bases

10 (B) TIPO: ácido nucleico

(C) CADENA: sencilla

(D) TOPOLOGÍA: lineal

(ii) TIPO DE MOLÉCULA: ADN

(iii) HIPOTÉTICA: No

15 (X) INFORMACIÓN DE PUBLICACIÓN:

(A) AUTORES: Parsons, y col.

(B) TÍTULO: Inestabilidad del microsatélite y mutaciones del factor de crecimiento transformante B tipo II del receptor del gen en cáncer colorrectal.

(C) REVISTA: Cancer Res.

20 (D) VOLUMEN: 55

(F) PÁGINAS: 5548-5550

(G) FECHA: 01-DIC-1995

(xi) DESCRIPCIÓN DE LA SECUENCIA: SEC. ID NO 32:

TCTGCATTTT AACTATGGT C 21

25 (2) INFORMACIÓN PARA LA SEC. ID NO: 33:

(i) CARACTERÍSTICAS DE LA SECUENCIA:

(A) LONGITUD: 21 pares de bases

(B) TIPO: ácido nucleico

(C) CADENA: sencilla

30 (D) TOPOLOGÍA: lineal

(ii) TIPO DE MOLÉCULA: ADN

(iii) HIPOTÉTICA: No

(X) INFORMACIÓN DE PUBLICACIÓN:

(A) AUTORES: Parsons, y col.

35 (B) TÍTULO: Inestabilidad del microsatélite y mutaciones del factor de crecimiento transformante B tipo II del receptor del gen en cáncer colorrectal.

(C) REVISTA: Cancer Res.

(D) VOLUMEN: 55

(F) PÁGINAS: 5548-5550

(G) FECHA: 01-DIC-1995

(xi) DESCRIPCIÓN DE LA SECUENCIA: SEC. ID NO 33:

5 TGACTACTTT TGACTTCAGC C 21

(2) INFORMACIÓN PARA LA SEC. ID NO: 34:

(i) CARACTERÍSTICAS DE LA SECUENCIA:

(A) LONGITUD: 22 pares de bases

(B) TIPO: ácido nucleico

10 (C) CADENA: sencilla

(D) TOPOLOGÍA: lineal

(ii) TIPO DE MOLÉCULA: ADN

(iii) HIPOTÉTICA: No

(X) INFORMACIÓN DE PUBLICACIÓN:

15 (A) AUTORES: Parsons, y col.

(B) TÍTULO: Inestabilidad del microsatélite y mutaciones del factor de crecimiento transformante B tipo II del receptor del gen en cáncer colorrectal.

(C) REVISTA: Cancer Res.

(D) VOLUMEN: 55

20 (F) PÁGINAS: 5548-5550

(G) FECHA: 01-DIC-1995

(xi) DESCRIPCIÓN DE LA SECUENCIA: SEC. ID NO 34:

AACCATTCAA CATTTTTAAC CC 22

(2) INFORMACIÓN PARA LA SEC. ID NO: 35:

25 (i) CARACTERÍSTICAS DE LA SECUENCIA:

(A) LONGITUD: 21 pares de bases

(B) TIPO: ácido nucleico

(C) CADENA: sencilla

(D) TOPOLOGÍA: lineal

30 (ii) TIPO DE MOLÉCULA: ADN

(iii) HIPOTÉTICA: No

(xi) DESCRIPCIÓN DE LA SECUENCIA: SEC ID 35:

TCCTAAAACT ACACTTACTA C 21

(2) INFORMACIÓN PARA LA SEC. ID NO: 36:

35 (i) CARACTERÍSTICAS DE LA SECUENCIA:

(A) LONGITUD: 23 pares de bases

(B) TIPO: ácido nucleico

- (D) TOPOLOGÍA: lineal
- (ii) TIPO DE MOLÉCULA: ADN
- (iii) HIPOTÉTICA: No
- (xi) DESCRIPCIÓN DE LA SECUENCIA: SEC ID 36:
- 5 GGTATTGG AAAAAGAGTA TAG 23
- (2) INFORMACIÓN PARA LA SEC. ID NO: 37:
- (i) CARACTERÍSTICAS DE LA SECUENCIA:
- (A) LONGITUD: 22 pares de bases
- (B) TIPO: ácido nucleico
- 10 (D) TOPOLOGÍA: lineal
- (ii) TIPO DE MOLÉCULA: ADN
- (iii) HIPOTÉTICA: No
- (xi) DESCRIPCIÓN DE LA SECUENCIA: SEC ID 37:
- AGAGAGAAGT AGTTGTGTTA AT 22
- 15 (2) INFORMACIÓN PARA LA SEC. ID NO: 38:
- (i) CARACTERÍSTICAS DE LA SECUENCIA:
- (A) LONGITUD: 21 pares de bases
- (B) TIPO: ácido nucleico
- (C) CADENA: sencilla
- 20 (D) TOPOLOGÍA: lineal
- (ii) TIPO DE MOLÉCULA: ADN
- (iii) HIPOTÉTICA: No
- (xi) DESCRIPCIÓN DE LA SECUENCIA: SEC ID 38:
- ACTACACCAA TACAACCACA T 21
- 25 (2) INFORMACIÓN PARA LA SEC. ID NO: 39:
- (i) CARACTERÍSTICAS DE LA SECUENCIA:
- (A) LONGITUD: 12 pares de bases
- (B) TIPO: ácido nucleico
- (C) CADENA: sencilla
- 30 (D) TOPOLOGÍA: lineal
- (ii) TIPO DE MOLÉCULA: ADN
- (iii) HIPOTÉTICA: No
- (xi) DESCRIPCIÓN DE LA SECUENCIA: SEC ID 39:
- AAACCAAAC TC 12
- 35 (2) INFORMACIÓN PARA LA SEC. ID NO: 40:
- (i) CARACTERÍSTICAS DE LA SECUENCIA:
- (A) LONGITUD: 16 pares de bases

(B) TIPO: ácido nucleico

(C) CADENA: sencilla

(D) TOPOLOGÍA: lineal

(ii) TIPO DE MOLÉCULA: ADN

5

(iii) HIPOTÉTICA: No

(xi) DESCRIPCIÓN DE LA SECUENCIA: SEC ID 40:

CCCACACCCA ACCAAT 16

(2) INFORMACIÓN PARA LA SEC. ID NO: 41:

(i) CARACTERÍSTICAS DE LA SECUENCIA:

10

(A) LONGITUD: 23 pares de bases

(B) TIPO: ácido nucleico

(C) CADENA: sencilla

(D) TOPOLOGÍA: lineal

(ii) TIPO DE MOLÉCULA: ADN

15

(iii) HIPOTÉTICA: No

(xi) DESCRIPCIÓN DE LA SECUENCIA: SEC ID 41:

GGAGTTATA AGAGTAGGGT TAA 23

(2) INFORMACIÓN PARA LA SEC. ID NO: 42:

(i) CARACTERÍSTICAS DE LA SECUENCIA:

20

(A) LONGITUD: 24 pares de bases

(B) TIPO: ácido nucleico

(C) CADENA: sencilla

(D) TOPOLOGÍA: lineal

(ii) TIPO DE MOLÉCULA: ADN

25

(iii) HIPOTÉTICA: No

(xi) DESCRIPCIÓN DE LA SECUENCIA: SEC ID 42:

CCAACCAATA AAAACAAAAA TACC 24

(2) INFORMACIÓN PARA LA SEC. ID NO: 43:

(i) CARACTERÍSTICAS DE LA SECUENCIA:

30

(A) LONGITUD: 22 pares de bases

(B) TIPO: ácido nucleico

(C) CADENA: sencilla

(D) TOPOLOGÍA: lineal

(ii) TIPO DE MOLÉCULA: ADN

35

(iii) HIPOTÉTICA: No

(xi) DESCRIPCIÓN DE LA SECUENCIA: SEC ID 43:

GTAGGTGGGG AGGAGTTTAG TT 22

(2) INFORMACIÓN PARA LA SEC. ID NO: 44:

(i) CARACTERÍSTICAS DE LA SECUENCIA:

(A) LONGITUD: 23 pares de bases

(B) TIPO: ácido nucleico

5 (C) CADENA: sencilla

(D) TOPOLOGÍA: lineal

(ii) TIPO DE MOLÉCULA: ADN

(iii) HIPOTÉTICA: No

(xi) DESCRIPCIÓN DE LA SECUENCIA: SEC ID 44:

10 TCTAATAACC AACCAACCCC TCC 23

(2) INFORMACIÓN PARA LA SEC. ID NO: 45:

(i) CARACTERÍSTICAS DE LA SECUENCIA:

(A) LONGITUD: 27 pares de bases

(B) TIPO: ácido nucleico

15 (C) CADENA: sencilla

(D) TOPOLOGÍA: lineal

(ii) TIPO DE MOLÉCULA: ADN

(iii) HIPOTÉTICA: No

(xi) DESCRIPCIÓN DE LA SECUENCIA: SEC ID 45:

20 TTGTATTATT TTGTTTTTTT TGGTAGG 27

(2) INFORMACIÓN PARA LA SEC. ID NO: 46:

(i) CARACTERÍSTICAS DE LA SECUENCIA:

(A) LONGITUD: 26 pares de bases

(B) TIPO: ácido nucleico

25 (C) CADENA: sencilla

(D) TOPOLOGÍA: lineal

(ii) TIPO DE MOLÉCULA: ADN

(iii) HIPOTÉTICA: No

(xi) DESCRIPCIÓN DE LA SECUENCIA: SEC ID 46:

30 CAACTTCTCA AATCATCAAT CCTCAC 26

(2) INFORMACIÓN PARA LA SEC. ID NO: 47:

(i) CARACTERÍSTICAS DE LA SECUENCIA:

(A) LONGITUD: 21 pares de bases

(B) TIPO: ácido nucleico

35 (C) CADENA: sencilla

(D) TOPOLOGÍA: lineal

(ii) TIPO DE MOLÉCULA: ADN

(iii) HIPOTÉTICA: No

(xi) DESCRIPCIÓN DE LA SECUENCIA: SEC ID 47:

TTTAGTAGAG GTATATAAGT T 21

(2) INFORMACIÓN PARA LA SEC. ID NO: 48:

5 (i) CARACTERÍSTICAS DE LA SECUENCIA:

(A) LONGITUD: 26 pares de bases

(B) TIPO: ácido nucleico

(C) CADENA: sencilla

(D) TOPOLOGÍA: lineal

10 (ii) TIPO DE MOLÉCULA: ADN

(iii) HIPOTÉTICA: No

(xi) DESCRIPCIÓN DE LA SECUENCIA: SEC ID 48:

TAAGGGGAGA GGAGGAGTTT GAGAAG 26

(2) INFORMACIÓN PARA LA SEC. ID NO: 49:

15 (i) CARACTERÍSTICAS DE LA SECUENCIA:

(A) LONGITUD: 15 pares de bases

(B) TIPO: ácido nucleico

(C) CADENA: sencilla

(D) TOPOLOGÍA: lineal

20 (ii) TIPO DE MOLÉCULA: ADN

(iii) HIPOTÉTICA: No

(xi) DESCRIPCIÓN DE LA SECUENCIA: SEC ID 49:

TTTGAGGGAT AGGGT 15

(2) INFORMACIÓN PARA LA SEC. ID NO: 50:

25 (i) CARACTERÍSTICAS DE LA SECUENCIA:

(A) LONGITUD: 18 pares de bases

(B) TIPO: ácido nucleico

(C) CADENA: sencilla

(D) TOPOLOGÍA: lineal

30 (ii) TIPO DE MOLÉCULA: ADN

(iii) HIPOTÉTICA: No

(xi) DESCRIPCIÓN DE LA SECUENCIA: SEC ID 50:

TTTTAGGGGT GTTATATT 18

(2) INFORMACIÓN PARA LA SEC. ID NO: 51:

35 (i) CARACTERÍSTICAS DE LA SECUENCIA:

(A) LONGITUD: 21 pares de bases

(B) TIPO: ácido nucleico

(C) CADENA: sencilla

(D) TOPOLOGÍA: lineal

(ii) TIPO DE MOLÉCULA: ADN

(iii) HIPOTÉTICA: No

5 (xi) DESCRIPCIÓN DE LA SECUENCIA: SEC ID 51:

TTTTTTTGTT TGGAAAGATA T 21

(2) INFORMACIÓN PARA LA SEC. ID NO: 52:

(i) CARACTERÍSTICAS DE LA SECUENCIA:

(A) LONGITUD: 16 pares de bases

10 (B) TIPO: ácido nucleico

(C) CADENA: sencilla

(D) TOPOLOGÍA: lineal

(ii) TIPO DE MOLÉCULA: ADN

(iii) HIPOTÉTICA: No

15 (xi) DESCRIPCIÓN DE LA SECUENCIA: SEC ID 52:

GTTGGTGGTG TTGTAT 16

(2) INFORMACIÓN PARA LA SEC. ID NO: 53:

(i) CARACTERÍSTICAS DE LA SECUENCIA:

(A) LONGITUD: 19 pares de bases

20 (B) TIPO: ácido nucleico

(C) CADENA: sencilla

(D) TOPOLOGÍA: lineal

(ii) TIPO DE MOLÉCULA: ADN

(iii) HIPOTÉTICA: No

25 (xi) DESCRIPCIÓN DE LA SECUENCIA: SEC ID 53:

AGGTTATGAT GATGGGTAG 19

(2) INFORMACIÓN PARA LA SEC. ID NO: 54:

(i) CARACTERÍSTICAS DE LA SECUENCIA:

(A) LONGITUD: 22 pares de bases

30 (B) TIPO: ácido nucleico

(C) CADENA: sencilla

(D) TOPOLOGÍA: lineal

(ii) TIPO DE MOLÉCULA: ADN

(iii) HIPOTÉTICA: No

35 (xi) DESCRIPCIÓN DE LA SECUENCIA: SEC ID 54:

TATTAGAGGT AGTAATTATG TT 22

REIVINDICACIONES

- 5 1. Un procedimiento para detectar la metilación de la citosina en dinucleótidos CpG dentro de una muestra de ADN genómico, en el que la cantidad de metilación en la muestra de ácido nucleico se determina cuantitativamente basándose en la referencia a una reacción de control para la cantidad de ácido nucleico aportado, que comprende:
- (a) poner en contacto una muestra de ADN genómico con un agente modificante que modifica citosinas no metiladas para producir un ácido nucleico transformado;
- 10 (b) amplificar el ácido nucleico transformado por medio de cebadores de oligonucleótidos en presencia de una o una pluralidad de sondas específicas de oligonucleótidos, en el que una o una pluralidad de sonda(s) específica(s), pero no los cebadores, son capaces de distinguir entre ácido nucleico metilado y no metilado;
- (c) detectar el ácido nucleico metilado en base a un desplazamiento de la sonda mediado por amplificación y PCR en tiempo real basada en fluorescencia.
- 15 (d) medir la amplificación imparcial de todos los posibles estados de metilación en dicho ácido nucleico transformado utilizando una segunda PCR cuantitativa en tiempo real basada en fluorescencia, en la que ni los cebadores ni la(s) sonda(s) se superponen sobre ningún dinucleótido CpG; y
- (e) formar una proporción de la cantidad de metilación detectada en (c) y la cantidad de ADN aportado detectada en (d).
2. El procedimiento de la reivindicación 1, en el que la región que es amplificada por los cebadores de la etapa (d) no contiene ningún CpG.
- 20 3. El procedimiento de la reivindicación 1, en el que la región que es amplificada por los cebadores de la etapa (d) no es frecuentemente objeto de alteraciones en el número de copias, tales como amplificación o delección de genes.
4. El procedimiento de la reivindicación 1, en el que los cebadores en la etapa (d) amplifican una extensión del gen MyoD1.
- 25 5. El procedimiento de la reivindicación 1, en el que los cebadores en la etapa (d) están representados por las secuencias de la SEC. ID NO. 22 y SEC. ID NO. 24.
6. El procedimiento de la reivindicación 1, en el que la etapa de amplificación es una reacción en cadena de la polimerasa (PCR).
7. El procedimiento de la reivindicación 1, en el que el agente modificante es bisulfito.
- 30 8. El procedimiento de la reivindicación 1, en el que el ácido nucleico transformado contiene uracilo en lugar de restos de citosina no metilada presentes en la muestra que contiene ácido nucleico no modificado.
9. El procedimiento de la reivindicación 1, en el que la sonda además comprende una o una pluralidad de restos de etiquetas fluorescentes.
- 35 10. El procedimiento de la reivindicación 9, en el que la etapa de amplificación y detección comprende PCR cuantitativa basada en fluorescencia.

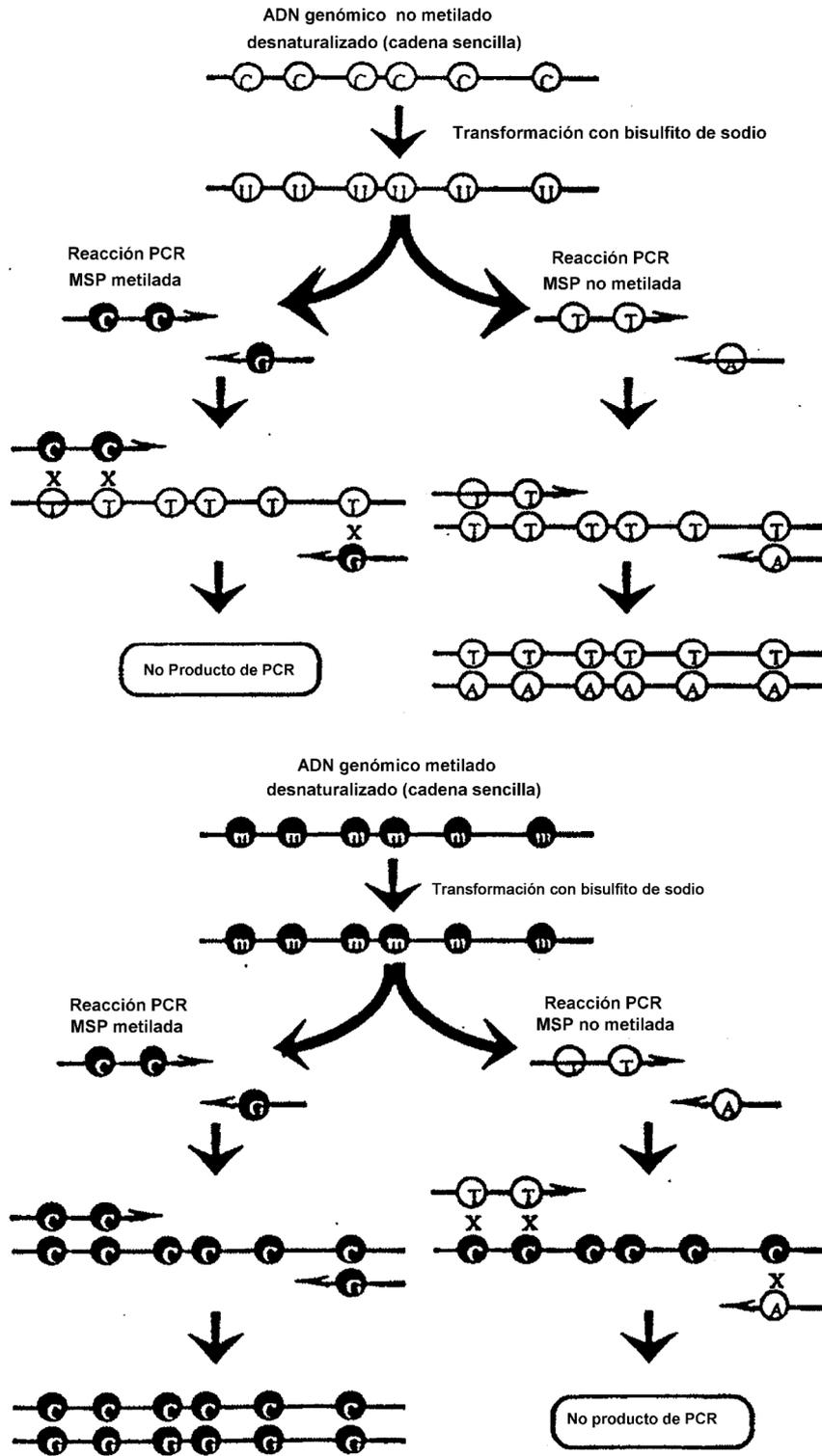


Fig. 1

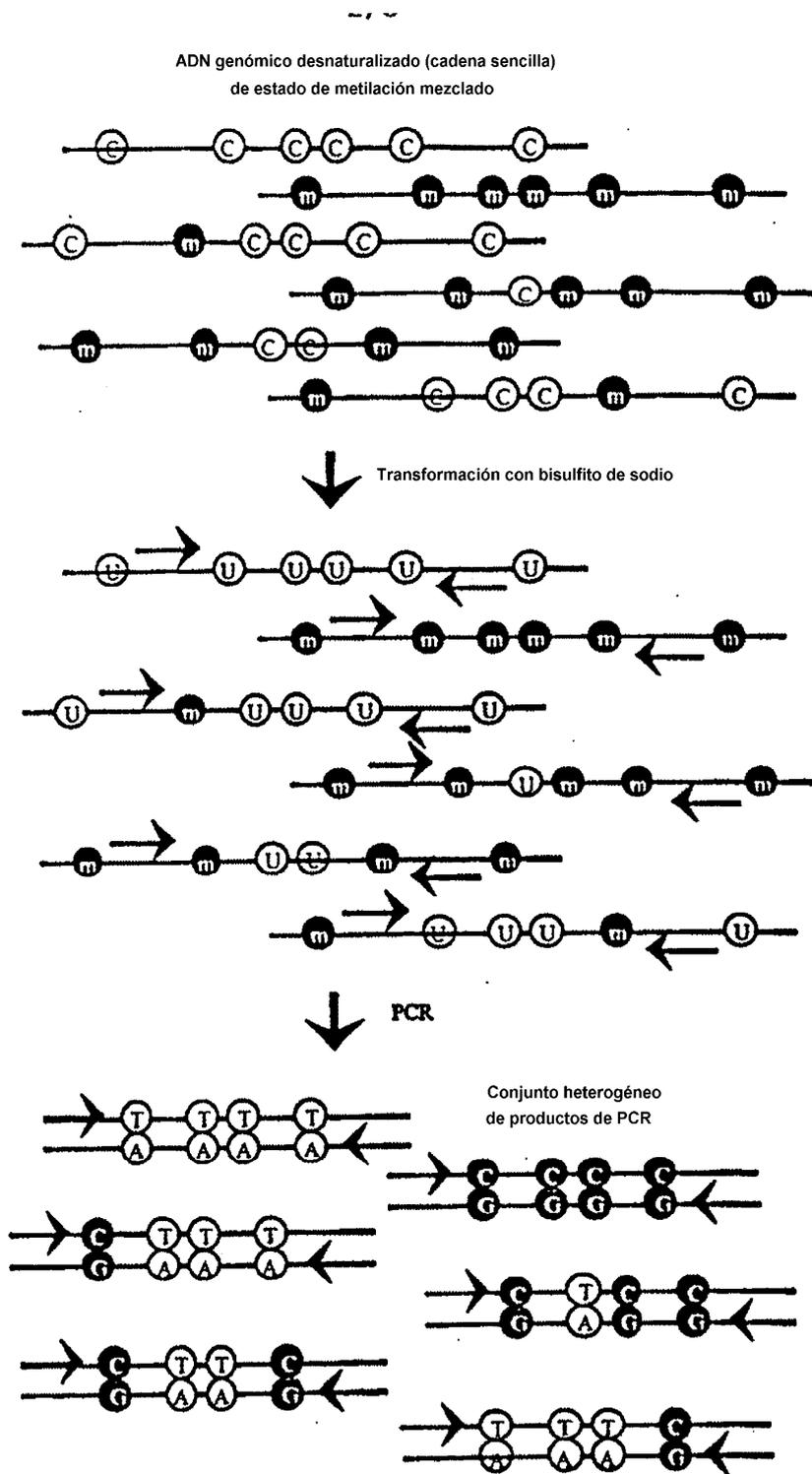


Fig. 2

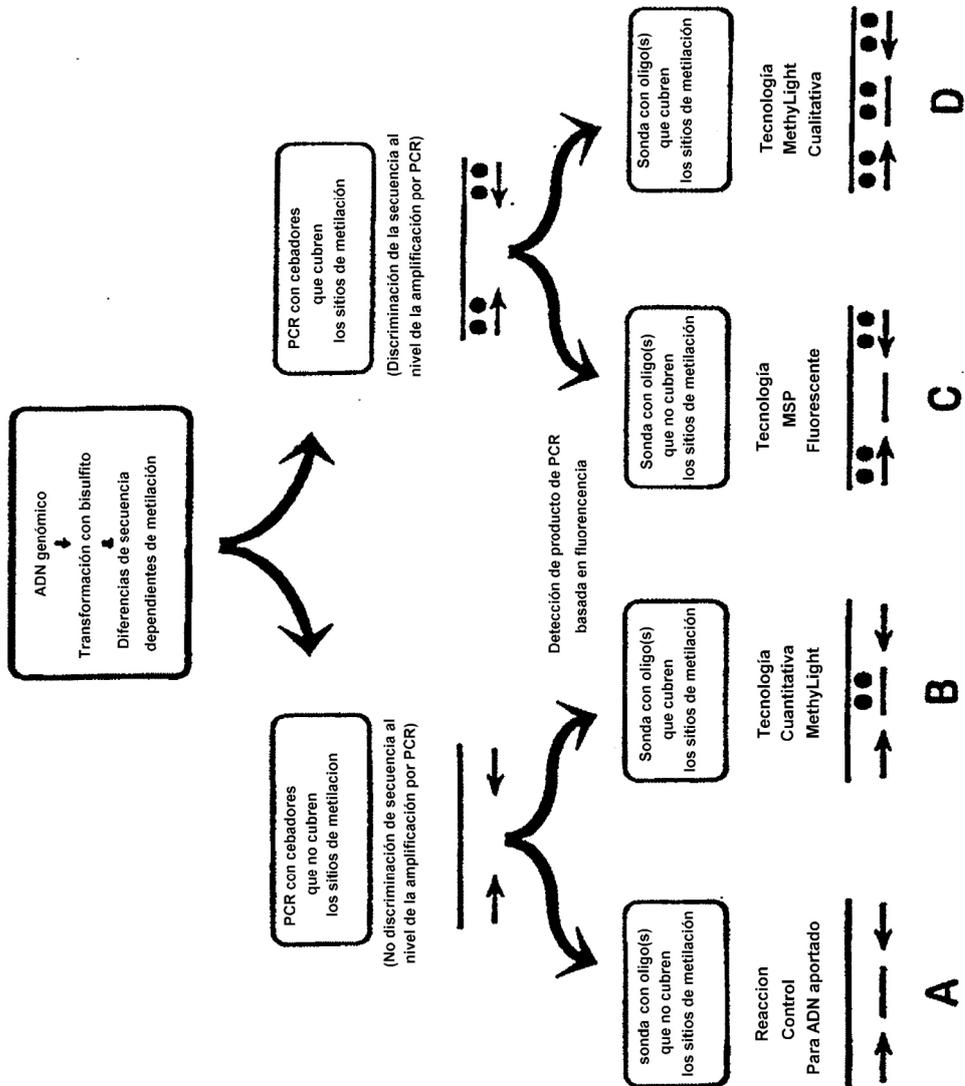


Fig. 3

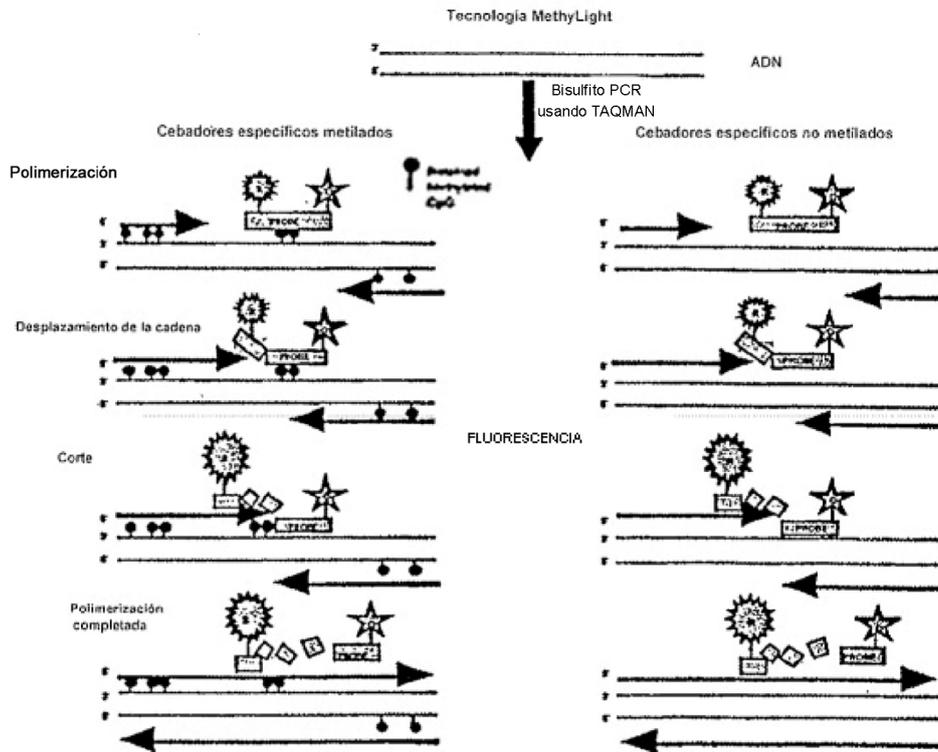


Fig. 4

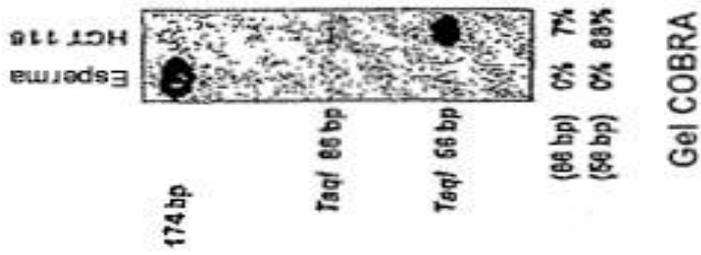


Fig. 5a

ADN	COBRA (% uno o dos sitios metilados)	MethylLight (Proporción de metilado/control)	MethylLight (proporción de no metilado/control)
Tornado con Bisulfito			
Esperma	0%	0	62
HCT116	95%	36	0
No tratado			
Esperma	No PCR	0	0
HCT116	No PCR	0	0

Fig. 5b

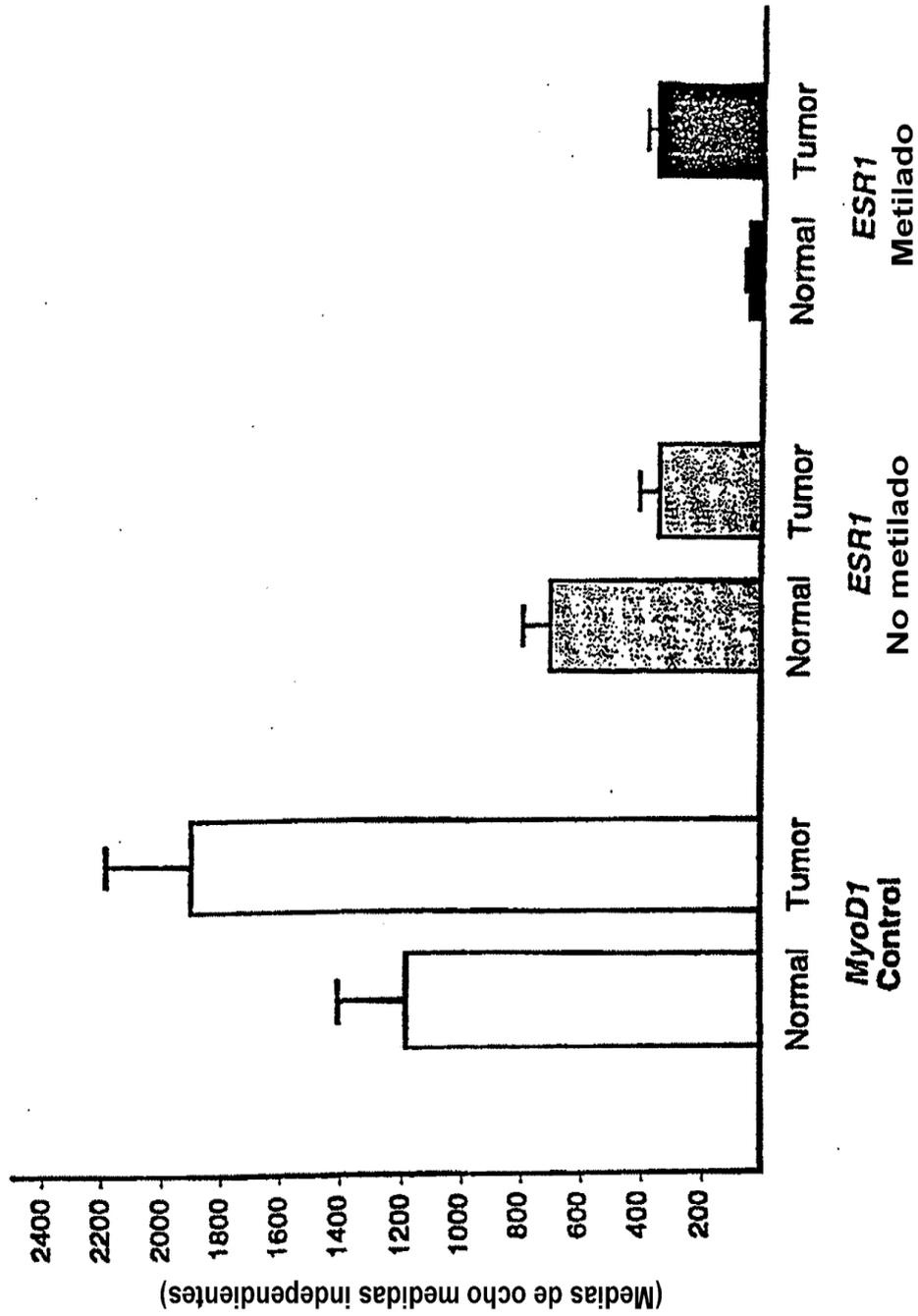


Fig. 7

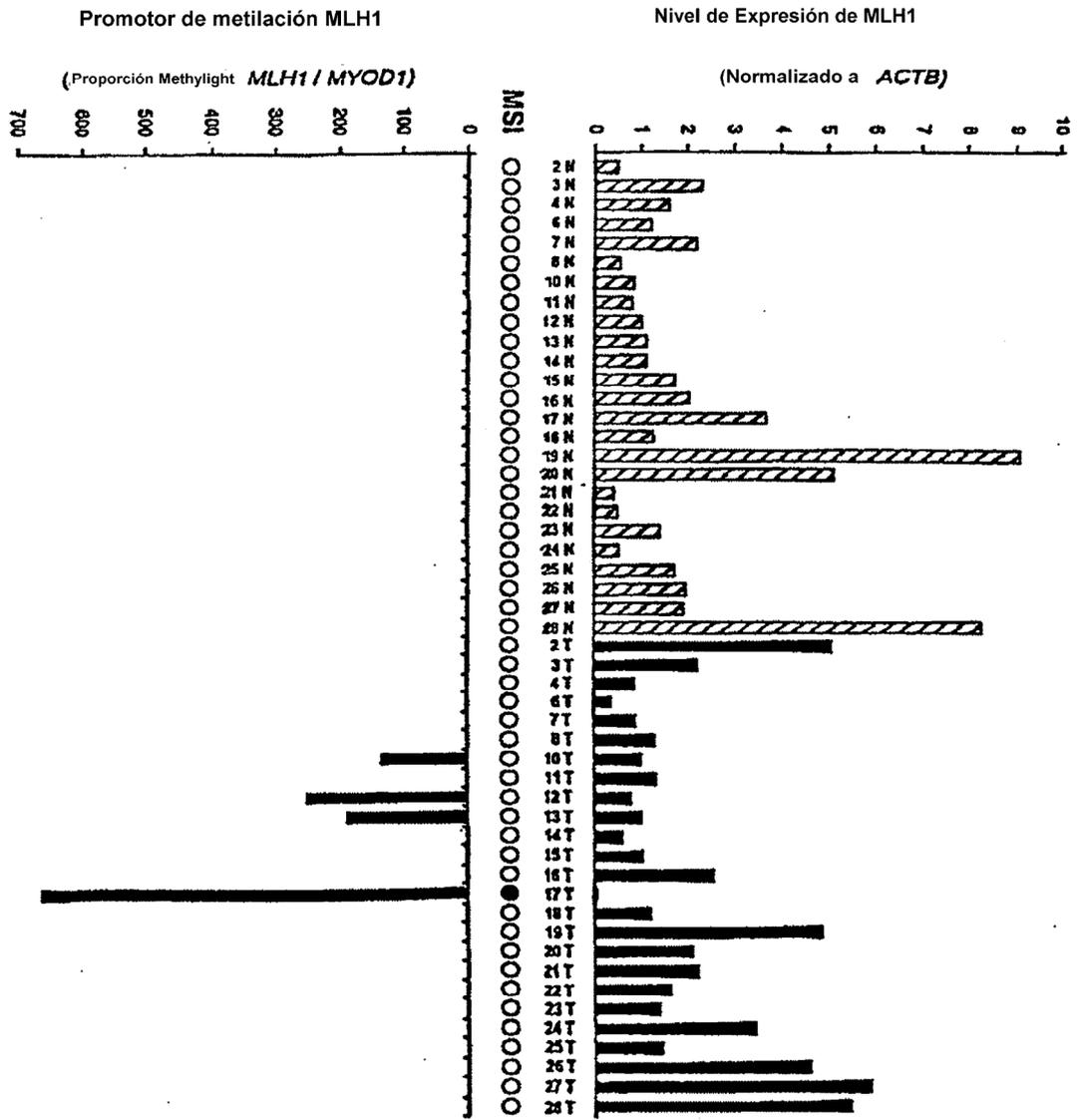


Fig. 8