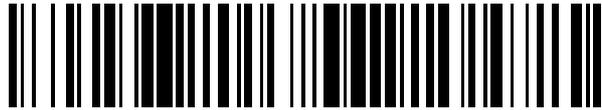


19



OFICINA ESPAÑOLA DE
PATENTES Y MARCAS

ESPAÑA



11 Número de publicación: **2 570 828**

51 Int. Cl.:

C12Q 1/68 (2006.01)

12

TRADUCCIÓN DE PATENTE EUROPEA

T3

96 Fecha de presentación y número de la solicitud europea: **06.06.2008 E 12164321 (7)**

97 Fecha y número de publicación de la concesión europea: **06.04.2016 EP 2479289**

54 Título: **Método de análisis de metilación**

30 Prioridad:

08.06.2007 EP 07109907
15.06.2007 EP 07110409
31.07.2007 EP 07113516
21.08.2007 EP 07114659
23.08.2007 EP 07114863
23.01.2008 EP 08150552
14.02.2008 EP 08151442

45 Fecha de publicación y mención en BOPI de la traducción de la patente:
20.05.2016

73 Titular/es:

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

72 Inventor/es:

DEVOS, THEO;
LOFTON-DAY, CATHY;
SLEDZIEWSKI, ANDREW;
MODEL, FABIAN;
KROUSE, MICHAEL;
SCHUSTER, MATHIAS;
DISTLER, JÜRGEN;
TETZNER, REIMO y
HO, JESSE

74 Agente/Representante:

LAZCANO GAINZA, Jesús

ES 2 570 828 T3

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

DESCRIPCIÓN

Método de análisis de metilación

Campo de la invención

5 La invención se relaciona de manera general con composiciones sustancialmente novedosas y métodos para proporcionar ADN para análisis de metilación, en particular para análisis de metilación del gen septina 9. La invención se relaciona adicionalmente de manera general con métodos novedosos y sustancialmente mejorados para análisis de metilación del gen septina 9.

Antecedentes de aspectos de la invención

10 Desarrollo de una prueba médica. La probabilidad de curar una enfermedad (por ejemplo una enfermedad de cáncer) es muchas veces predominantemente dependiente de una detección tan temprana como sea posible de la enfermedad. También es frecuentemente ventajoso detectar una predisposición de una enfermedad o si por ejemplo la enfermedad ya ha avanzado hacer una estimación para la mayoría de tratamientos promisorios de la enfermedad. Dicha detección tan temprana como sea posible, la predicción o estimación reducen los costos del tratamiento médico asociado y directo. También asegura una calidad de vida mayor para el paciente afectado. Esto conlleva a la situación de que un lote de muestras derivadas de individuos con una enfermedad que se sospecha tiene que ser probada, la mayor parte no puede estar afectada por la enfermedad. O, en el caso de pacientes con una enfermedad diagnosticada, se ha probado un lote de muestras, y solo un pequeño porcentaje responderá a un determinado tratamiento. Usualmente se realiza la mayoría de dichas pruebas en los así llamados laboratorios de referencia. Debido a la enorme cantidad de muestras que se procesan en laboratorios de referencia, la prueba real y el flujo de trabajo correspondiente para procesar la muestra están por debajo de los siguientes requerimientos: combinable con métodos para continuar la prevención; bajas demandas en Kit de laboratorio; bajo esfuerzo de manipulación; capaz de ser automatizado por medio de partes robóticas o manualmente; capaz de ser estandarizado; realizable a escala de placa; alto rendimiento de ADN con el propósito de reducir la cantidad de la muestra y aumentar la sensibilidad y especificidad; alta sensibilidad; alta especificidad; bajos costes; ADN libre de compuestos que interfieren tales como pero no limitado a proteínas, ARN, nucleótidos o reactivos químicos molestos; alta reproducibilidad y alta confiabilidad.

15 Adicionalmente, en general, es deseable que una prueba deba tener sensibilidad tan alta como sea posible, una especificidad tan alta como sea posible y una precisión tan alta como sea posible. La sensibilidad es una medición de la capacidad de la prueba de detectar correctamente la enfermedad objetivo en un individuo que se va a probar. Una prueba que tiene pobre sensibilidad produce un alto índice de falsos negativos, es decir, individuos que tienen la enfermedad pero se identifican falsamente como libres de esa enfermedad particular. El peligro potencial de un falso negativo es que el individuo enfermo permanecerá sin diagnóstico y no tratado durante un periodo de tiempo, durante el cual la enfermedad puede evolucionar a una etapa posterior en donde los tratamientos, si existen, pueden ser menos efectivos. La matemática se puede describir como: $\text{Sensibilidad} = \text{TP}/(\text{TP}+\text{FN})$. Por lo que TP representa un resultado positivo verdadero y FN un resultado negativo falso. Un resultado positivo verdadero significa que la prueba es positiva y la afección está presente mientras que un resultado falso negativo está en donde la prueba es negativa pero la afección no está presente.

20 Específicamente, de otra parte, es una medición de una capacidad de prueba para identificar pacientes con precisión que están libres del estado de enfermedad. Una prueba que tiene pobre especificidad produce un alto índice de falsos positivos, es decir, los individuos se identifican falsamente que tiene la enfermedad. Un inconveniente de falsos positivos es que fuerzan los pacientes a experimentar procedimientos médicos innecesarios o tratamientos con sus riesgos asociados, tensiones emocionales y financieros, y que puede tener efectos adversos en la salud del paciente. Una característica de las enfermedades que hace difícil realizar pruebas diagnósticas con alta especificidad es que los mecanismos de enfermedad, particularmente en cáncer, frecuentemente implican una pluralidad de genes y proteínas. Adicionalmente, se pueden elevar determinadas proteínas por razones no relacionadas a un estado de enfermedad. La especificidad matemática se puede describir como: $\text{Especificidad} = \text{TN}/(\text{FP}+\text{TN})$. Por lo tanto TN representa un resultado negativo verdadero y FP un resultado positivo falso. Un resultado negativo verdadero es en donde la prueba es negativa y la afección no está presente. Un resultado falso positivo es en donde la prueba es positiva pero la afección no está presente.

25 Material de partida para una prueba. Es ventajoso para una prueba con respecto a la reducción del coste y a una alta calidad de vida del paciente que se puede realizar no invasivamente. Si esto no es posible, es deseable realizarlo mediante medios invasivos que afecta tan poco como sea posible para el paciente, que son fáciles de realizar, lo que provoca bajos costes y combinaciones de los mismos. Debido a esto, las muestras remotas tales como pero no limitado a sangre, esputo, heces o fluidos corporales son el material de partida de elección para una prueba.

Sin embargo, el uso de muestras remotas es muy limitado mediante la baja cantidad de ADN, en particular mediante la baja cantidad de ADN que se origina por la célula o tejido enfermo. Por lo tanto el flujo de trabajo de la muestra recolectada al inicio de la prueba ha sido caracterizado por altos rendimientos de ADN.

5 Adicionalmente, el ADN de interés se debe degradar parcialmente en una muestra remota. Esto depende del tipo de muestra remota y también de la forma de recolectar y manipular la muestra remota. Una fragmentación de ADN en la muestra remota a un tamaño de fragmento de 100 bp y por debajo si es posible. Por lo tanto un flujo de trabajo para recolectar una muestra al inicio de una prueba debe asegurar que se proporcionan fragmentos pequeños de ADN así como también fragmentos grandes de ADN y que el ADN no se fragmenta adicionalmente. Existen numerosos documentos que superan estos problemas. Solo los siguientes ejemplos se citan aquí: Diehl F., et al. (2005) PNAS 102(45), 16368-16373; y Li J., et al. (2006) Journal de Molecular Diagnostics, 8(1), 22-30.

Análisis de *Metilación*. Como se reveló en años recientes, uno de los métodos más potentes y promisorios para detectar una enfermedad, la predisposición para una enfermedad o para estimar una respuesta probable con respecto a un determinado tratamiento de una enfermedad es el análisis de metilación del ADN genómico del paciente.

15 Muchas enfermedades, en particular enfermedades de cáncer, están acompañadas por la expresión modificada del gen. Esto puede ser una mutación de los genes propiamente dichos, que conduce a una expresión de proteínas modificadas o a una inhibición o sobreexpresión de las proteínas o enzimas. Sin embargo una modulación de la expresión también puede ocurrir mediante modificaciones epigenéticas, en particular mediante cambios en el patrón de metilación de ADN. Dichas modificaciones epigenéticas no afectan la secuencia de codificación de ADN real. Se ha encontrado que los procesos de metilación de ADN tienen implicaciones sustanciales para la salud, y parece ser claro que el conocimiento acerca de los procesos de metilación y modificaciones del metabolismo de metilo y la metilación de ADN son esenciales para entender a las enfermedades, para profilaxis, diagnóstico y terapia de enfermedades.

20 El control preciso de genes, que representan una parte pequeña de solo el genoma completo de mamíferos, implica la regulación en consideración del hecho de que la parte principal del ADN en el genoma no se codifica. La presencia de dicho ADN 'trunk' que contiene intrones, elementos repetitivos y elementos transposables potencialmente activos, requiere mecanismos efectivos para su supresión durable (inactivación). Evidentemente, la metilación de citosina mediante transferasas de metilo de ADN dependientes de S-adenosilmetionina (SAM), que forman 5-metilcitosina, representa dicho mecanismo para la modificación de la interacción de la proteína de ADN. Los genes se pueden transcribir mediante promotores libres de metilación, incluso cuando se metilan ampliamente las regiones transcritas o no transcritas adyacentes. Esto permite el uso y regulación de promotores de genes funcionales, mientras que se suprime el ADN trunk que incluye los elementos de transposición. La metilación también toma lugar para supresión a largo plazo de los genes ligados X puede conducir a una reducción o un aumento del grado de transcripción, dependiendo en donde ocurre la metilación en las unidades de transcripción.

25 Casi la metilación de ADN natural completa en mamíferos se restringe a secuencias de palíndromo de dinucleótido de citosina-guanina (CpG), que se controla por metil transferasas de ADN. Los dinucleótidos CpG son aproximadamente 1 a 2 % de todos los dinucleótidos y se concentran en islas CpG. De acuerdo con una definición reconocida en la técnica, se considera una región como una isla CpG cuando el contenido de C+G sobre 200 bp es por lo menos 50 % y el porcentaje de los dinucleótidos CG observados en comparación con los dinucleótidos CG esperados es mayor de 0.6 (Gardiner-Garden, M., Frommer, M. (1987) J. Mol. Biol. 196, 261-282). Normalmente, las islas CpG tienen por lo menos 4 dinucleótidos CpG en una secuencia de una longitud de 100 bp.

35 Las islas CpG ubicadas en las regiones promotoras tienen frecuentemente una función reguladora para la expresión del gen correspondiente. Por ejemplo, en el caso que la isla CpG sea hipometilada, se puede expresar el gen. De otra parte, la hipermetilación conduce a una supresión de la expresión. Normalmente se hipometilan los genes supresores de tumor. Pero si se vuelven a hipermetilar, su expresión se vuelve a suprimir. Esto se observa muchas veces en tejidos de tumor. En contraste, los oncogenes se hipermetilan en tejido saludable, mientras que se hipometilan muchas veces en tejidos de tumor.

40 La metilación de citosina tiene el efecto que la unión de las proteínas se prohíbe normalmente lo que regula la transcripción de genes. Esto conduce a una alteración de la expresión del gen. Relacionada con el cáncer, por lo tanto se altera la expresión de los genes que resulta en la división celular, por ejemplo, se regula por reducción la expresión de un gen apoptótico, mientras se regula por aumento la expresión de un oncogen. Adicionalmente, la hipermetilación puede tener una influencia a largo plazo en la regulación. Las proteínas, que desacetilan histonas, son capaces de unirse por medio de su dominio de unión 5-metilcitosina al ADN cuando las citocinas se metilan. Esto resulta en una desacetilación de las histonas, que por sí mismas conducen a un empaque hermético de ADN. Debido a esto, las proteínas reguladoras no se precluyen de la unión al ADN.

45 La detección eficiente de los patrones de metilación de ADN por consiguiente es una herramienta importante para desarrollar nuevos métodos para entender las enfermedades, para la prevención, diagnóstico y tratamiento de enfermedades y para la detección de objetivos asociados con la enfermedad.

- Antecedentes del gen septina 9. El gen Septina 9 humano (también conocido como la proteína de fusión similar a septina MLL, la proteína MSF-A de fusión similar a septina MLL, Slpa, Eseptina, Msf, proteína similar a septina de Ovario/septina de Mama (septina Ov/Br) y Septina D1) se ubica en el cromosoma 17q25 dentro del AC068594.15.1.168501 contiguo y es un elemento de la familia del gen Septina. Se sabe que el gen septina 9 comprende cuatro variantes de transcritpo, las variantes Septina 9 y las variantes Q9HC74 (que son versiones truncadas de los transcritpos Septina 9). Los transcritpos Septina 9 y Q9HC74 comprenden cada uno una región promotora rica en CpG, respectivamente. Se ha postulado que los miembros de la familia del gen Septina se asocian con múltiples funciones celulares que varían del transporte de vesícula para citoquinesis. La interrupción de la acción de *Septina 9* resulta en división celular incompleta, véase Surka, M.C., Tsang, C.W., y Trimble, W.S. Mol Biol Cell, 13: 3532-45 (2002). Se ha mostrado que la *Septina 9* y otras proteínas son patrones de fusión del proto-oncogen *MLL* que sugiere una función en tumorigenia, véase Osaka, M, Rowley, J.D. y Zeleznik-Le, N.J. PNAS, 96:6428-6433 (1999). Burrows et al. reporta un estudio de profundidad de expresión de las múltiples isoformas del gen septina 9 en cáncer de ovario y muestra expresión específica de tejido de diversos transcritpos, véase Burrows, J. F., Chanduloy, et al. S.E.H. Journal of Pathology, 201:581-588 (2003). En un estudio reciente de casi 7000 tejidos normales y de tumor existe sobreexpresión consistente de las isoformas *Septina 9* en una serie de tejidos de tumor, véase Scott, M., Hyland, P.L., et al. Oncogene, 24: 4688-4700 (2005). Los autores especulan que el gen es probablemente un gen de cáncer tipo II en donde los cambios de regulación de control de procesamiento de transcritpo de ARN de diferentes productos de proteína, y los niveles de estas isoformas de proteína alteradas pueden proporcionar respuestas a la función del gen en el cáncer.
- Estado de la técnica. Como la técnica anterior más cercana, se pueden considerar los siguientes documentos:
- Utting M., et al. (2002) Clinical Cancer Research 8, 35-40. Este estudio indica que el análisis de marcador de microsatélite utilizando ADN de flujo libre de orina o sangre pueden ser relevante para diagnóstico y detección de cáncer de vejiga. La muestra proporcionada así como también el ADN proporcionado de las muestras se lleva a cabo de acuerdo con procedimientos estándar.
- Wong I.H.N., et al. (2003) Clinical Cancer Research 9, 047-1052 describe un nuevo método denominadp RTQ-MSP que es una combinación de MSP (PCR sensible a metilación) y PCR en tiempo real. Los autores demuestran que una detección de una secuencia de ADN derivada de tumor particular en células de plasma, suero y sangre es posible que ya hayan sido diagnosticadas en pacientes con carcinoma hepatocelular carcinoma.
- El documento US 6, 927, 028 enseña un método para diferenciar especies de ADN que se originan de células de diferentes individuos en muestras biológicas por medio de PCR específico de metilación. La muestra proporcionada así como también el ADN proporcionado de las muestras se lleva a cabo de acuerdo con procedimientos estándar.
- Lecomte T., et al. (2002) Int. J. Cancer 100, 542-548 probó la presencia de mutaciones KRAS2 en el ADN circulante libre derivado de plasma de pacientes con cáncer colorrectal, para metilación del promotor de gen p16, o ambos. Los autores sugieren que, los pacientes con ADN asociado a tumor circulante libre en la sangre tienen una probabilidad menor de una supervivencia libre de recurrencia de 2 años que se detecta en pacientes que no tienen ADN asociado con tumor circulante libre en la sangre.
- El documento WO 2006/039563 se relaciona con composiciones y métodos para proporcionar fragmentos de ADN de una muestra archivada similar a incorporación de parafina y/o biopsias de tejido fijado a formalina. Describe métodos en donde se aíslan altos rendimientos de ADN así como también una porción sustancial del ADN que consiste de fragmentos de ADN largos, y en donde el ADN genómico aislado está libre de contaminantes asociados o entrecruzados como proteínas, péptidos, aminoácidos o ARN. Los métodos son fáciles, efectivos en costes, y se caracterizan por alta reproducibilidad y confiabilidad. Particularmente, se describen métodos para proporcionar fragmentos de ADN derivados de una muestra archivada, en donde el rendimiento de ADN antes de una etapa de amplificación es por lo menos 20 %, y son amplificables amplicones de una longitud de hasta de aproximadamente 1,000 pares base.
- El documento WO 2006/113770 describe composiciones y métodos para proporcionar fragmentos de ADN de una muestra remota. De acuerdo con lo anterior, se aísla el ADN de la muestra remota, y el ADN aislado se trata en una forma que permite la diferenciación de citosina metilada y no metilada. Realizaciones particulares, adicionales proporcionan composiciones y métodos para análisis de metilación de ADN derivado de una muestra remota. El documento WO 2006/113770 describe composiciones y métodos de amplificación de genoma completo de ADN tratado con bisulfito.
- Los documentos WO 2006/113466, EP 1721992 y US 20060286576 proporcionan métodos, ácidos nucleicos y Kits para detectar, o para detectar y distinguir entre trastornos proliferativos de célula hepática o para detectar, o para detectar y distinguir entre trastornos proliferativos de célula colorrectal con base en el gen septina 9 y su metilación. Aspectos particulares describen y proporcionan secuencias genómicas del gen septina 9, los patrones de metilación que tienen utilidad sustancial para la detección mejorada de y diferenciación entre dicha clase de trastornos, permitiendo por lo tanto el diagnósticos mejorado y tratamiento de los pacientes.

Sin embargo, ninguno de los métodos del estado de la técnica es adecuado para la aplicación en laboratorios de referencia. Por lo tanto existe una necesidad pronunciada en la técnica de composiciones y métodos para proporcionar ADN para análisis de metilación que es adecuado para el uso en laboratorios de referencia. Por lo tanto, adicionalmente, existe una necesidad pronunciada en la técnica para composiciones y métodos para el análisis de metilación del gen septina 9 que es aplicable en laboratorios de referencia.

Resumen de la invención

1. Un método para análisis de metilación, que comprende

a) tratar ADN genómico con uno o más reactivos para convertir bases de citosina no metiladas a sulfonato de uracilo o a otra base que tiene un comportamiento de unión diferente que citosina, mientras que la citosina metilada permanece sin cambio;

b) amplificar el ADN tratado por medio de

i) un oligonucleótido que comprende o que consiste de una secuencia definida por la SEQ ID NO: 5 o una variante de la misma con eliminación del terminal 5' y/o del terminal 3 de 1, 2, 3, 4 o 5 nucleótidos; y

ii) un oligonucleótido que comprende o que consiste de una secuencia como se define por la SEQ ID NO: 44 o una variante de la misma con eliminación del terminal 5' y/o del terminal 3 de 1, 2, 3, 4 o 5 nucleótidos;

en donde dichos oligonucleótidos son adecuados para uso como cebadores;

c) deducir la presencia o ausencia de metilación de los dinucleótidos CpG amplificados en la etapa b) de los resultados de la etapa b).

2. El método del ítem 1 anterior, en donde la amplificación de la etapa del método b) comprende adicionalmente el uso de

i) por lo menos un oligonucleótido que comprende o que consiste esencialmente de una secuencia seleccionada del grupo que consiste de la SEQ ID NO: 7 y 49-57, en donde dichos uno o más oligonucleótidos son adecuados para uso como bloqueadores;

ii) por lo menos un oligonucleótido que comprende o que consiste esencialmente de una secuencia seleccionada del grupo que consiste de la SEQ ID NO: 8 y 58-61, en donde dicho uno o más oligonucleótidos son adecuados para uso como sondas; y

iii) una polimerasa, preferiblemente una polimerasa estable al calor.

3. El método del ítem 2 anterior, que comprende

a) utilizar un oligonucleótido que comprende o que consiste esencialmente de la secuencia de la SEQ ID NO: 7 en el ítem (i); y

b) utilizar un oligonucleótido que comprende o que consiste esencialmente de la secuencia de la SEQ ID NO: 8 en el ítem (ii).

4. Un método para detectar y/o clasificar trastornos proliferativos celulares, que comprende:

a) tratar ADN genómico con uno o más reactivos para convertir bases de citosina no metiladas a sulfonato de uracilo o a otra base que tiene un comportamiento de unión diferente que citosina, mientras que la citosina metilada permanece sin cambio;

b) amplificar el ADN tratado por medio de

i) un oligonucleótido que comprende o que consiste de una secuencia como se define por la SEQ ID NO: 5, o variantes del mismo con eliminación del terminal 5' y/o del terminal 3 de 1, 2, 3, 4 o 5 nucleótidos, dicho uno o más oligonucleótidos son adecuados para uso como cebadores; y

ii) un oligonucleótido que comprende o que consiste de una secuencia como se define por la SEQ ID NO: 44 o variantes del mismo con eliminación del terminal 5' y/o del terminal 3 de 1, 2, 3, 4 o 5 nucleótidos;

dicho uno o más oligonucleótidos son adecuados para uso como cebadores;

c) deducir la presencia o ausencia de metilación de los dinucleótidos CpG amplificados en la etapa b) del resultado de la etapa b), en donde por lo menos una detección y clasificación de trastornos proliferativos celulares se proporciona, por lo menos en parte.

5 5. El método del ítem 4 anterior, en donde la amplificación de la etapa del método b) comprende adicionalmente el uso de

i) por lo menos un oligonucleótido que comprende o que consiste esencialmente de una secuencia seleccionada del grupo que consiste de la SEQ ID NO: 7 y 49-57, dicho uno o más oligonucleótidos son adecuados para uso como bloqueadores;

10 ii) por lo menos un oligonucleótido que comprende o que consiste esencialmente de una secuencia seleccionada del grupo que consiste de la SEQ ID NO: 8 y 58-61, dicho uno o más oligonucleótidos son adecuados para uso como sondas; y

iii) una polimerasa, preferiblemente una polimerasa estable al calor.

15 6. Uso de un método de los ítems 1-3 anteriores para el descubrimiento de un marcador de metilación, en donde el marcador es indicador de eventos adversos para pacientes o individuos, por lo que estos eventos adversos pertenecen a por lo menos una de las siguientes categorías:

20 interacciones indeseadas del fármaco; enfermedades de cáncer; trastornos proliferativos celulares; carcinoma de colon; carcinoma hepático; disfunción del SNC; daño o enfermedad; síntomas de agresividad o alteraciones del comportamiento; consecuencias clínicas, psicológicas y sociales de daño cerebral; trastornos de la personalidad y alteraciones sicóticas; demencia y/o síndromes asociados; enfermedad cardiovascular, disfunción o daño; disfunción, daño o enfermedad del tubo gastrointestinal; disfunción, daño o enfermedad del sistema respiratorio; lesión, inflamación, infección, inmunidad y/o convalecencia; disfunción, daño o enfermedad del cuerpo como una anomalía en el proceso de desarrollo; disfunción, daño o enfermedad de la piel, de los músculos, del tejido conectivo o de los huesos; disfunción endocrino y metabólico, daño o enfermedad; cefaleas o disfunción sexual.

25 Descripción detallada de los aspectos de la invención

Para lograr diversos objetivos técnicos, los aspectos de la invención enseñan métodos para análisis de metilación. Dichos métodos comprenden

30 a) tratar el ADN genómico con uno o más reactivos para convertir bases de citosina no metiladas a sulfonato de uracilo o a otra base que tiene un comportamiento de unión diferente que citosina, mientras que la citosina metilada permanece sin cambio;

b) amplificar el ADN tratado por medio de

i) un oligonucleótido que comprende o que consiste de una secuencia definida por la SEQ ID NO: 5 o una variante de la misma con eliminación del terminal 5' y/o del terminal 3 de 1, 2, 3, 4 o 5 nucleótidos; y

35 ii) un oligonucleótido que comprende o que consiste de una secuencia como se define por la SEQ ID NO: 44 o una variante de la misma con eliminación del terminal 5' y/o del terminal 3 de 1, 2, 3, 4 o 5 nucleótidos;

en donde dichos oligonucleótidos son adecuados para uso como cebadores;

c) deducir la presencia o ausencia de metilación de los dinucleótidos CpG amplificados en la etapa b) de los resultados de la etapa b).

40 El método de ejemplo se caracteriza porque permite una detección altamente sensible de la metilación del gen septina 9. Se seleccionan oligonucleótidos y combinaciones de oligonucleótido de enorme número de posibles oligonucleótidos y combinaciones de oligonucleótido que se asemejan a partes de la secuencia del gen septina 9 o hibridan bajo condiciones exigentes a esto. Las realizaciones particulares del método se caracterizan por una sensibilidad doble. De acuerdo con dichas realizaciones, la metilación de septina 9 se analiza por medio de dos reacciones, cada reacción específica para una hebra de ADN convertido (EP06090132). De forma correspondiente, las combinaciones de oligonucleótido particulares se seleccionan del enorme número de posibles combinaciones de oligonucleótido que se asemejan a partes de la secuencia del gen septina 9 o hibridan bajo condiciones exigentes a esto.

45

El ADN tratado se puede purificar por medio de gránulos SiMAG/FK-Silanol o gránulos del Kit especial de ADN/ARN Viral chemagic.

El ADN genómico se puede aislar de una muestra por medio de gránulos SiMAG/FK-Silanol o gránulos del Kit especial de ADN/ARN Viral chemagic.

5 Los gránulos SiMAG/FK-Silanol pueden ser los gránulos SiMAG/FK-Silanol de la compañía Chemicell GmbH (Alemania, Número de Artículo 1101-01 o 1101-05).

Los gránulos del Kit especial de ADN/ARN Viral chemagic pueden ser gránulos del Kit especial de ADN/ARN Viral chemagic de la compañía Chemagen Biopolimer-Technologie Aktiengesellschaft (Alemania; Número de Artículo 1002).

10 Dicha muestra puede ser una muestra remota. La muestra remota se puede seleccionar por lo menos del grupo que comprende: muestra de sangre, muestra de plasma, muestra de suero, muestra de fluido corporal, muestra de saliva, muestra de orina, muestra de semen, muestra del fluido de la cavidad pleural, muestra del fluido de la cavidad peritoneal, muestra del fluido cerebroespinal, frotis de la superficie epitelial, muestra de esputo, muestra de heces, muestra de eyaculación, muestra de lágrimas, muestra de sudor, muestra de fluido linfático, muestra de lavado bronquial, muestra de efusión pleural, muestra de fluido meníngeo, muestra de fluido glandular, muestra de aspirados de aguja fina, muestra de fluido aspirado de pezón, muestra de fluido espinal, muestra de fluido conjuntival, muestra de fluido vaginal, muestra de fluido duodenal, muestra de jugo pancreático, o muestra biliar.

15 La muestra remota puede ser cualquier clase de muestra. Preferiblemente, la muestra remota es una muestra que se caracteriza porque comprende por lo menos un componente que está ubicado principalmente distante de los otros componentes de dicha muestra. Por ejemplo la sangre no es una muestra remota con respecto un glóbulo rojo, pero es una muestra remota con respecto a un fragmento de ADN que se deriva de un tumor ubicado en el pulmón.

20 El aislamiento del ADN genómico puede comprender (i) el tratamiento de dicha muestra con proteinasa K durante 45 - 75 min, preferiblemente durante 55 - 65 min, y más preferiblemente durante 60 min; (ii) el uso de gránulos magnéticos del Kit de ARN/ADN Viral chemagic (Chemagen Biopolimer-Technologie AG, Alemania, Número de artículo 1002); (iii) el uso de Regulador de Unión 2*3; (iv) una incubación durante 60 min para permitir la unión de ADN a los gránulos; y (v) solo un único lavado con 3 ml de Regulador de Lavado 3. De acuerdo con una realización preferida particular, 4 - 6 ml de Regulador de Lisis 1, preferiblemente 5 ml, 4 - 10 µl de ARN poli-A, preferiblemente 7 µl, y 20 - 40 µl de solución de Proteinasa K, preferiblemente 30 µl, se agregan a una muestra. Opcionalmente, adicionalmente, se agrega antiespumante. La mezcla de reacción se incuba a 50 - 62° C durante 5 - 20 min, preferiblemente a 56° C durante 10 min. Después de esto, se agregan 50 - 200 µl, preferiblemente 100 µl, de gránulos magnéticos del Kit de ARN/ADN Viral chemagic y 12 - 18 ml, preferiblemente 15 ml, de Regulador de Unión 2, 2*1, 2*2, 2*3, o 2*4. Posteriormente, los gránulos se mantienen en suspensión durante por lo menos aproximadamente 5 min, preferiblemente durante aproximadamente 10 min, o durante aproximadamente 45 - 75 min, preferiblemente durante 55 - 65 min, o más preferiblemente durante 60 min para permitir la unión de ADN a los gránulos. Preferiblemente los gránulos se mantienen en suspensión a temperatura ambiente. Los gránulos magnéticos se separan al poner el tubo de reacción en un soporte magnético y se descarga la mezcla de plasma/regulador de lisis. Los gránulos se lavan tres veces, o dos veces con 1.5 - 4 ml, preferiblemente 3 ml, de Regulador de Lavado 3, antes que se resuspendan en 0.5 - 2 ml, preferiblemente 1 ml, de Regulador de Lavado 4. Alternativamente, los gránulos se lavan solo una vez con 1 - 2 ml, preferiblemente 1.5 ml, de Regulador de Lavado 3. Los gránulos se separan sobre un soporte magnético, el regulador de Lavado se vierte y los gránulos se secan a 20 - 62° C, preferiblemente a 56° C. Después de la adición de 50 - 200 µl de Regulador de Elución 5, la suspensión se incuba durante por lo menos 5 min a 50 - 70° C. Preferiblemente, después de la adición de 100 µl de Regulador de Elución 5, la suspensión se incuba durante 15 min a 65° C. Después de la separación de los gránulos, se recupera el regulador de Elución que contiene el ADN genómico. (Los reactivos se suministran mediante el Kit de ARN/ADN Viral chemagic; Reguladores de Unión 2*1, 2*2, 2*3, 2*4 son variaciones comerciales del regulador de Unión 2 que están disponibles de Chemagen Biopolimer-Technologie AG, Alemania).

45 Para aislamiento del ADN genómico, 4 -6 ml del Regulador de Lisis (120 g Isotiocianato de Guanidinio; 100 ml 0.1 mol/l de Tris-HCl pH 6.4 (posteriormente); 22 ml 0.2 mol/l de EDTA pH 8.0; 2.6 g de Triton X-100), se puede agregar 50 - 200 µl de solución de Proteinasa K (proporcionada por Kit de ARN/ADN Viral chemagic; Chemagen Biopolimer-Technologie AG, Alemania, Número de artículo 1002) y 50 - 300 µl de gránulos SiMAG/FK-Silanol (Chemicell GmbH, Alemania; Número de artículo 1101-1 o 1101-5) a una muestra. Preferiblemente 5 ml de Regulador de Lisis, 100 µl de solución de Proteinasa K y 100 µl de gránulos de SiMAG/FK-Silanol se agregan a una muestra. La mezcla de reacción se incuba a 45 - 65° C durante por lo menos 10 min, preferiblemente a 56° C durante 20 min. Después de esto, los gránulos se lavan con 0,5 - 3 ml, preferiblemente con 1 ml, Regulador de Lavado 1 (120 g de Isotiocianato de Guanidinio; 100 µl 0.1 mol/l de Tris-HCl pH 6.4; se diluye con 100 % de Etanol a 25 % de etanol) y dos veces con 0,5 - 3 ml, preferiblemente con 1 ml, Regulador de Lavado 2 (50 % de EtOH). Finalmente, los gránulos se secan por ejemplo pero no se limita a 45 - 62° C durante por lo menos 3 min, preferiblemente a 56° C durante 5 min, antes que se resuspendan en 25 - 200 µl, preferiblemente 50 µl, de Regulador de Elución o agua. La mezcla se incuba a 37 - 70° C durante por lo menos 5 min, preferiblemente a 65° C durante 15 min. Después de la separación de los gránulos, se obtiene el ADN en regulador de elución. La etapa de elución se puede repetir una segunda vez y se combina con el primer volumen de elución.

El aislamiento de ADN genómico puede comprender el tratamiento con una o más enzimas de restricción, una o más proteínas que se unen específicamente a ADN metilado, una o más proteínas que se unen específicamente a ADN no metilado, o combinaciones de los mismos. Las enzimas de restricción adecuadas son enzimas que digieren metilación de ADN dependientemente o independientemente de su metilación. Las enzimas que digieren la metilación de ADN dependientemente son enzimas que digieren ADN solo en el caso que su sitio de reconocimiento se metila, o en el caso que su sitio de reconocimiento no se metile. Las enzimas que cortan solo ADN en el caso de su sitio de reconocimiento que se metila son por ejemplo pero no se limitan a McrBC, BslI, Glal o combinaciones de los mismos. Las enzimas que cortan solo el ADN en el caso que su sitio de reconocimiento no se metila son por ejemplo pero no se limitan a BstUI, BshI236I, AcclI, BstFNI, MvnI, HpaII (HapII), HhaI, AclI, SmaI, HinPII, HpyCH4IV, EagI o combinaciones de los mismos. Las enzimas que digieren ADN independientemente de su metilación son enzimas que no comprenden el dinucleótido CpG dentro de su sitio de reconocimiento. Por ejemplo pero no limitado a estas enzimas son uno o más del grupo que consiste de *MseI*, *BfaI*, *Csp6I*, *Tru1I*, *Tvu1I*, *Tru9I*, *Tvu9I*, *MaeI* y *XspI*. Dichas enzimas, metilación dependiente y metilación independiente, se aplican con el propósito de reducir la complejidad del ADN aislado. Dichas enzimas, dependientes de metilación e independientes de metilación también se aplican con el propósito de enriquecer el ADN metilado, ADN no metilado, o ambos. Es aplicable cualquier combinación de las enzimas de digestión de ADN metilado, ADN no metilado o digestión de metilación de ADN independientemente.

El aislamiento de ADN genómico puede comprender una proteína que se une específicamente a ADN metilado y/o una proteína que se une específicamente a ADN no metilado. Se conocen las proteínas adecuadas por aquellos expertos en la técnica. Por ejemplo pero no limitado a dichas proteínas son MeCP2, MBD1, MBD2, MBD4 y Kaiso, o cualquier dominio de las mismas o anticuerpos específicos de metilación, por ejemplo anticuerpos anti-5-metilcitosina (unión a ADN metilado). Por ejemplo pero no limitado a esto, las proteínas de unión a ADN no metilado son el dominio CXXC-3 de la proteína MBD1. Las proteínas que se unen a ADN metilado, proteínas que se unen a ADN no metilado, o combinaciones de los mismos son en particular útiles para el enriquecimiento de ADN metilado, ADN no metilado, o ambos. Adicionalmente, se puede realizar una inmunoprecipitación de cromatina (ChIP) para enriquecimiento. Sin embargo, incluso se pueden utilizar sustancias adicionales para enriquecimiento, por e para PNA de formación triple u oligómeros de ADN. Una descripción más detallada de enriquecimiento de ADN y reducción de complejidad de ADN se puede desprender de por ejemplo pero no se limita al documento WO 2006/088978.

El aislamiento de ADN genómico puede comprender el tratamiento con una o más enzimas de restricción, una proteína que se une específicamente a ADN metilado, una proteína que se une específicamente a ADN no metilado, o combinaciones de los mismos.

El tratamiento de ADN puede ser un tratamiento con desaminasas de citidina. Estas enzimas convierten la citidina no metilada más rápido que citidina metilada (Brandsteitter et al. Activation-induced cytidine deaminase deaminates deoxycytidine on single-stranded ADN but requires the action of RNase. Proc Natl Acad Sci USA. 2003 Apr 1; 100 (7): 4102-7).

El tratamiento de ADN puede ser un tratamiento con un reactivo de bisulfito o solución. Los reactivos o soluciones de bisulfito adecuadas se conocen por aquellos expertos en la técnica. La conversión de bisulfito puede tomar lugar en la solución así como también en ADN unido a una fase sólida. Preferiblemente se utiliza disulfito de sodio (= bisulfito de sodio/metabisulfito de sodio), debido a que es más soluble en agua que sulfito de sodio. La sal de disulfito se desproporciona a la solución acuosa a los aniones de sulfito de hidrógeno necesarios para la conversión de citosina. Cuando se discute adelante la concentración de bisulfito, esto se refiere a la concentración de sulfito de hidrógeno y aniones de sulfito en la solución de reacción. Para el método de acuerdo con la invención, son posibles los rangos de concentración de 0.1 a 6 mol/l. Se prefiere particularmente un rango de concentración de 1 a 6 mol/l, y se prefiere más particularmente, 2-4 mol/l.

Un tratamiento de bisulfito se puede llevar a cabo esencialmente como se describe en el documento WO05/038051 o en el documento WO 2006/113770. De acuerdo con esto, el ADN se hace reaccionar con un reactivo de bisulfito, caracterizado porque dicha reacción se lleva a cabo en la presencia de compuestos n-alquilenoglicol, preferiblemente en la presencia de sus éteres dialquilo, y se prefiere particularmente en la presencia de dimetil éter dietilenglicol (DME).

Se pueden utilizar compuestos n-alquilenoglicol se pueden utilizar en un rango de concentración diferente. Se utiliza preferiblemente DME en concentraciones entre 1-35 % (vol/vol), más preferiblemente entre 5 y 25 %, y más preferiblemente en una concentración de 10 % de DME.

El tratamiento con un bisulfito puede comprender un secuestrante de radical, en particular ácido 6- hidroxí-2, 5, 7, 8,- tetrametilcromano 2- carboxílico o ácido gálico, y un solvente orgánico, en particular DME. Preferiblemente el secuestrante de radical es derivados cromano, por ejemplo, ácido 6- hidroxí-2, 5, 7, 8,- tetrametilcromano 2- carboxílico (también conocido como: Trolox-C™) o derivado del mismo. La concentración para ácido 6- hidroxí-2, 5, 7, 8,- tetrametilcromano 2- carboxílico puede estar entre 35 y 50 mmol/l. Preferiblemente el secuestrante de radical es ácido gálico (ácido 3, 4, 5- trihidroxí benzoico) o un derivado del mismo. La concentración para ácido gálico y derivados de ácido gálico puede estar entre 50 y 60 mmol/l.

Secuestrantes adicionales adecuados para uso de acuerdo con la invención se enumeran en la solicitud de patente WO 01/98528.

5 La conversión de bisulfito se puede realizar en un amplio rango de temperatura de 0 a 95 °C. Sin embargo, a temperaturas mayores los índices de conversión y descomposición del aumento de ADN, preferiblemente la temperatura de reacción está entre 0-80° C, preferiblemente entre 30-75° C. se prefiere particularmente un rango entre 35-65 °C; se prefiere más particularmente entre 45-55° C. El tiempo de reacción óptimo del tratamiento con bisulfito depende de la temperatura de reacción. El tiempo de reacción está normalmente entre 1 y 18 horas (véase: Grunau et al. 2001, Nucleic acids Res. 2001, 29(13): E65-5). El tiempo de reacción es habitualmente 4-10 horas para una temperatura de reacción en el rango de 45-55° C. Más preferiblemente, la temperatura de reacción es 50° C y el tiempo de reacción 7
10 horas. (se utilizaron 50C 7h!)

15 La conversión de bisulfito se realiza preferiblemente a temperaturas de reacción moderada, en donde la temperatura de reacción luego aumenta claramente durante un periodo corto por lo menos una vez durante el curso de la conversión. De esta forma, la efectividad de la conversión de bisulfito puede aumentar claramente de forma sorprendente. Los aumentos de temperatura de corta duración se denominan "picos térmicos". La temperatura de reacción "estándar" fuera de los picos térmicos se denota como la temperatura de reacción básica. La temperatura de reacción básica está entre 0 y 80° C, preferiblemente entre 30-75° C, más preferiblemente entre 35-65 °C, más preferiblemente entre 45-55° C, como se describió anteriormente. Más particularmente, se prefiere una temperatura de reacción de 50° C.

20 La temperatura de reacción durante un pico térmico aumenta casi 85 °C mediante por lo menos un pico térmico. El número óptimo de picos térmicos es una función de la temperatura de reacción básica. Entre más bajo es el número óptimo mayor de picos térmicos, menor es la temperatura de reacción básica. Por lo menos es necesario un pico térmico en cada caso. Y, de otra parte, en principio, es concebible cualquier número de picos térmicos. Por supuesto, se debe considerar que con un gran número de aumento de la temperatura, el índice de descomposición del ADN también aumenta, y una conversión óptima no se asegura más. El número preferido de picos térmicos está de esta forma entre 1 y 10 picos térmicos cada vez, dependiendo de la temperatura de reacción básica. De esta forma se prefiere particularmente un número de dos o 5 picos térmicos. Los picos térmicos aumentan la temperatura de reacción preferiblemente de 85 a 100° C, particularmente preferiblemente a 90-100° C, y más preferiblemente a 94° C-100° C.
25

30 La duración en el tiempo de los picos térmicos también depende del volumen de la tanda de reacción. Preferiblemente, se asegura que la temperatura aumenta uniformemente a través de la solución de reacción total. Preferiblemente, para una tanda de reacción de 320 µl cuando se utiliza un termociclizador, se prefiere una duración de 5 min a 99° C. A partir de esto, un experto en la técnica será capaz de determinar fácilmente las duraciones adecuadas de picos térmicos en relación a una variedad de volúmenes de reacción. Los picos térmicos descritos anteriormente conducen a índices de conversión significativamente mejores en la conversión de la reacción de bisulfito.

35 Dicho tratamiento de ADN con bisulfito se prefiere particularmente debido a que tiene diversas ventajas importantes en comparación con otros métodos o Kits conocidos del estado de la técnica. Estas ventajas son: i) mayor rendimiento de ADN convertido; ii) una conversión casi completa de citosina no metilada mientras que la citosina metilada permanece sin cambio; y iii) casi no hay fragmentación adicional de ADN. Estas ventajas se basan en condiciones de reacción más suaves debido a i) una desnaturalización térmica de ADN; ii) una concentración de bisulfito comparablemente menor; iii) un pH ligeramente más alcalino y iv) el uso de secuestrantes de radicales más eficientes y más efectivos.

Preferiblemente, el tratamiento del ADN con un reactivo de bisulfito comprende:

40 mezclar de aproximadamente 10 a aproximadamente 250 µl de una solución que comprende ADN con aproximadamente 45 a aproximadamente 750 µl de solución de bisulfito, la solución de bisulfito que tiene un pH en el rango de aproximadamente 5.45 a aproximadamente 5.50 que comprende aproximadamente 4-5 mol/l de hidrogensulfito, preferiblemente aproximadamente 4.83 a aproximadamente 4.93 mol/l de hidrogensulfito;

45 agregar aproximadamente 5 a aproximadamente 500 µl de una solución de secuestrante de radical orgánico, la solución de secuestrante de radical orgánico comprende un solvente orgánico y aproximadamente 10 a aproximadamente 750 mmol/l de ácido 6- hidroxí-2, 5, 7, 8- tetrametil-croman-2- carboxílico; y

50 aplicar un protocolo de temperatura durante aproximadamente 2 a aproximadamente 18 h, en donde la reacción se realiza en un rango de temperatura de aproximadamente 0 a aproximadamente 80° C con aproximadamente 2 a aproximadamente 5 de aumento de temperatura adicional, en cada caso durante aproximadamente 0.5 a aproximadamente 10 min, a una temperatura de aproximadamente 85 a aproximadamente 100° C que incluye un aumento inicial de la temperatura a una temperatura de aproximadamente 85 a aproximadamente 100° C.

Preferiblemente, el tratamiento comprende el uso de un reactivo de bisulfito comprende adicionalmente:

Mezclar aproximadamente 10 a aproximadamente 250 µl de una solución que comprende ADN con aproximadamente 45 a aproximadamente 750 µl de solución de bisulfito, la solución de bisulfito que tiene un pH en el rango de aproximadamente 5.45 a aproximadamente 5.50 que comprende aproximadamente 4-5 mol/l de hidrogensulfito, preferiblemente aproximadamente 4.83 a aproximadamente 4.93 mol/l de hidrogensulfito;

5 agregar aproximadamente 5 a aproximadamente 500 µl de una solución de secuestrante de radical orgánico, la solución de secuestrante de radical orgánico que comprende un solvente orgánico y aproximadamente 10 a aproximadamente 750 mmol/l de ácido 6- hidroxí-2, 5, 7, 8-tetrametil-croman-2 -carboxílico; y

10 aplicar un protocolo de temperatura durante aproximadamente 2 a aproximadamente 18 h, en donde la reacción se realiza en un rango de temperatura de aproximadamente 0 a aproximadamente 80° C con aproximadamente 2 a aproximadamente 5 de aumento adicional de la temperatura, en cada caso durante aproximadamente 0.5 a aproximadamente 10 min, a una temperatura de aproximadamente 85 a aproximadamente 100° C que incluye un aumento inicial de la temperatura a una temperatura de aproximadamente 85 a aproximadamente 100° C.

Preferiblemente, tratar ADN con un reactivo de bisulfito comprende:

15 mezclar de aproximadamente 50 a aproximadamente 150 µl de una solución que contiene el ADN con aproximadamente 95 a aproximadamente 285 µl de la solución de bisulfito; agregar aproximadamente 15 a aproximadamente 45 µl de solución de DME, la solución de DME comprende aproximadamente 500 mmol/l de ácido 6-hidroxí-2, 5, 7, 8- tetrametil-croman-2- carboxílico disuelto en dietilenglicoldimetiléter; y

20 aplicar un protocolo de temperatura durante aproximadamente 3 a aproximadamente 16 h, en donde la reacción se realiza en un rango de temperatura de aproximadamente 45 a aproximadamente 55° C con aproximadamente 2 a aproximadamente 5 de aumento adicional de temperatura, en cada caso durante aproximadamente 3 a aproximadamente 5 min, a una temperatura de aproximadamente 94 a aproximadamente 100° C que incluye un aumento inicial de la temperatura a una temperatura de aproximadamente 94 a aproximadamente 100° C.

Preferiblemente, el tratamiento de bisulfito de ADN comprende:

25 mezclar de aproximadamente 50 a aproximadamente 150 µl de una solución que contiene el ADN con aproximadamente 95 a aproximadamente 285 µl de la solución de bisulfito; agregar aproximadamente 15 a aproximadamente 45 µl de solución de DME, la solución de DME comprende aproximadamente 500 mmol/l de ácido 6-hidroxí-2, 5, 7, 8- tetrametil-croman-2- carboxílico disuelto en dietilenglicoldimetiléter; y

30 aplicar un protocolo de temperatura durante aproximadamente 3 a aproximadamente 16 h, en donde la reacción se realiza en un rango de temperatura de aproximadamente 45 a aproximadamente 55° C con aproximadamente 2 a aproximadamente 5 de aumento adicional de temperatura, en cada caso durante aproximadamente 3 a aproximadamente 5 min, a una temperatura de aproximadamente 94 a aproximadamente 100° C que incluye un aumento inicial de la temperatura a una temperatura de aproximadamente 94 a aproximadamente 100° C.

35 Dicho tratamiento con un bisulfito conduce a sulfonación, a desaminación, o ambos de citosina no metilada. La desaminación es un proceso espontáneo en una solución acuosa y conduce a uracilo sulfonado (sulfato de uracilo) que comprende ADN. Aún no ocurre desulfonación.

Preferiblemente, el sulfonato de uracilo se desulfona a uracilo mediante calentamiento.

40 Preferiblemente, el ADN tratado con bisulfito se purifica por medio de gránulos de SiMAG/FK-Silanol (Chemicell GmbH, Alemania, Número de artículo 1101-01 o 1101-05) o los gránulos del Kit especial chemagic (Chemagen Biopolimer-Technologie Aktiengesellschaft; Número de artículo 1002). Se realiza purificación de acuerdo con las instrucciones del fabricante. Sin embargo y particularmente preferido, se intensifica la etapa de lavado. Preferiblemente, uno o más reguladores de lavado correspondientes cada uno se aplica en forma repetida, preferiblemente dos veces, en donde es aplicable hasta 600 µl de cada regulador de lavado (volumen combinado de todas las etapas de lavado realizadas con el mismo regulador de lavado).

45 Preferiblemente, el ADN después de tratamiento de bisulfito y si el caso puede ser después de purificación por medio de gránulos de SiMAG/FKSilanol (Chemicell GmbH, Alemania, Número de artículo 1101-01 o 1101-05) o los gránulos del Kit especial de ADN/ARN Viral chemagic en una etapa previa (Chemagen Biopolimer-Technologie Aktiengesellschaft; Número de artículo 1002), se somete directamente a amplificación. Por lo tanto el sulfonato de uracilo se desulfona en la etapa de calentamiento inicial. Si es el caso, la etapa de calentamiento inicial dura 5 min, 10 min, 15 min, 20 min, 30 min, 45 min o 60 min con el propósito de permitir una desulfonación completa particularmente preferida del ADN que
50 contiene sulfonato de uracilo. Preferiblemente, la temperatura de la etapa de calentamiento inicial está en el rango de 80-100° C y más preferiblemente en el rango de 90-95° C. La desulfonación mediante tratamiento de calor se

caracteriza adicionalmente porque se realiza en condiciones alcalinas bajas, preferiblemente en el rango de pH 7.5-10, más preferiblemente en el rango de pH 8.0-9.5.

Preferiblemente, el ADN genómico se limpia de ADN contaminado. Para esto, el ADN que comprende uracilo sulfonado se pone en contacto y se incuba con una enzima que degrada específicamente uracilo no sulfonado que contiene ácidos nucleicos. Dicha enzima es por ejemplo Uracilo-ADN-Glucosilasa (UNG).

Preferiblemente para proporcionar un ADN de plantilla descontaminado para reacciones de amplificación con base en polimerasa, el ADN de plantilla sulfonado y/o desaminado se mezclan con una actividad UNG y los componentes requeridos para una reacción de amplificación mediada por polimerasa o un ensayo de detección con base en amplificación. Después de la degradación de uracilo no sulfonado que contiene ácidos nucleicos mediante el uso de UNG, la actividad UNG se termina y el ADN de plantilla se desulfona mediante aumento de la temperatura. Posteriormente el ADN de plantilla está listo para ser amplificado.

Preferiblemente, degradación, terminación, desulfonación y amplificación ocurre en un único tubo durante una reacción de amplificación con base en polimerasa y/o un ensayo con base en amplificación. Preferiblemente dicha amplificación se realiza en la presencia de dUTP en lugar de dTTP.

Preferiblemente, el ADN sulfonado y parcialmente o completamente desaminado después de tratamiento de bisulfito se somete directamente a una reacción de amplificación con base en polimerasa y/o un ensayo con base en amplificación sin ninguna desulfonación anterior. La desulfonación ocurre durante aumento inicial de la temperatura de la reacción de amplificación.

Preferiblemente, se analiza ADN proporcionado como se describe. Preferiblemente, la metilación del ADN proporcionado, en particular un estado de metilación o un patrón de metilación. Por lo tanto el análisis de metilación comprende por lo menos uno seleccionado del grupo que consiste del método de amplificación, método PCR, método de amplificación isotérmica, método NASBA, método LCR, método de amplificación específico de metilación, método MSP (PCR Específico de Metilación), método MSP anidado, método HeavyMetil™, método de detección, método de detección específico de metilación, método de secuenciamiento de bisulfito, detección por medio de disposiciones de ADN, detección por medio de microdisposiciones de oligonucleótido, detección por medio de microdisposiciones CpGisland, detección por medio de enzimas de restricción, amplificación específica de metilación simultánea y método de detección, método COBRA, PCR en tiempo real, método PCR HeavyMetil™ en tiempo real, método MSP Metilight™, método Metilight™, método Metilight™ Algo™, método QM, método Headloop Metilight™, método HeavyMetil™ Metilight™, método HeavyMetil™ Scorpion™, método MSP Scorpion™, método Headloop Scorpion™, extensión de cebador sensible a metilación, y método Ms-SNuPE (Extensión de Cebador de Nucleótido Único sensible a Metilación).

Preferiblemente, la molécula de ácido nucleico proporcionada se analiza con respecto a la metilación. Los métodos adecuados son por ejemplo, pero no se limitan a, método de amplificación, método PCR, método de amplificación isotérmica, método NASBA, método LCR, método de amplificación específico de metilación, método MSP (PCR Específico de Metilación), método MSP anidado, método HeavyMetil™, método de detección, método de detección específico de metilación, método de secuenciamiento de bisulfito, detección por medio de disposiciones de ADN, detección por medio de microdisposiciones de oligonucleótido, detección por medio de microdisposiciones de isla CpG, detección por medio de enzimas de restricción, método de detección y amplificación específica de metilación simultánea, método COBRA, PCR en tiempo real, método PCR HeavyMetil™ en tiempo real, método MSP Metilight™, método Metilight™, método Metilight™ Algo™, método QM, método Headloop Metilight™, método HeavyMetil™ Metilight™, método HeavyMetil™ Scorpion™, método MSP Scorpion™, método Headloop Scorpion™, extensión de cebador sensible a metilación, y método Ms-SNuPE (Extensión de Cebador de Nucleótido Único sensible a Metilación) o combinaciones de los mismos. Dichos métodos se describen en detalle adelante.

El método de amplificación puede ser cualquier clase de método de amplificación. Un experto en la técnica está en el conocimiento de un método de amplificación adecuado. Preferiblemente, el método de amplificación es un método PCR. Un experto en la técnica conoce métodos PCR adecuados que se pueden utilizar de acuerdo con la invención. Preferiblemente, el método de amplificación es una amplificación isotérmica. Se conocen bien en la técnica métodos de amplificación adecuados para uso de acuerdo con la invención. Dicho método puede ser por ejemplo pero no se limita al método de Extensión de Cebador. Preferiblemente, el método de amplificación es un método NASBA. Los métodos NASBA con métodos de amplificación con base en ADN-ARN que comprenden el uso de una Transcriptasa Inversa, una polimerasa de ARN y una RNasa. Un experto en la técnica está consciente de métodos NASBA que se pueden utilizar de acuerdo con la invención. Preferiblemente, el método de amplificación es un método de Reacción de Cadena Ligasa. En general, estos son métodos de amplificaciones que se basan en el uso de una ligasa. Un experto en la técnica conoce LCR adecuado que se puede utilizar de acuerdo con la invención.

Preferiblemente, el método de amplificación es una amplificación específica de metilación. Los métodos de amplificación específicos de metilación adecuados se conocen por aquellos expertos en la técnica. Preferiblemente, el método de amplificación específico de metilación es el método PCR Específico de Metilación (MSP). El método MSP permite evaluar el estado de metilación de virtualmente cualquier grupo de sitios CpG dentro de una isla CpG, independiente del

5 uso de enzimas de restricción sensibles a metilación (Herman et al. Proc. Natl. Acad. Sci. USA 93:9821-9826, 1996; Patente Estadounidense No. 5, 786, 146). En resumen, el ADN se modifica mediante bisulfito de sodio que convierte todas las citosinas no metiladas, pero no las citosinas metiladas a uracilo, y posteriormente se amplifica con cebadores
10 específicos para ADN metilado versus no metilado. Los pares de cebador MSP contienen por lo menos un cebador, que hibrida a un dinucleótido CpG tratado con bisulfito. Por lo tanto, la secuencia de dichos cebadores comprende por lo menos un dinucleótido CpG. Los cebadores específicos MSP para ADN no metilado contienen una "T" en la posición 3' de la posición C en el CpG. Preferiblemente, por lo tanto, se requiere la secuencia base de dichos cebadores para que comprenda una secuencia que tiene una longitud de por lo menos 9 nucleótidos que hibrida a la secuencia de ácidos nucleicos convertida a bisulfito, en donde la secuencia base de dichos oligómeros comprende por lo menos un
15 dinucleótido CpG. El MSP requiere solo cantidades pequeñas de ADN y es sensible a 0.1 % de alelos metilados de un locus de isla CpG dado. Los tratamientos de bisulfito y el método de amplificación descrito aquí se pueden utilizar en combinación con este método de detección.

15 Preferiblemente, la amplificación es un método MSP anidado. El método MSP anidado se lleva a cabo esencialmente como se describe en los documentos WO 02/18649 y US 20040038245. Este método MSP considera el conflicto evidente de alta especificidad requerida del cebador MSP para diferenciar suficientemente entre las posiciones CG y TG y permitir un emparejamiento incorrecto con el propósito de crear un único sitio de restricción. Esto comprende la expansión de los números de copia de la región genética de interés. Por lo tanto se utiliza una reacción de cadena polimerasa para amplificar una porción de dicha región en donde la metilación de interés reside. Por lo tanto se genera un producto de amplificación. Luego se utiliza una alícuota de dicho producto en una segunda reacción de cadena de
20 polimerasa, específica de metilación para detectar la presencia de metilación. En otras palabras un PCR no específico de metilación se realiza antes del PCR específico de metilación.

25 Preferiblemente, el método de amplificación es el método HeavyMetil™. El método HeavyMetil™ se lleva a cabo esencialmente como se describe en el documento WO 02/072880 y Cottrell SE et al. Nucleic acids Res. 2004 Jan 13; 32(1):e10. Este método comprende el uso de bloquear oligonucleótidos de sonda que se pueden hibridar al ácido nucleico de plantilla tratado con bisulfito concurrentemente con los cebadores PCR. Preferiblemente, los oligonucleótidos de bloqueo se caracterizan porque su secuencia base comprende una secuencia que tiene una longitud de por lo menos 9 nucleótidos que hibrida a la secuencia de ácidos nucleicos químicamente tratada. Por lo tanto la secuencia base de dichos oligonucleótidos bloqueadores comprende por lo menos un dinucleótido CpG, TpG o CpA. La amplificación del ácido nucleico de plantilla se suprime en el caso de la secuencia complementaria de la sonda de
30 bloqueo está presente en la plantilla. En dicho caso la amplificación se termina en la posición 5' de la sonda de bloqueo. La sonda de bloqueo se puede diseñar para hibridar al ácido nucleico tratado con bisulfito en una forma específica del estado de metilación. Por ejemplo, los ácidos nucleicos metilados dentro de una población de ácidos nucleicos no metilados se puede detectar al suprimir la amplificación de ácidos nucleicos que no se metilan en una posición en cuestión. Por lo tanto una sonda de bloqueo comprendería un 'CpA' o 'TpA' en la posición en cuestión, como se opone a un 'CpG' si se desea la supresión de amplificación de ácidos nucleicos metilados. El uso de oligonucleótidos bloqueadores requiere una interrupción eficiente de amplificación mediada por polimerasa que los oligonucleótidos bloqueadores no se pueden alargar mediante la polimerasa. De acuerdo con el método HeavyMetil™, esto se logra a través del uso de bloqueadores que son 3'-desoxioligonucleótidos, u oligonucleótidos derivados en la posición 3' con diferente a un grupo hidroxilo "libre". Por ejemplo, pero no se limita a esto, los 3'-O-acetil oligonucleótidos son
35 representantes de una clase preferida de moléculas bloqueadoras. Adicionalmente, se debe precluir la degradación mediada por polimerasa de los oligonucleótidos bloqueadores. Preferiblemente, dicha preclusión comprende i) el uso de una polimerasa que carece de actividad exonucleasa 5'-3', o ii) el uso de oligonucleótidos bloqueadores modificados. Estos oligonucleótidos bloqueadores modificados se caracterizan por tener, por ejemplo pero no limitado a, puentes tioato en el terminal 5'. Esto hace la molécula bloqueadora resistente a nucleasa. No se pueden requerir aplicaciones particulares de dichas modificaciones 5' del oligonucleótido bloqueador. Por ejemplo, la degradación del oligonucleótido bloqueador se precluirá sustancialmente si se superponen los sitios de unión de cebador y bloqueador. Por lo tanto la unión del cebador se precluye (por ejemplo, en el caso de exceso de oligonucleótido bloqueador). Por lo tanto la polimerasa no se puede unir en el cebador y se alarga. Debido a que la no polimerasa extiende el cebador, no se degradará el oligonucleótido de bloqueo. Una realización particularmente preferida del método HeavyMetil™, para los
40 propósitos como se describe aquí, comprende el uso de oligómeros de ácido nucleico de péptido (PNA) como oligonucleótidos de bloqueo. Dicho oligómeros bloqueadores de PNA son idealmente adecuados debido a que no se degradan ni se extienden mediante la polimerasa.

45 Preferiblemente, el método de detección puede ser cualquier tipo de método de detección. Un experto en la técnica conoce métodos de detección adecuados. Preferiblemente, un método de detección puede ser cualquier tipo del método de detección que comprende el uso de un tinte fluorescente, un tinte no fluorescente, una etiqueta de masa, una separación por tamaño, o una separación por peso. Por ejemplo, pero no se limita a esto, el método de detección es una separación por tamaño en un gel de agarosa seguido por tinción de gel de ADN por medio de un tinte fluorescente. Preferiblemente, el método de detección es una detección específica de metilación. Un experto en la técnica conoce métodos de detección específicos de metilación adecuados. Preferiblemente, el método de detección específico de
50 metilación es un método de secuenciamiento de bisulfito. El método de secuenciamiento de bisulfito se lleva a cabo esencialmente como se describe en Frommer et al. Proc. Natl. Acad. Sci. USA 89:1827-1831, 1992. El método de secuenciamiento de bisulfito es un método en donde se lleva a cabo el secuenciamiento de un fragmento amplificado

- 5 previamente del ADN genómico de bisulfito tratado. Cuando el ADN tratado con bisulfito se amplifica antes de secuenciamiento, se puede utilizar un método de amplificación como descrito aquí en combinación con este método de detección. Se prefiere especialmente adicionalmente que los resultados de un secuenciamiento de bisulfito se analicen esencialmente como se describe en el documento EP 02090203.7. En resumen, de acuerdo con este método el grado de metilación de una citosina se determina por medio de un electroferograma de una o más bases. Por lo tanto se calcula el área por debajo del electroferograma de una base detectada. El grado de metilación luego se deduce al comparar este valor para una posición de citosina que se va a analizar con el valor obtenido para una citosina no metilada. Para mejores resultados, la determinación y la consideración del índice de conversión de citosina a uracilo del tratamiento de bisulfito y/o una estandarización de las señales de electroferograma es favorable.
- 10 Preferiblemente, el método de detección es un método de la detección por medio de una disposición de ADN. Un experto en la técnica conoce el lote de disposiciones de ADN adecuadas. Preferiblemente, una disposición de ADN comprende moléculas de ADN que se unen a o además se asocian con una fase sólida. La disposición se puede caracterizar, por ejemplo pero no se limita a esto, en que las moléculas de ADN se disponen en la fase sólida en la forma de una red rectangular o hexagonal. Por lo tanto la fase sólida es por lo menos una fase seleccionada del grupo que comprende: sílice, vidrio, poliestireno, aluminio, acero, hierro, cobre, níquel, plata, oro, nitrocelulosa o plásticos tales como pero no se limita a nylon. Pero también son imaginables combinaciones de dichos materiales. Para la detección, el ADN que hibrida en la disposición se marca, preferiblemente con un tinte fluorescente. Dicho etiquetado es por ejemplo, pero no limitado a esto, la unión simple de tintes Cy3 y Cy5 en 5'-OH del fragmento de ADN. La detección de la fluorescencia del ADN hibridado se puede llevar a cabo, por ejemplo, pero no limitado a esto, por medio de un microscopio confocal.
- 15 Preferiblemente, el método de detección es un método para la detección por medio de una microdisposición de oligonucleótido. Una visión general de la técnica anterior en la fabricación de disposición de oligómero por ejemplo pero no limitado a se puede deducir de una edición especial de Nature Genetics (Nature Genetics Supplement, Volume 21, January 1999, y de la literatura citada allí).
- 20 Preferiblemente, el método de detección es un método de detección por medio de una microdisposición de isla CpG. Por lo tanto el ADN asociado o inmovilizado de la disposición comprende las secuencias que se derivan de islas CpG.
- 25 Preferiblemente, el método de detección es un método de la detección por medio de una disposición de ADN como se describe esencialmente en los documentos WO 99/28498, WO 01/38565, o WO 02/18632.
- 30 Preferiblemente, el método de detección es un método para la detección por medio de enzimas de restricción. Un experto en la técnica conoce los métodos adecuados.
- 35 Preferiblemente, la amplificación específica de metilación y la detección se llevan a cabo simultáneamente. Se conocen métodos adecuados por aquellos expertos en la técnica. De acuerdo con una realización preferida particular, el método para amplificación específica de metilación simultánea y la detección es el método COBRA. El método COBRA es un método de metilación cuantitativo útil para determinar metilación de los niveles de ADN en un locus de gen específico en cantidades pequeñas de ADN genómico (Xiong & Laird, Nucleic acids Res. 25:2532-2534, 1997). De acuerdo con el método COBRA, se utiliza digestión de enzima de restricción para revelar las diferencias de secuencia dependientes de metilación en productos PCR de ADN tratado con bisulfito. Las diferencias de la secuencia dependientes de metilación primero se introducen el ADN genómico mediante tratamiento con bisulfito. La amplificación PCR del ADN que convierte bisulfito luego se realiza utilizando cebadores no específicos de metilación seguido por digestión de endonucleasa de restricción, electrofóresis de gel, y detección utilizando sondas de hibridación marcadas, específicas. Los niveles de metilación en la muestra original de ADN están representados por las cantidades relativas del producto PCR digerido y ni digerido en una forma linealmente cuantitativa a través de un amplio espectro de metilación de los niveles de ADN. Adicionalmente, la digestión de la enzima de restricción de productos PCR amplificados de ADN convertido a bisulfito también se utiliza, en el método descrito por Sadri & Hornsby (Nucl. Acids Res. 24:5058-5059, 1996). Se pueden utilizar tratamientos de bisulfito y métodos de amplificación descritos aquí en combinación con este método de detección.
- 40 Preferiblemente, el método para amplificación específica de metilación simultánea y la detección es un método PCR en tiempo real. Un experto en la técnica conoce métodos PCR en tiempo real adecuados. De acuerdo con una realización preferida particular, el método PCR en tiempo real es un método HeavyMetil™. El método HeavyMetil™ por lo tanto se realiza como se describió anteriormente por medio de una máquina de PCR en tiempo real.
- 45 Preferiblemente, el método PCR en tiempo real es un método Metilight™. El método Metilight™ es un método de metilación cuantitativo de alto rendimiento que utiliza tecnología PCR en tiempo real con base en fluorescencia (TaqMan™) que no requiere manipulaciones adicionales después de la etapa PCR (Eads et al., Cancer Res. 59:2302-2306, 1999). En resumen, el proceso Metilight™ empieza con una muestra mezclada de ADN genómico que se convierte, en una reacción de bisulfito, a un grupo mezclado de diferencias en la secuencia dependiente de metilación de acuerdo con procedimientos estándar. El PCR con base en fluorescencia luego se realiza en una reacción PCR "no sesgada" (con cebadores que no superponen los sitios de metilación CpG conocidos), o en una reacción "sesgada" (con cebadores PCR que superponen dinucleótidos CpG conocidos). Puede ocurrir la discriminación de secuencia en
- 50
- 55

5 cualquier nivel del proceso de amplificación o a nivel del proceso de detección de fluorescencia, o ambos. Se puede utilizar el método Metilight™ como una prueba cuantitativa para patrones de metilación en la muestra de ADN genómico, en donde ocurre la discriminación de secuencia a nivel de hibridación de sonda. En esta versión cuantitativa, la reacción PCR proporciona amplificación no sesgada en la presencia de una sonda fluorescente que superpone un sitio de metilación putativo particular. Un control no sesgado para la cantidad de ADN de entrada se proporciona mediante una reacción en la que ninguno de los cebadores, ni la sonda superponen cualesquiera dinucleótidos CpG. Alternativamente, se logra una prueba cualitativa para metilación genómica mediante el sondeo del grupo PCR sesgado con los oligonucleótidos de control que no “cubren” los sitios de metilación conocidos (una versión con base en fluorescencia de la técnica “MSP” también denominado método MSP Metilight™), o con oligonucleótidos que cubre 10 sitios de metilación potenciales.

15 El proceso Metilight™ se puede utilizar con una sonda “TaqMan®” en el proceso de amplificación. Por ejemplo, se trata el ADN genómico de hebra doble con bisulfito y se somete a uno de dos grupos de reacciones PCR utilizando sondas TaqMan®; por ejemplo, con cebadores sesgados y sonda TaqMan®, o cebadores no sesgados y sonda TaqMan®. La sonda TaqMan® es etiqueta dual con moléculas “indicadoras” y “de detención” fluorescentes, y se diseña para ser específico para una región de relativamente alto contenido de GC de tal manera que se funde una temperatura mayor de aproximadamente 10° C en el ciclo PCR que los cebadores inverso y delantero. Esto permite que la sonda TaqMan® permanezca completamente hibridados durante la etapa de hibridación/extensión PCR. Como la polimerasa Taq sintetiza enzimáticamente una nueva hebra durante PCR, eventualmente alcanzará la sonda TaqMan® hibridada. La actividad polimerasa Taq 5' a endonucleasa 3' luego desplazará la sonda TaqMan® al digerirla para liberar la molécula 20 indicadora fluorescente para detección cuantitativa de su señal ahora no apagada utilizando un sistema de detección fluorescente en tiempo real.

25 Las variaciones en la tecnología de detección TaqMan® que también son adecuadas incluyen el uso de tecnología de sonda dual (LightCycler™), cebadores de amplificación fluorescente (tecnología Sunrise™), sondas Molecular Beacon (Tyagi S., and Kramer F.R., Nature Biotechnology 14, 303-308, 1996), cebadores Scorpion (Whitcombe et al., Nature and Biotechnology, 17, 804-807, 1999), o sondas de Oligonucleótido de Doble Tinte LNA (Locked Nucleid Acid) (Exiqon A/S). Todas estas técnicas se pueden adaptar en una forma adecuada para uso con ADN tratado con bisulfito, y más aún para análisis de metilación dentro de dinucleótidos CpG.

Los tratamientos de bisulfito y métodos de amplificación descritos aquí se pueden utilizar en combinación con el método Methy- Light™ o sus variantes.

30 Preferiblemente, el método PCR en tiempo real es el método Metilight™ ALGO™. El método Metilight™ ALGO™ es un método mejorado del método Metilight™ como esencialmente se describe en el documento EP 04090255.3. De acuerdo con este método mejorado, el grado de metilación se calcula a partir de intensidades de señal de sonda utilizando diferentes algoritmos.

35 Preferiblemente, el método PCR en tiempo real es el ensayo QM (metilación cuantitativa). Este ensayo es una metilación no específica y por lo tanto amplificación PCR en tiempo real no sesgada. Esto está acompañado por el uso de dos sondas específicas de metilación (Metilight™) una para el amplificado metilado y un segundo para el amplificado no metilado. De esta forma, se generan dos señales que se pueden utilizar a) para determine la relación de ácidos nucleicos metilados (CG) a no metilados (TG), y al mismo tiempo b) para determinar la cantidad absoluta de ácidos nucleicos metilados. Para el último, es necesaria una calibración del ensayo con una cantidad conocida del ADN de control. 40

45 Preferiblemente, el método para amplificación específica de metilación simultánea y la detección es un método PCR Headloop. El método PCR Headloop es un método PCR de supresión. Se lleva a cabo esencialmente como se describe en Rand K.N., et al., Nucleic Acid Research, 33(14), e127. Es un método PCR para distinguir las secuencias relacionadas en las que la selectividad de amplificación es dependiente de la secuencia de amplicón. Se incluye una extensión 5' en uno (o ambos) cebadores que corresponden a las secuencias dentro de uno de los amplicones relacionados. Después de copia e incorporación en el amplificado esta secuencia es luego capaz de regresar, hibridar a las secuencias internas y cebar para formar una estructura de horquilla. Esta estructura luego evita amplificación adicional. De esta forma, no se afecta la amplificación de las secuencias que contienen un emparejamiento correcto para la extensión 5' mientras que la amplificación de las secuencias que contienen emparejamiento incorrecto o que carecen de la secuencia se suprime. 50

Preferiblemente, el método para amplificación específica de metilación simultánea y la detección es una combinación del método PCR Headloop y el método Metilight™, también denominado método Headloop Metilight™.

55 Preferiblemente, el método para amplificación específica de metilación simultánea y la detección es un método Scorpion™. Este método primero se describe por Whitcombe et al.: Detection of PCR products using self-probing amplicons and fluorescence. Nat Biotechnol. 1999; 17(8):804-7; Thelwell et al.: Mode of action and application of Scorpion™ primers to mutation detection. Nucleic Acids Res. 2000 Oct 1; 28(19):3752-61; US 6,326,145; US 6,365,729; US 20030087240 A1). Diversas realizaciones de este método se conocen por aquellos expertos en la técnica. Todos

5 estos métodos tienen sondeo intramolecular en común. De acuerdo con la así llamada variante Hairloop, los cebadores Scorpion™ poseen una secuencia de sonda específica en su extremo 5'. Esta secuencia está presente en una configuración similar a Hairloop. Se ubican un tinte fluorescente y un extintor en proximidad espacial al final de la secuencia de sondeo. Después de desnaturalización posterior a un ciclo de amplificación, la sonda hibrida intramolecularmente en la secuencia de cebador alargado de la misma hebra. Por lo tanto el Hairloop se abre, el tinte y el extintor se separan y de esta forma se puede detectar la señal del tinte.

Otras variantes del método Scorpion™ son por ejemplo la variante Duplex (Solinas et al.: Duplex Scorpion™ primers in SNP analysis and FRET applications. Nucleic acids Res. 2001 Oct 15;29(20):E96), o las variantes como se describe en los documentos US 6,326,145 y US 20030087240).

10 Preferiblemente, el método Scorpion™ es un método como se describe esencialmente en el documento WO 05/024056.

Preferiblemente, el método para amplificación específica de metilación simultánea y la detección es una combinación del método HeavyMetil™ y el método Scorpion™, también denominado método HeavyMetil™ Scorpion™.

Preferiblemente, el método para amplificación específica de metilación simultánea y la detección es una combinación del método HeavyMetil™ y el método Metilight™, también denominado método HeavyMetil™ Metilight™.

15 Preferiblemente, el método para amplificación específica de metilación simultánea y la detección es una combinación del método MSP y el método Scorpion™, también denominado método MSP Scorpion™.

Preferiblemente, el método para amplificación específica de metilación simultánea y la detección es una combinación del método Headloop y el método Scorpion™, también denominado método Headloop Scorpion™.

20 Preferiblemente, el método para amplificación específica de metilación simultánea y la detección es un método de extensión de cebador específico de metilación. Un experto en la técnica conoce varios métodos que se pueden utilizar de acuerdo con la invención.

25 Preferiblemente, el método de extensión de cebador específico de metilación es el método Ms-SNuPE (Extensión de Cebador de Nucleótido Único sensible a metilación). El método Ms-SNuPE es un método como se lleva a cabo esencialmente como se describe en Gonzalgo et al., Nucleic acids Research 25(12), 2529-2531, 1997 y Patente Estadounidense 6, 251, 594. De acuerdo con el método Ms-SNuPE, se amplifican las regiones de interés mediante PCR de ADN tratado con bisulfito. Después de la purificación de los productos PCR, los cebadores se hibridan próximamente en la parte frontal de la posición que se va a analizar. El cebador luego se alarga mediante un único nucleótido con dCTP etiquetado o con dTTP etiquetado en forma diferente. En el caso que la citosina en el ADN original se metile, luego se incorporará dCTP debido a que las citosinas metiladas permanecen sin cambio durante tratamiento de bisulfito.

30 En otro caso, la citosina en el ADN original ADN no se metila, luego se incorporará dTTP debido a que la citosina no metilada se convierte a uracilo mediante tratamiento de bisulfito y PCR posterior sustituirá uracilo por timina. Mediante la detección de las diferentes etiquetas, se puede distinguir si una citosina de una posición CpG se metila o no metila. El método MS-SNuPE también se puede realizar en forma cuantitativa.

35 Preferiblemente, el método de extensión de cebador específico de metilación es un método como se describe esencialmente en los documentos WO 01/062960, WO 01/062064, o WO 01/62961. Todos estos métodos se pueden realizar en forma cuantitativa. De acuerdo con el documento WO 01/062960, el cebador que se extiende hibrida con su terminal 3' complete o solo parcialmente en las posiciones de interés. Una extensión de por lo menos un nucleótido ocurre solo si el cebador hibrida completamente. El documento WO 01/062064 describe un método en el que el cebador que se extiende hibrida próximamente adyacente o a una distancia de hasta diez bases en la posición que se va a analizar. El cebador luego se extiende mediante por lo menos un único nucleótido. El tercer método se describe en el documento WO 01/62961. De acuerdo con este método, se hibridan dos grupos de oligonucleótidos al ADN amplificado después de tratamiento de bisulfito. El primer tipo de oligonucleótido hibrida 5' próximamente adyacente o a una distancia de hasta 10 bases en la posición que se va a analizar. El segundo tipo de oligonucleótido hibrida en el ADN amplificado de tal manera que su terminal 5' hibrida 3' próximamente adyacente a dicha posición que se va a analizar. A través de estos, los dos oligonucleótidos se separan entre sí por un espacio en el rango de 1 a 10 nucleótidos. El primer tipo de oligonucleótido luego se extiende por medio de una polimerasa, en donde se agrega no más que el número de nucleótidos está entre los dos oligonucleótidos. Por lo tanto se utilizan nucleótidos que comprenden dCTP y/o dTTP diferencialmente etiquetado. Los dos oligonucleótidos luego se ligan entre sí por medio de una enzima de ligasa. En el caso que la citosina del ADN original se metile, luego se incorporará dCTP. En el caso que la citosina en el ADN original no se metile, entonces se incorporará dTTP.

50

Por supuesto también son adecuados otros métodos similares, que son métodos desarrollados adicionalmente de los métodos mencionados o combinaciones de los mismos.

La invención proporciona un método mejorado para la determinación de la metilación del gen septina 9 mediante un ensayo con base en amplificación. En particular, la presencia o ausencia de dinucleótidos CpG del gen septina 9 se determina mediante ensayos con base en amplificación de la invención. Específicamente, el método comprende:

- 5 a) tratar ADN genómico con uno o más reactivos para convertir bases de citosina no metiladas a sulfonato de uracilo o a otra base que tiene un comportamiento de unión diferente que citosina, mientras que la citosina metilada permanece sin cambio;
- b) amplificar el ADN tratado por medio de
- 10 i) un oligonucleótido que comprende o que consiste de una secuencia definida por la SEQ ID NO: 5 o una variante de la misma con eliminación del terminal 5' y/o del terminal 3 de 1, 2, 3, 4 o 5 nucleótidos; y
- ii) un oligonucleótido que comprende o que consiste de una secuencia como se define por la SEQ ID NO: 44 o una variante de la misma con eliminación del terminal 5' y/o del terminal 3 de 1, 2, 3, 4 o 5 nucleótidos;
- en donde dichos oligonucleótidos son adecuados para uso como cebadores;
- c) deducir la presencia o ausencia de metilación de los dinucleótidos CpG amplificados en la etapa b) de los resultados de la etapa b).

- 15 De acuerdo con una realización preferida, se puede extraer ADN o de otra forma aislar de una muestra obtenida de un individuo. El ADN genómico se trata con uno o más reactivos para convertir bases de citosina no metiladas a uracilo o a otra base que es detectablemente diferente a citosina en términos de las propiedades de hibridación, mientras que la citosina metilada permanece sin cambio. Un reactivo preferido es un reactivo de bisulfito. Otros reactivos preferidos con desaminasas citidina. Estas enzimas convierten citidina no metilada más rápido que citidina metilada (Brandsteitter et al.
- 20 Activation induced cytidine deaminase deaminates deoxycytidine on single-stranded ADN but requires the action of RNase. Proc Natl Acad Sci USA. 2003 Apr 1; 100(7):4102-7).

Después de esto el ADN tratado se somete a una reacción de amplificación, en donde la secuencia metilada se amplifica preferiblemente sobre la secuencia no metilada, o en donde la secuencia no metilada se amplifica preferiblemente sobre la secuencia metilada. Preferiblemente la amplificación es una amplificación PCR.

- 25 Se hace una conclusión acerca de la metilación del gen septina 9 mediante la detección de la cantidad de la secuencia preferiblemente amplificada con el tiempo. Dicha detección se lleva a cabo preferiblemente por medio de análisis en tiempo real, particularmente análisis PCR en tiempo real preferido, análisis PCR Taqman en tiempo real, o análisis PCR Lightcycler en tiempo real.

- 30 De acuerdo con el documento WO 2006/113466, se puede determinar la metilación del gen septina 9 por medio de los oligonucleótidos de la SEQ ID NO: 92 y 93 utilizados como cebadores, los oligonucleótidos de la SEQ ID NO: 94 utilizados como bloqueador, y el oligonucleótido de la SEQ ID NO: 31 se utiliza como sonda. Como una alternativa al oligonucleótido de la SEQ ID NO: 31, la combinación de oligonucleótido de la SEQ ID NO: 95 y 96 se puede utilizar como combinación de sonda.

- 35 La invención se refiere a un ensayo B, en el que se analiza el ADN genómico de la SEQ ID NO: 87 dicha secuencia hace parte del gen septina 9. Después del tratamiento del ADN genómico con uno o más reactivos, preferiblemente con un reactivo de bisulfito, la hebra sentido o la secuencia complementaria inversa de la misma se analiza adicionalmente.

Por lo tanto el siguiente se utiliza el oligonucleótido o un oligonucleótido que consiste esencialmente del mismo como un cebador delantero e hibrida la metilación independientemente en el ADN tratado con bisulfito:

SEQ ID NO: 44 GATTGGTTGTTTATTAGTTATTATGT (emparejamiento incorrecto general "G")

- 40 La hibridación independiente de metilación se logra por medio de un nucleótido de emparejamiento incorrecto general tal como pero no limitado a guanina, arginina, o cualquier otro nucleótido o base adecuado artificial. El término "general" en este contexto significa que la base de emparejamiento incorrecto no se forma con la citosina metilada ni con la citosina no metilada convertida un par base Watson-Crick. Alternativamente, la hibridación independiente de metilación se logra por medio de una base universal tal como por ejemplo pero no limitado a nitroindol.

- 45 El siguiente oligonucleótido o un oligonucleótido que consiste esencialmente del mismo se utiliza como un cebador inverso:

SEQ ID NO: 5 AAATAATCCCATCCA ACTA

Preferiblemente, la amplificación utiliza uno de los siguientes oligonucleótidos o un oligonucleótido que consiste esencialmente del mismo, en donde dicho oligonucleótido se utiliza como un bloqueador. A través de esto, en una realización, el ADN metilado se amplifica preferiblemente sobre el ADN no metilado, aunque en otra realización, el ADN no metilado se amplifica preferiblemente sobre el ADN metilado:

5

SEQ ID NO: 7 GTTATTATGTTGGATTTTGTGGTTAATGTGTAG-INV
 SEQ ID NO: 49 ATTATGTTGGATTTTGTGGTTAATGTGTAGTTG-INV
 SEQ ID NO: 50 ATTATGTTGGATTTTGTGGTTAATGTGTAGTTG-INV
 SEQ ID NO: 51 CCATCCA ACTACACATTAACCACAAAATCCA-INV
 SEQ ID NO: 52 ATCCA ACTACACATTAACCACAAAATCCA-INV
 SEQ ID NO: 53 CCAACTACACATTAACCACAAAATCCAA-INV
 SEQ ID NO: 54 CAACTACACATTAACCACAAAATCCA-INV
 SEQ ID NO: 50 ATTATGTTGGATTTTGTGGTTAATGTGTAGTTG-C3
 SEQ ID NO: 7 GTTATTATGTTGGATTTTGTGGTTAATGTGTAG-C3
 SEQ ID NO: 55 ATTAGTTATTATGTTGGATTTTGTGGTTAATGTGTAG-C3
 SEQ ID NO: 56 AGTTATTATGTTGGATTTTGTGGTTAATGTGTAGTTG-C3
 SEQ ID NO: 57 TTATGTTGGATTTTGTGGTTAATGTGTAGTTGG-C3

(INV = ligado base invertida (3'-3'); C3 = grupo propilo)

Dichos oligonucleótidos utilizados como bloqueadores pueden tener las modificaciones indicadas o cualesquiera otras modificaciones adecuadas que permiten que los oligonucleótidos actúen como bloqueadores, por ejemplo pero no limitado a acridina. Sin embargo, las modificaciones indicadas también se prefieren particularmente.

En particular, la SEQ ID NO: 7 se prefiere como bloqueador. En particular, se prefiere una modificación C3 a una modificación INV.

Se puede detectar ADN tratado amplificado mediante cualquier medio conocido en la técnica. En el caso más simple, esto es bromuro de etidio o verde SYBR. Preferiblemente, se detecta ADN amplificado tratado por medio de uno de los siguientes oligonucleótidos o un oligonucleótido que consiste esencialmente del mismo, en donde dicho oligonucleótido se utiliza como sonda:

15

SEQ ID NO: 58 HEX-CGGATTTTCGCGGTTAACGC-BHQ1
 SEQ ID NO: 59 HEX-CGTTAACCGCGAAATCCG-BHQ1
 SEQ ID NO: 60 HEX-CGCGTTAACCGCGAAATC-BHQ1
 SEQ ID NO: 59 TexRed-CGTTAACCGCGAAATCCG-BBQ650
 SEQ ID NO: 8 TexRed-TTAACCGCGAAATCCGAC-BBQ650
 SEQ ID NO: 61 TexRed-ATTTTCGCGGTTAACGC-BBQ650

(HEX, TexRed son tintes fluorescentes; BHQ1 = BlackHoleQuencher 1 y BBQ650 = Black-Berry Quencher 650 son extintores bien conocidos en la técnica)

Dichos oligonucleótidos utilizados como sondas pueden tener el etiquetado indicado con tintes y extintores o cualquier otro etiquetado adecuado con tintes o extintores. Sin embargo se prefieren en partes los tintes indicados o extintores.

En particular, la SEQ ID NO: 8 se prefiere como sonda.

Se describe adicionalmente un ensayo C, en el que se analiza el ADN genómico de SEQ ID NO: 88 de dicha secuencia que hace parte del gen septina 9. Después del tratamiento del ADN genómico con uno o más reactivos, preferiblemente con un reactivo de bisulfito, se analiza adicionalmente la hebra antisentido o la secuencia complementaria inversa de la misma.

Por esto, uno de los siguientes oligonucleótidos o un oligonucleótido que consiste esencialmente de los mismos se utiliza como un cebador delantero:

SEQ ID NO: 12 CCCACCAACCATCATAT
 SEQ ID NO: 13 CCCACCAACCATCATATC
 SEQ ID NO: 14 ACCCACCAACCATCATA
 SEQ ID NO: 15 CTACCCACCAACCATCATAT
 SEQ ID NO: 1 CCACCAACCATCATATC

En particular, la SEQ ID NO: 1 se prefiere como cebador delantero.

- 5 Uno de los siguientes oligonucleótidos o un oligonucleótido que consiste esencialmente del mismo se utiliza como un cebador inverso e hibrida independientemente la metilación en el ADN tratado con bisulfito:

SEQ ID NO: 16 GAAGTTGGAAATGATTTTATTTAGTT (emparejamiento incorrecto "G")
 SEQ ID NO: 17 GAAGTTGGAAATGATTTTATTTAGTTG (emparejamiento incorrecto "G")
 SEQ ID NO: 18 GAAGTTAGAAATGATTTTATTTAGTT (emparejamiento incorrecto "A")
 SEQ ID NO: 19 GAAGTTAGAAATGATTTTATTTAGTTG (emparejamiento incorrecto "A")
 SEQ ID NO: 20 AAGTT-dS-GAAATGATTTTATTTAGTT (-dS- = separador)
 SEQ ID NO: 21 GAAGTT-dS-GAAATGATTTTATTTAGTT (-dS- = separador)
 SEQ ID NO: 2 GAAGTT-dS-GAAATGATTTTATTTAGTTG (-dS- = separador)
 SEQ ID NO: 22 AAGTT-dS-GAAATGATTTTATTTAGTTG (-dS- = separador)

- 10 La hibridación independiente de metilación se logra por medio de un separador, en particular un dSpacer, o por medio de un nucleótido de emparejamiento incorrecto general tal como pero no limitado a guanina, arginina, o cualquier otro nucleótido o base adecuado artificial. El término "general" en este contexto significa que la base de emparejamiento incorrecto no forma con la citosina metilada ni la citosina no metilada convertida un par base Watson-Crick. Alternativamente, la hibridación independiente de metilación se logra por medio de una base universal tal como por ejemplo pero no limitado a nitroindol. En particular se prefiere la SEQ ID NO: 21 como cebador inverso.

- 15 Preferiblemente, la amplificación utiliza uno de los siguientes oligonucleótidos o un oligonucleótido que consiste esencialmente de los mismos como bloqueador con el propósito de amplificar preferiblemente el ADN metilado sobre el ADN no metilado:

SEQ ID NO: 23 CATCATATCAAACCCCACAATCAACACACAAC-INV
 SEQ ID NO: 24 CCATCATATCAAACCCCACAATCAACACACAA-INV
 SEQ ID NO: 9 ACCATCATATCAAACCCCACAATCAACACACA-INV
 SEQ ID NO: 23 CATCATATCAAACCCCACAATCAACACACAAC-C3
 SEQ ID NO: 3 CCATCATATCAAACCCCACAATCAACACACA-C3
 SEQ ID NO: 91 CCATCATATCAAACCCCACAATCAACACAC-C3
 SEQ ID NO: 25 ATCATATCAAACCCCACAATCAACACACAACT-C3
 SEQ ID NO: 26 ACCATCATATCAAACCCCACAATCAACACAC-C3
 SEQ ID NO: 27 AACCATCATATCAAACCCCACAATCAACACAC-C3
 SEQ ID NO: 28 AGTTGTGTGTTGATTGTGGGGTTTGATA-C3
 SEQ ID NO: 29 AGTTGTGTGTTGATTGTGGGGTTTG-C3
 SEQ ID NO: 30 ATTTAGTTGTGTTGATTGTGGGGTTTGAT-C3

(INV = ligado base invertido (3'-3'); C3 = grupo propilo)

- 20 Dichos oligonucleótidos utilizados como bloqueadores pueden tener las modificaciones indicadas o cualesquiera otras modificaciones adecuadas que permite que los oligonucleótidos actúen como bloqueadores, por ejemplo pero no limitado a acridina. Sin embargo, las modificaciones indicadas se prefieren en particular.

En particular, se prefiere la SEQ ID NO: 3 como bloqueador. En particular, se prefiere una modificación C3 a una modificación INV.

5 El ADN tratado amplificado se puede detectar mediante cualquier medio conocido en la técnica. En el caso más simple, esto es bromuro de etidio o verde SYBR. Preferiblemente, el ADN tratado amplificado se detecta por medio de uno de los siguientes oligonucleótidos o un oligonucleótido que consiste esencialmente de los mismos, en donde dicho oligonucleótido se utiliza como sonda:

SEQ ID NO: 31 FAM-GAACCCCGCGATCAACGCG-BHQ1

SEQ ID NO: 32 FAM-TAGTTGCGCGTTGATCGCGG-BHQ1

SEQ ID NO: 33 FAM-TAGTTGCGCGTTGATCGC-BHQ1

SEQ ID NO: 34 FAM-CCGCGATCAACGCGC-BHQ1

SEQ ID NO: 35 FAM-CGCGTTGATCGCGGG-BHQ1

SEQ ID NO: 36 FAM-CGCGTTGATCGCGG-BHQ1

SEQ ID NO: 37 FAM-ACCCCGCGATCAACG-BHQ1

SEQ ID NO: 38 FAM-TGATCGCGGGGTTG-BHQ1

SEQ ID NO: 39 FAM-AACCCCGCGATCAAC-BHQ1

SEQ ID NO: 40 FAM-GTTGATCGCGGGGTT-BHQ1

SEQ ID NO: 41 FAM-CCCGCGATCAACG-BHQ1

SEQ ID NO: 4 FAM-GATCGCGGGGTTGATA-BHQ1

SEQ ID NO: 42 FAM-CGATCAACGCGCACTAA-BHQ1

(FAM es un tinte fluorescente; BHQ1 = BlackHoleQuencher 1 es extintor bien conocido en la técnica)

10 Dichos oligonucleótidos utilizados como sondas pueden tener el etiquetado indicado con tintes y extintores o cualquier otro etiquetado adecuado con tintes y extintores. Sin embargo los tintes indicados y extintores se prefieren en particular. En particular, se prefiere como sonda la SEQ ID NO: 4.

En una realización particularmente preferida, una realización del ensayo C se combina con una realización del ensayo B.

15 Puede variar la posición de los oligonucleótidos que consiste de esencialmente de la SEQ ID NO: 1-84 y 91. Por esto, la secuencia de oligonucleótidos de la SEQ ID NO: 1-84, 91 se puede modificar mediante eliminación del terminal 5', eliminación del terminal 3', adición del terminal 5' y/o adición del terminal 3' de 1, 2, 3, 4, 5, 6, 7, 8, 9, o 10 nucleótidos. La adición de nucleótidos se lleva a cabo preferiblemente de acuerdo con la secuencia del ADN genómico convertido, en donde las citosinas que son putativamente capaces de ser metiladas (citosina dentro de los dinucleótidos CpG) se reemplazan por separadores, bases universales o nucleótidos generalmente de emparejamiento incorrecto en el caso que se utilice oligonucleótido modificado como un cebador. En el caso en que se utilice el oligonucleótido modificado como un bloqueador, las citosinas putativamente capaces de ser metiladas permanecen siendo citosinas en donde se debe reprimir la amplificación del ADN metilado, o dichas citosinas se reemplazan por timina en donde la amplificación del ADN no metilado se debe represar. En el caso que se utilice el oligonucleótido modificado como una sonda, las citosinas putativamente son capaces de ser citosinas que permanecen metiladas en donde la amplificación del ADN no metilado se debe detectar, o dichas citosinas se reemplazan por timidina en donde se debe detectar la amplificación del ADN no metilado.

20 Se puede analizar el ADN genómico que consiste esencialmente de la SEQ ID NO: 89, o más preferiblemente de la SEQ ID NO: 90. Por esto, se utilizan uno, dos, tres, cuatro o más, preferiblemente dos o cuatro oligonucleótidos que se seleccionan del grupo que consiste de las secuencias que consisten esencialmente de la SEQ ID NO: 1, 2, 5, 6, 12-22, 43-48, 62-72 como cebadores.

35 Se prefiere particularmente que se utilizan como bloqueadores uno, dos, tres o más, preferiblemente uno o dos oligonucleótidos seleccionados del grupo que consiste de las secuencias que consisten esencialmente de la SEQ ID NO: 3, 9, 7, 23-30, 49-57, 73-76, 91. Se prefiere particularmente que se utilizan como sondas uno, dos, tres, cuatro o más, preferiblemente uno, dos, o cuatro oligonucleótidos seleccionados del grupo que consiste de las secuencias que consisten esencialmente de la SEQ ID NO: 4, 8, 31-42, 58-61, 77-84.

El gen septina 9 que se puede analizar por medio de oligonucleótidos que hibridan bajo condiciones exigentes, son idénticos o complementarios a la SEQ ID NO: 89, o más preferiblemente la SEQ ID NO: 90, así como también a las

5 secuencias variantes que se presentan en forma natural de la SEQ ID NO: 89, o más preferiblemente la SEQ ID NO: 90. Los oligonucleótidos que se van a utilizar como cebadores tienen una longitud en el rango de 12-32 nucleótidos, preferiblemente 16-18 nucleótidos. Los oligonucleótidos que se van a utilizar como bloqueadores tienen una longitud en el rango de 20-45 nucleótidos, preferiblemente 25-37 nucleótidos. Los oligonucleótidos que se van a utilizar como sondas tienen una longitud en el rango de 10-30 nucleótidos, preferiblemente 14-25.

Utilidad del método reivindicado y los métodos descritos

El método reivindicado y los métodos descritos tienen en particular utilidad diagnóstica para trastornos proliferativos celulares, en particular para la detección o diagnóstico de carcinoma de colon o carcinoma hepático.

10 La presente invención permite el diagnóstico de eventos que es desventajoso para pacientes o individuos en los que los parámetros epigenéticos importantes dentro del gen septina 9 se utilizan como marcadores. Dichos parámetros se pueden comparar con otro grupo de parámetros epigenéticos, las diferencias sirven como la base para un diagnóstico de eventos que son desventajosos para pacientes o individuos.

15 Más específicamente la presente invención permite la detección de poblaciones en riesgo para la detección temprana de cánceres, más preferiblemente carcinomas colorrectales y carcinomas hepáticos. Los trastornos proliferativos celulares neoplásicos, más particularmente carcinomas, presentan un gen Septina 9 metilado, cuando se oponen a tejidos normales que no lo hacen.

20 Específicamente, la presente invención proporciona ensayos de diagnóstico de cáncer con base en la medición de metilación diferencial de dinucleótidos CpG del gen septina 9 (SEQ ID NO: 85; en particular SEQ ID NO: 86, 87 (nucleótido 9295902 a nucleótido 9295840 del Número de Acceso GenBank NT_010641.15) y SEQ ID NO: 88 (nucleótido 9295830 a nucleótido 9295894 del Número de Acceso GenBank NT_010641.15). Normalmente, Esto implica (a) obtener una muestra de un sujeto; (b) realizar una de las realizaciones del método descrito aquí para determinar la metilación del gen septina 9, preferiblemente de la secuencia de la SEQ ID NO: 85, y más preferiblemente de la SEQ ID NO: 86, 87 y/o 88 derivado de la muestra, con relación a una muestra de control, o un estándar conocido; y (c) hacer un diagnóstico con base en por lo menos partes de este.

25 El método de la invención es útil para evaluar la metilación del gen septina 9 es decir para la detección de la presencia de metilación de los dinucleótidos CpG cubiertos por los ensayos de amplificación como se define por las realizaciones descritas aquí.

30 Se considera que dichos dinucleótidos CpG se metilan, en donde se detecta un amplificado por medios adecuados por ejemplo pero no limitado por medio de una o más de las sondas o combinaciones de sondas descritas aquí. Se considera que dichos dinucleótidos CpG no se metilan, cuando no se detecta amplificado por medios adecuados por ejemplo pero no limitado por medio de una o más de las sondas o combinaciones de sondas descritas aquí.

Las realizaciones descritas del método también son en particular útiles para el diagnóstico de trastornos proliferativos celulares, más preferiblemente carcinoma colorrectal y carcinoma hepático.

35 Los métodos descritos aquí se utilizan preferiblemente y son aplicables para diagnóstico, clasificación y/o pronóstico de eventos adversos para pacientes o individuos, por lo que estos eventos adversos pertenecen a por lo menos una de las siguientes categorías:

40 interacciones indeseadas del fármaco; enfermedades de cáncer; trastornos proliferativos celulares; carcinoma de colon; carcinoma hepático; disfunción del SNC; daño o enfermedad; síntomas de agresividad o alteraciones del comportamiento; consecuencias clínicas, psicológicas y sociales de daño cerebral; trastornos de la personalidad y alteraciones psicóticas; demencia y/o síndromes asociados; enfermedad cardiovascular, disfunción o daño; disfunción, daño o enfermedad del tubo gastrointestinal; disfunción, daño o enfermedad del sistema respiratorio; lesión, inflamación, infección, inmunidad y/o convalecencia; disfunción, daño o enfermedad del cuerpo como una anomalía en el proceso de desarrollo; disfunción, daño o enfermedad de la piel, de los músculos, del tejido conectivo o de los huesos; disfunción endocrino y metabólico, daño o enfermedad; cefaleas o disfunción sexual.

45 Los métodos descritos aquí se utilizan preferiblemente y son aplicables para distinguir tipos de células y/o tejidos y/o para investigar la diferenciación celular.

Los métodos descritos aquí se utilizan preferiblemente y son aplicables para el descubrimiento de un marcador de metilación, en donde el marcador es indicador de eventos adversos para pacientes o individuos, por lo que estos eventos adversos pertenecen a por lo menos una de las siguientes categorías:

50 interacciones indeseadas del fármaco; enfermedades de cáncer; trastornos proliferativos celulares; carcinoma de colon; carcinoma hepático; disfunción del SNC; daño o enfermedad; síntomas de agresividad o alteraciones del

comportamiento; consecuencias clínicas, psicológicas y sociales de daño cerebral; trastornos de la personalidad y alteraciones psicóticas; demencia y/o síndromes asociados; enfermedad cardiovascular, disfunción o daño; disfunción, daño o enfermedad del tubo gastrointestinal; disfunción, daño o enfermedad del sistema respiratorio; lesión, inflamación, infección, inmunidad y/o convalecencia; disfunción, daño o enfermedad del cuerpo como una anomalía en el proceso de desarrollo; disfunción, daño o enfermedad de la piel, de los músculos, del tejido conectivo o de los huesos; disfunción endocrino y metabólico, daño o enfermedad; cefaleas o disfunción sexual.

Definiciones

En aspectos particulares, el término “esencialmente que consiste” o el término “que consiste esencialmente” se refiere a, pero no se limita a, las secuencias de ADN que son idénticas, o comparten una homología en el rango de 75-100 %. El término se utiliza para reflejar la varianza que se presenta en forma natural del genoma de sujetos individuales. Alternativamente, dichos términos como se utiliza aquí para describir una secuencia de ácidos nucleicos mediante red a una SEQ ID NO: debe abarcar una secuencia que difiere de dicha SEQ ID NO: en no más de 1, 2,3,4, 5, 6, 7, 8, 9, 10, 11, 12, 13, 14 o 15 bases.

En aspectos particulares, el término “oligonucleótido” se refiere a, pero no se limita a, oligonucleótidos de ADN, oligonucleótidos de ARN, oligómeros de PNA o derivados de los mismos tales como por ejemplo pero no limitado a oligonucleótidos LNA.

En aspectos particulares, el término “estado de metilación” se refiere a, pero no se limita a, la presencia o ausencia de metilación de un nucleótido. Por lo tanto dicho nucleótido tiene la capacidad de ser metilado o ser no metilado. Se puede cuantificar un estado de metilación, en donde a se considera sobre más de un ácido nucleico.

En aspectos particulares, el término “patrón de metilación” se refiere a, pero no se limita a, la presencia o ausencia de metilación de dos o más dinucleótidos CpG. Dicho uno o más nucleótidos están comprendidos en una única molécula de ácido nucleico. Tienen la capacidad de ser metilados o no metilados. Se puede cuantificar un patrón de metilación, cuando se considera sobre más de un ácido nucleico. A este respecto, dos o más dinucleótidos CpG se consideran que son co-metilados cuando dichos dos o más dinucleótidos CpG muestran el mismo comportamiento de metilación.

En aspectos particulares, el término “análisis de metilación” se refiere a, pero no se limita a, el análisis de la presencia o ausencia de uno o más patrones de metilación. De forma sinónima, se refiere a, pero no se limita a, el análisis de la presencia o ausencia de metilación de una o más citosinas.

En aspectos particulares, el término “dinucleótido CpG” se refiere a, pero no se limita a, la secuencia 5'-CG-3' en un ácido nucleico, en particular en un ADN, y más particularmente en un ADN genómico.

En aspectos particulares, el término “cebador” se refiere a, pero no se limita a, un oligonucleótido que es capaz de ser alargado.

En aspectos particulares, el término “bloqueador” se refiere a, pero no se limita a, un oligonucleótido que es capaz de evitar o por lo menos reducir la probabilidad de una reacción de alargamiento o amplificación de cebador.

En aspectos particulares, el término “sonda” se refiere a, pero no se limita a, ya sea un oligonucleótido adecuado para la detección de un cebador alargado o de un amplificado o a un oligonucleótido de la secuencia complementaria inversa de dicho oligonucleótido adecuado.

En aspectos particulares, el término “combinación de sonda” se refiere a, pero no se limita a, un conjunto de dos oligonucleótidos en el que dichos dos oligonucleótidos juntos son adecuados para detección de un cebador alargado o de un amplificado. El término también se refiere pero no se limita al conjunto de oligonucleótidos que son inversos complementarios a la secuencia de dicho conjunto adecuado de oligonucleótidos.

En aspectos particulares, el término “ensayo combinado” se refiere a, pero no se limita a, una reacción de amplificación de compuesto que comprende o consiste de dos reacciones de amplificación individuales. Preferiblemente, una de dichas reacciones de amplificación individuales se localiza en la cadena sentido, mientras que la otra se localiza en la cadena antisentido. Sin embargo, ambas de dichas reacciones de amplificación individuales se refieren al mismo sitio genómico.

EJEMPLOS

Ejemplo 1: Comparación de los gránulos y los Kits para purificación de ADN genómico a partir de muestras remotas (por ejemplo, muestras de plasma).

5

Las muestras de plasma de sangre se adquirieron de CLINIQA (San Marcos, CA, EE.UU., Número de Artículo 1503). Se extrajo el ADN a partir de 5 ml de plasma por medio de Kits y gránulos enumerados en la Tabla 1 siguiendo los protocolos suministrados por los proveedores. Cuando se diseñaron los protocolos para volúmenes más bajos, se realizaron extracciones paralelas, la muestra combinada y el rendimiento se determinó para 5 ml. Se determinaron los cálculos de rendimiento mediante comparación con los gránulos de Kit MagNa Pure LC Total Nucleic Acid, de gran volumen (Número de Artículo 03264793001) como estándar. La Tabla 1 muestra el rendimiento (= recuperación en %) de ADN genómico según se determina mediante el ensayo de cuantificación CFF1. Se realizó el ensayo CFF1 como se describió en el documento WO 2007/039101. Los cálculos de rendimiento se derivaron de múltiples experimentos.

Tabla 1 resumen de gránulos y Kits probados para la purificación de ADN genómico a partir de muestras de plasma.

Perla/ Kit	Fabricante	Rendimiento (= recuperación en %)
Gránulos de Kit de Ácido Nucleico Total LC Puro MagNa, de gran volumen (Número de Artículo 03264793001)	Roche Diagnostics Corporation	100%
Zymobeads 1 ml (Número de Artículo ZY D3004-3-1)	Zymo Research Corporation	86
Gránulos de Kit de Aislamiento de ADN MagaZorb, 200 preparaciones (Número de Artículo 100164-976)	Cortex Biochem Inc.	59%
Gránulos SIMAG/NMP-silanol (sin Número de Artículo está disponible)	Chemicell GMBH	0%
Gránulos de SIMAG/FK-silanol (Número de Artículo 1101-1 o 1101-5)	Chemicell GMBH	100%
Gránulos de SIMAG/ NK-silanol (sin Número de Artículo está disponible)	Chemicell GMBH	74%
Gránulos de SIMAG/ -silanol (sin Número de Artículo está disponible) Chemicell	GmbH29%	
Gránulos de SIMAG/TH-silanol (sin Número de Artículo disponible)	Chemicell GmbH	29%
Gránulos de Kit Genómico MagneSil®, Sistema de Volumen Grande (Número de Artículo A4080)	Promega Corporation	32%
Gránulos de Kit de gADN GeneCatcher de 3-10 ml de sangre (Número de Artículo CS21110)	Invitrogen Corporation	19%
Gránulos de Kit ADN/ARN Viral chemagic especial (Número de Artículo 1002)	Chemagen Biopolymer Technologie Aktiengesellschaft	179%
Gránulos magnéticas Lumigen (Número de Artículo no disponible)	Lumigen Inc.	0%

10

Ejemplo 2: Comparación de gránulos y Kits para la purificación de ADN tratado con bisulfito

Se purificaron 100 ng de una mezcla 1: 1 de ADN de alto peso molecular y de bajo peso molecular de ADN tratado con bisulfito contiene sulfonato de uracilo y no uracilo con diferentes gránulos de acuerdo con las recomendaciones de los fabricantes. La Tabla 2 muestra el rendimiento (= recuperación) de ADN tratado con bisulfito según se determinó mediante ensayo de cuantificación CFF1. Se realizó el ensayo CFF1 como se describe en el documento WO 2007/039101.

15

Tabla 2 resumen de gránulos y Kits probados para purificación de ADN tratado con bisulfito

Perla/ Kit	Fabricante	Rendimiento recuperación en %) (=
Gránulos de Kit ChargeSwitch Total RNA Cell (Número de Artículo CS14010)	Invitrogen Life Technologies	0
Gránulos de Kit de Purificación de ADN CST Forensic (Número de Artículo 11200 C)	DNA Research Innovations Ltd.	0
ZymoBeads™ (Número de Artículo D3004-3-4)	Zymo Research Corporation	35-50
Gránulos SiMAG/FK-Silanol (Número de Artículo 1101-1 o 1101-5)	Chemicell GmbH	65-75
Gránulos de Kit de ADN/ARN Viral chemagic Número de Artículo 1002)	Chemagen Biopolymer Technologie Aktiengesellschaft	80-90
Kit de Aislamiento de Ácido Nucleico Compacto Puro MagNA (I) Volumen Grande (Número de Artículo 3310515)	Roche Diagnostics Corporation	10-15

Ejemplo 3: Aislamiento de ADN genómico a partir de muestras remotas (de sangre).

A) Aislamiento por medio de gránulos de Kit de ARN/ADN Viral Chemagic (Chemagen Biopolymer-Technologie AG, Alemania, Número de Artículo 1002) - Protocolo I

5 Se recogió plasma como se describe en el documento WO 2006/113770. En resumen, se extrajo sangre en tubos de plasma EDTA de 10 ml utilizando el sistema Vacutainer. Los tubos se centrifugaron a 1500 x g durante 10 min, el sobrenadante se transfirió a un nuevo tubo y se centrifugó una segunda vez a 1500 xg durante 10 min. El sobrenadante es el plasma para su uso adicional (4-5 ml).

10 Para el aislamiento de ADN, se agregaron 5 ml de regulador de lisis, 7 µl de poli-A ARN y 30 µl de solución de proteinasa K a las muestras de plasma (todos ajustó a 5 ml). Las muestras se incubaron a 56° C durante 5 min. Después de eso, se agregaron 100 µl de gránulos magnéticas (Número de Artículo 1002) y 15 ml de Regulador de Unión 2. Con el fin de mantener los gránulos en suspensión mediante agitación gentil, las muestras se colocaron en un mezclador rotativo a temperatura ambiente durante aproximadamente 10 min para permitir la unión del ADN a los gránulos. Los gránulos magnéticas se separaron al colocar el tubo de reacción en un soporte magnético y descartar la mezcla de regulador de plasma/lisis. Los gránulos se lavaron tres veces con 3 ml de Regulador de Lavado 3, antes se resuspendieron en 1 ml de Regulador de Lavado 4, y se transfirieron a tubos de microcentrífuga de 1.7 ml. los gránulos se separaron en un soporte magnético, el regulador de lavado se vertió y se secaron los gránulos a 56° C. Después de adición de 100 µl de Regulador de Elución 5, se incubó la suspensión durante 15 minutos sobre el termomezclador a 65° C. Después de separación de los gránulos, se recuperó el regulador de elución que contenía ADN genómico. (Todos los reactivos fueron suministrados por el Kit de ARN/ADN Viral Chemagic).

B) Aislamiento por medio de gránulos de SIMAG/FK-silanol (Chemicell GmbH, Alemania, Número de Artículo 1101-1 o 1101-5)

Se prepararon las siguientes soluciones y reguladores:

Regulador de lisis:

25 120 g de isotiocianato de guanidinio; 100 ml 0.1 mol/l de Tris-HCl pH 6.4 (posteriormente); 22 ml 0.2 mol/l de EDTA pH 8.0; 2,6 g de Triton X-100. (La disolución de Isotiocianato de Guanidinio se facilitó al calentar en un baño de agua a 60° C con agitación continua.)

Regulador de Lavado 1:

120 g de isotiocianato de guanidinio; 100 ml 0.1 mol/l de Tris-HCl pH 6.4; se diluye con etanol al 100% a etanol al 25%.

30 Regulador de Lavado 2:

EtOH al 50%

Solución de proteinasa K (según lo dispuesto por el Kit de ARN/ADN Viral Chemagic (Chemagen Biopolymer-Technologie AG, Alemania, Número de Artículo 1002)

5 Se recolectó plasma como se describe en el documento WO 2006/113770. En resumen, se extrajo sangre en tubos de plasma EDTA de 10 ml utilizando el sistema Vacutainer. Los tubos se centrifugaron a 1500 x g durante 10 min, el sobrenadante se transfirió a un nuevo tubo y se centrifugó una segunda vez a 1500 xg durante 10 min. El sobrenadante es el plasma para su uso adicional (4-5 ml).

10 Para el aislamiento de ADN, 5 ml de Regulador de Lisis, 100 µl de solución de Proteinasa K y 100 µl de gránulos de SIMAG/FK-silanol (Chemicell GmbH, Alemania; Número de Artículo 1101-1 o 1101-5) se agregaron a la muestras de plasma (todas se ajustaron a 5 ml). Las muestras se invirtieron gentilmente 5 veces para mezclar y luego se colocan en una plataforma de agitación (100 rpm) a 56° C durante 20 min. Después de separación de los gránulos magnéticas de SIMAG/FK-silanol por medio de un soporte magnético, los gránulos se lavaron con 1 ml de Regulador de Lavado 1. Durante esta etapa, los gránulos se transfirieron a tubos de microcentrífuga de 1.5 ml. Posteriormente, los gránulos se lavaron dos veces con 1 ml de Regulador de Lavado 2. Finalmente, los gránulos se secaron al aire a 56° C durante 5 min, antes de que se volvieran a suspender en 50 µl de Regulador de Elución, en este caso agua. La mezcla se incubó en un Termomezcaldor (1000 rpm) a 65° C durante 15 min. Después de separación de los gránulos, se obtiene el ADN en Regulador de Elución. La etapa de elución se repite una segunda vez. Luego se combinan los dos volúmenes de elución de ADN genómico recuperado.

20 Ejemplo 4: Tratamiento con bisulfito del ADN genómico aislado a partir de muestras remotas (plasma) por medio de gránulos de Kit de ARN/ADN Viral Chemagic o por medio de los gránulos de SIMAG/FK-silanol.

Se sometió el ADN genómico a bisulfito tratado, dicho ADN se aisló de muestras remotas (sangre) por medio de gránulos de Kit de ADN/ARN Viral Chemagic o por medio de gránulos de SIMAG/FK-silanol como se describe en el Ejemplo 2.

Para el tratamiento de bisulfito eran necesarios los siguientes Kits, materiales y productos químicos:

- 25
- termociclador, (Eppendorf Masterciclador)
 - Micro-centrífuga Eppendorf 5417C (o cualquier centrífuga capaz de hasta 14.000 xg)
 - soportes de natación para baño de agua, tamaños para tubos de 2 ml y tubos Falcon de 15 ml
 - pipetas para volúmenes de 100 µl y 1000 µl
 - puntas de pipeta (100 µl, 1000 µl)

30

 - tubos safelock de 0.5 ml (Eppendorf)
 - tubos de 15 ml y 50 ml (Falcon)
 - bisulfito de sodio ($\text{Na}_2\text{S}_2\text{O}_5$, peso molecular 190.1 g/mol, Número de Artículo Merck 1.06528.0500)
 - sulfito de sodio, anhidro (Na_2SO_3 , peso molecular 126.04 g/mol, Número de Artículo Fluka 71988)
 - ddH₂O (grado biología molecular, Número de Artículo Fluka 95284)

35

 - dietilenglicoldimetiléter (DME, Número de Artículo Merck 8.02934.0250)
 - ácido 6-hidroxi-2,5,7,8-tetrametilcroman-2-carboxílico (peso molecular 250.29 g/mol, Número de Artículo Aldrich 23,881-3)

Se prepararon las siguientes soluciones. Fueron suficientes para 25 reacciones.

- 40
- Solución de bisulfito: se disolvieron 4.71 g de disulfito de sodio y 1.13 g de sulfito de sodio al agregar 10 ml de ddH₂O. Esto resultó en una solución que tenía 4.9 mol/l de sulfito de hidrógeno (el reactivo activo para el tratamiento de bisulfito). Si hay necesidad, el pH de la solución se ajustó por medio de 0.2 mol/l de NaOH que está en el rango entre 5.4 y 5.5. Con el fin de disolver las sales completamente, la mezcla puede haber sido mezclada vigorosamente y se calentó a 50° C.

▪ solución de secuestrante de DME-radical: 188 mg de ácido 6-hidroxi-2,5,7,8-tetrametil-cromano-2-carboxílico se disolvieron en 1.5 ml de DME. Con el fin de asegurar que no permanezca ninguna partícula sin disolver, la mezcla se mezcló vigorosamente.

Observaciones generales:

- 5
- Este procedimiento se aplicó a una muestra única o a muchas muestras en paralelo.
 - Se obtuvieron los mejores resultados en donde se prepararon solución de bisulfito y solución de secuestrante de DME-radical recientemente

Procedimiento:

10 Se agregaron 190 µl de dicha solución de bisulfito preparado y 30 µl de dicha solución preparada de secuestrante de DME-radical al ADN genómico que se va a tratar con bisulfito (ADN del ejemplo 2 proporcionado en 100 µl de regulador de elución). El volumen total de la mezcla de reacción fue de 320 µl. Después de agitación vigorosa, las mezclas de reacción se sometieron al siguiente perfil de temperaturas en un masterciclador Eppendorf: 5 min 99° C, 25 min 50° C, 5 min 99° C, 1 h 25 min 50° C, 5 min 99° C, 4 h 55 min 50° C (la temperatura de la tapa del ciclador se estableció a 115° C; el tamaño del tubo fue de 0.5 ml; volumen seleccionado en el software de masterciclador: 100 µl)

15 Ejemplo 5: purificación de ADN tratado con bisulfito del Ejemplo 4 (A) Purificación por medio de gránulos de Kit de ARN/ADN Viral Chemagic (Chemagen Biopoly-mer-Technologie AG, Alemania, Número de Artículo 1002)

20 Las mezclas de reacción tratadas (cada una de 320 µl) del Ejemplo 4 se transfirieron a tubos Safelock de 2 ml. Posteriormente, se agregaron 1 µl de una solución de Regulador de Unión de poli-A 500 ng/µl, 1.5 ml de Regulador de Unión y 10 µl de gránulos de Kit de ARN/ADN Viral Chemagic (Número de Artículo 1002). Las mezclas se incubaron durante 60 min a temperatura ambiente en agitación. los gránulos que son magnéticas se separaron al colocar el tubo en una gradilla magnética. Se eliminó el sobrenadante. El líquido residual se eliminó mediante una breve centrifugación y posteriormente se colocó el tubo de nuevo en la gradilla magnética. los gránulos se lavaron con 300 µl de Regulador de Lavado 2, y posteriormente con 300 µl de etanol al 70%. Después de una breve centrifugación y colocación del tubo en la gradilla magnética, se eliminó etanol al 70% residual. los gránulos se secaron mediante al incubar los tubos abiertos a 55° C durante 10 minutos. Con el fin de eluir el ADN de los gránulos, se agregaron a 50 µl de 10 mmol/l de Tris pH 7.2. La mezcla se incubó durante 15 min a 55° C en agitación (1000 rpm). Después de breve centrifugación, los gránulos se separaron mediante al colocar los tubos en una gradilla magnética. Se eliminó el sobrenadante que contenía el ADN tratado con bisulfito purificado. Dicho ADN se analizó posteriormente por ejemplo, por no limitado a los métodos descritos en el Ejemplo 6.

30 (B) Purificación por medio de gránulos de SIMAG/FK-silanol (Chemicell GmbH, Alemania, Número de Artículo 1101-1 o 1101-5).

Se prepararon los siguientes reguladores y soluciones:

- BL-Regulador: 120 g de tiocianato de guanidinio (peso molecular 118.2 g/mol) se disolvieron en 100 ml de 0.1 mol/l de Tris-HCl pH 6.4.
- 35 - Suspensión de gránulos: el regulador en donde se entregaron los gránulos de SIMAG/FK-silanol (Chemicell GmbH (Número de Artículo 1101-1 o 1101-5) se intercambié por BL- Regulador por medio de un separador magnético Una parte de los gránulos de SIMAG/FKSilanol en BL-Regulador se diluyó por 11 partes de etanol
- Regulador de Lavado 1: una parte del BL- Regulador se diluyó en cuatro partes de ddH₂O y 30 ml del BL-Regulador diluido se mezclaron con 70 ml de etanol lo que resultó en el Regulador de Lavado 1.
- 40 - Regulador de Lavado 2: etanol al 80%
- solución de poli A: poli A se disolvió en agua lo que resultó en una concentración final de 5 ng/µl de poli A

45 Las mezclas de reacción tratadas (cada una de 320 µl) del Ejemplo 4 se transfirieron a tubos Safelock de 2 ml. Cada mezcla se trató como se describe en lo siguiente. A la mezcla de reacción, se agregaron 600 µl de BL-Regulador y 600 µl de suspensión de gránulos. Después de la agitación, se incubó la mezcla durante 60 min a temperatura ambiente luego de agitación gentil adicional. los gránulos se separaron al colocar el tubo en un separador magnético. Después de la eliminación del sobrenadante, los gránulos se lavaron mediante adición de 1 ml de Regulador de Lavado 1, los gránulos se separaron de nuevo por medio del separador magnético y se eliminó el sobrenadante. Después de eso los gránulos se lavaron por medio de 500 µl de Regulador de Lavado 2, agitación breve vigorosamente, separación de

5 gránulos por medio de un separador magnético y eliminación del sobrenadante. Se repitió dicha etapa de lavado con 500 µl de Regulador de Lavado 2. Finalmente los gránulos se secaron al incubo en el tubo abierto durante 5 min a 56° C. Para elución, se agregaron 75 µl de solución de poli A a los gránulos, la mezcla se agitó vigorosamente poco, y la mezcla se incubó durante 15 min a 70° C. Después de separación de los gránulos por medio de un separador magnético, el sobrenadante que contenía el ADN tratado con bisulfito purificado se transfirió a un nuevo tubo. Dicho ADN se analizó posteriormente por ejemplo, por no limitado a los métodos descritos en el Ejemplo 6.

Ejemplo 6: Detección de secuencias metiladas del gen Septina 9 mediante amplificación de secuencias convertidas por bisulfito de cadena directa e inversa del ADN genómico original en un PCR dúplex

10 la fragmentación del ADN es muchas veces limitante de la sensibilidad del análisis de metilación de las muestras, en particular en donde el ADN está ya muy fragmentado en la muestra original. Ejemplos de dichas muestras corporales son muestras de fluidos como sangre, heces, orina, lavado branquial o muestras histológicas como muestras fijadas en formalina. Durante el tratamiento con bisulfito, el ADN se fragmenta aún más lo que resulta en fragmentos muy cortos en promedio. Este ejemplo demuestra que fragmentos muy pequeños (hasta de longitud de 65 nucleótidos) son suficientes para análisis de metilación del gen de septina 9 por medio de una PCR dúplex o PCR sencillo.

15 En este ejemplo el bisulfito metilado convertido a ADN del gen septina 9 se amplificó utilizando un PCR dúplex HeavyMethyl y una PCR HeavyMethyl de referencia individual. El ejemplo demuestra la ventaja del PCR dúplex sobre el PCR sencillo por el mayor índice de detección mostrado de muestras de bajo número de copias. Esto se puede explicar por el número teórico de plantilla de ADN dos veces mayor que es capaz de ser amplificada, debido a que el PCR dúplex utiliza ambas cadenas convertidas en bisulfito del ADN original como plantilla, mientras que el PCR sencillo se basa únicamente en cualquiera cadena de bisulfito 1 o bisulfito 2 del gen Septina 9. Para lograr esto, se llevaron a cabo las siguientes etapas:

25 Se ajustó el ADN genómico humano a partir de linfocitos de sangre periférica (Roche Diagnostics, Penzberg, Alemania) a una concentración de 0.2 µg/µl. Esta solución se utilizó para diluir ADN humano metilado universal (ADN Metilado Universal de GpGenome™, Chemicon International, Temecula EE.UU.) a concentraciones finales de 0.75 µg/µl y 0,375 µg/µl. Se trataron con bisulfito 100 µl de cada dilución y la solución sin ADN metilado en 30 réplicas. En todas se prepararon 90 muestras diferentes. Para esto 100 µl de cada muestra se aplicó a la reacción de conversión de bisulfito como se describió anteriormente (véase, por ejemplo WO2005038051). Cada muestra se eluyó en 50 µl de agua. Después de desalación y purificación el éxito de conversión de bisulfito fue confirmado por un PCR de referencia específica de ADN de bisulfito como se describió previamente (EP05075404). Después de eso se utilizaron 10 µl de cada muestra como plantilla en el PCR dúplex, y en el PCR sencillo. Las mezclas de reacción para el PCR dúplex HeavyMethyl contenían:

- 10 µl de ADN de plantilla
- 12.5 µl Kit Quantitect Multiplex NoROX PCR (Qiagen, Hilden Alemania)
- 0.3 µmol/l de cebador directo PCR1 (SEQ ID NO: 1, Biomers.net GmbH Alemania)
- 35 0.9 µmol/l de cebador inversa PCR1 (SEQ ID NO: 21, Biomers.net GmbH Alemania)
- 1.0 µmol/l de bloqueador de oligonucleótido PCR1 (SEQ ID NO: 3, Biomers.net GmbH Alemania)
- 0.1 µmol/l de sonda PCR1 (SEQ ID NO : 4, Biomers.net GmbH Alemania)
- 0.3 µmol/l de cebador directo PCR2 (SEQ ID NO: 5, Biomers.net GmbH Alemania)
- 0.3 µmol/l de cebador inverso PCR2 (SEQ ID NO: 6, Biomers.net GmbH Alemania)
- 40 1.0 µmol/l de bloqueador de oligonucleótido PCR2 (SEQ ID NO: 7, Biomers.net GmbH Alemania)
- 0.1 µmol/l de sonda PCR2 (SEQ ID NO: 8, Biomers.net GmbH Alemania)

El ensayo se realizó en el LightCiclor LC480 (Roche Diagnostics Penzberg Alemania) de acuerdo con el siguiente perfil de temperatura-tiempo:

activación:	30 min a 95° C
50 ciclos:	10 s a 95° C

ES 2 570 828 T3

30 s a 56°C

Las muestras también se analizaron mediante PCR HeavyMethyl de Septina 9 sencillo, que se refiere al PCR2 del PCR dúplex. Las mezclas de reacción para PCR sencillo contenían:

- 10 µl de ADN plantilla
- 5 12.5 µl de Quantitect Multiplex NoROX (Qiagen, Hilden Alemania)
- 0.3 µmol/l de cebador directo PCR2 (SEQ ID NO: 5, Biomers.net GmbH Alemania)
- 0.3 µmol/l de cebador inverso PCR2 (SEQ ID NO: 6, Biomers.net GmbH Alemania)
- 1.0 µmol/l de bloqueador de oligonucleótido PCR2 (SEQ ID NO: 7, Biomers.net GmbH Alemania)
- 0.1 µmol/l de sonda PCR2 (SEQ ID NO: 9, Biomers.net GmbH Alemania)
- 10 El ensayo se realizó en el LightCiclor LC480 (Roche Diagnostics Penzberg Alemania) de acuerdo con el siguiente perfil de temperatura-tiempo:

activación: 30 min a 95° C

50 ciclos: 10 s a 95° C

30 s a 56°C

- 15 Los cebadores de PCR1 (SEQ ID NO: 1 y SEQ ID NO: 21) amplifican un fragmento de 63 pb del gen Septina 9 (SEQ ID NO: 10. nucleótido 9295902 a nucleótido 9295840 de GenBank Número de Acceso NT_010641.15). Los cebadores de PCR2 (SEQ ID NO: 5 y SEQ ID NO: 6) amplifican un fragmento de 65 pb del gen Septina 9 (SEQ ID NO: 11. nucleótido 9295830 a nucleótido 9295894 de GenBank Número de Acceso NT_010641.15). La detección se llevó a cabo durante la fase de hibridación a 56° C. En la reacción de PCR1 dúplex se detectó específicamente un canal de 533 nm (ajuste de filtro 483-533), mientras que el PCR2 se detectó específicamente en el canal de 610 nm (ajuste de filtro 558-610). El PCR sencillo se detectó en el canal de 533 nm (ajuste de filtro 483 a 533), debido a que el colorante de la sonda se cambió de TexasRed a FAM para la reacción sencilla (SEQ ID NO: 8). Los puntos de cruce (CP) se calcularon de acuerdo con el método de "segunda derivada máxima" por medio del software LightCiclor 480.

- 25 Las curvas de amplificación representativas de 6 muestras con PCR1 del PCR dúplex HeavyMethyl se muestran en la Figura 1. Las curvas de amplificación de PCR2 de la reacción dúplex se muestran en la Figura 2. La Figura 3 muestra una vez más las mismas 6 muestras representativas amplificadas con PCR sencillo HeavyMethyl. Como se muestra en la Figuras se detectaron muestras A1.2 y A1.3 en los tres casos. La muestra A1.1 no fue detectada por PCR1 sino por PCR2, mientras que la muestra E3.4 fue positiva en PCR2 y no en PCR1 de la reacción dúplex. Todas las 4 de las 6 muestras de ejemplo se detectaron por PCR dúplex. En contraste con aquellas del PCR sencillo HeavyMethyl sólo se detectaron 3 de estas 6 muestras (A1.1, A1.2, y A1.3).

- 30 El índice de detección se calculó para las tres diluciones, que se procesaron 30 veces cada una. Cada curva única, llamada por el análisis automatizado del software LightCiclor 480, se contó como positiva. La tabla 4 recolecta todos los puntos de cruce (CP) del experimento. Los índices de detección resultantes se ilustran en la Figura 4. No se detectaron muestras sin ADN metilado por PCR simple, mientras que se obtuvo una curva de amplificación con PCR dúplex en el canal 533 nm (PCR1). Se detectaron las muestras que contenían 37,5 pg de ADN metilado (dilución 2) con índices del 67% (intervalo de confianza del 95% (CI95): 50% -80%) utilizando PCR sencillo y 70% (CI95: 53% - 83%) utilizando el PCR dúplex. Se detectaron las muestras que contenían 75 pg de ADN metilado con índices del 77% (CI95: 60% - 88%) utilizando PCR sencillo y 80% (CI95: 64% - 91%) utilizando el PCR dúplex. En PCR dúplex las muestras se contaron como positiva, si cualquiera del PCR1 (533 nm) o PCR2 (610 nm) muestra una curva de amplificación.

- 40 La característica del PCR dúplex HeavyMethyl PCR desarrollado se evaluó adicionalmente. Para eso una serie de dilución de ADN convertido a bisulfito metilado se preparó para evaluar las eficiencias de los diferentes PCR. La curva estándar de PCR1 y PCR2 del PCR dúplex se muestran en la Figura 5 y 6. Las eficiencias de PCR se determinaron a

1.838 para PCR1 y 1.810 para PCR2 respectivamente. En la Figura 7 la curva estándar del PCR sencillo se muestra con una eficiencia de PCR de 1.903.

5 Una presentación esquemática de las dos secuencias amplificadas en el PCR dúplex HeavyMethyl se representan en la Figura 8. Ambos amplicones cubren los mismos CpG de la isla CpG Septina 9. Los oligonucleótidos bloqueadores abarcan más de 5 CpG, mientras que las sondas de detección se unen a sólo 3 CpG fuera de la región amplificada. Como se indica en la Figura 8, PCR1 y PCR2 comprenden cada uno un cebador que se extiende durante un CpG único (la Figura 8 muestra la Secuencia genómica tratada bisulfito, las áreas de hibridación de cebadores están impresas en negrilla). Para evitar una unión específica de metilación de los cebadores C-libres de PCR1 y PCR2, las secuencias de los cebadores contenían una modificación dSpacer, que actúa como un sitio a-básico estable en estas posiciones. Por lo tanto la amplificación específica de metilación sólo se acciona por la unión de los oligonucleótidos bloqueadores a los 10 5 CpG entre los sitios de unión del cebador.

15 En general, la sensibilidad clínica de un ensayo con base en la metilación del ADN, basado en la detección de cáncer derivado de ADN metilado en los fluidos corporales o de otras muestras remotas se limita debido al bajo número de copias de ADN específico a cáncer. El método de detección y diagnóstico de otras enfermedades de cáncer se podrá mejorar mediante la aplicación del concepto de detección de ambas cadenas convertidas a bisulfito del ADN objetivo original.

Tabla 3: Secuencias de oligonucleótidos descritas en el ejemplo.

SEQ ID NO: 1	5' -CCACCAaCCATCATaTC-3'
SEQ ID NO: 21	5' -GAAGTt-X-GAAATGATtttATttAGtT -3'
SEQ ID NO: 3	5' -CCATCATaTCAaACCCACAAaTCAACACACA -3'C3
SEQ ID NO: 4	5' -FAM -GAtCGCGGGGTtCGAtA -3'BHQ1
SEQ ID NO: 5	5' -AAATaATCCCATCCAaCTa -3'
SEQ ID NO: 6	5' - GAtt-X-GtTGttAttAGttATtATGT -3'
SEQ ID NO: 7	5' -GttATtATGTtGGAttttGtGGTAAAtGtGtAG -3'C3
SEQ ID NO: 8	5' -TexasRed -TTaACCGCGaaaTCCGAC -3'BHQ2
SEQ ID NO: 8	5' -FAM -TTaACCGCGaaaTCCGAC -3'BHQ1
SEQ ID NO: 10	GAAGTtXGAAATGATtttATttAGtTGC GCGTT-GAtCGCGGGGTtCGAtATGATGGTtGGTGG
SEQ ID NO: 11	GAttXGtTGttAttAGttATtATGTCCGAtttCGCGGTtAACCGGtAG-tGGATGGGAtATTT

Fluo = marcador de fluoresceína, Red640 = marcador fluoróforo LightCiclor para el canal F2, PH = 3'OH-fosforilación, FAM = marcador de carboxifluoresceína, TexasRed = marcador fluoróforo TexasRed, BHQ1 = BlackHoleQuencher 1, X = sitio a -básico por modificación de tetrahidrofurano (también conocido como dSpacer). "t" escrita en minúscula apunta a citosinas convertidas por tratamiento con bisulfito, respectivamente "a" en minúscula apunta a bases de adenosina complementarias en la cadena sintetizada de complemento inverso.

20 Tabla 4: Valores CP obtenidos de 3 diluciones diferentes, que se prepararon en 30 réplicas cada una. La dilución 1 contenía 20 ng de ADN de PBL y 75 pg de ADN metilado, la dilución 2 contenía 20 ng de ADN de PBL y 37.5 pg de ADN metilado. A la dilución, se agregaron 3 ADN no metilado. Después de tratamiento con bisulfito cada muestra se eluyó en 50 µl de agua se aplicó abd 10 µl (1/5th) al PCR dúplex y sencillo HeavyMethyl de Septina 9 única y dúplex PCR. Septin 9 –

	Septina 9 - PCR Sencillo	Septina 9 - PCR Dúplex
--	--------------------------	------------------------

ES 2 570 828 T3

No. de Muestra	Canal CP FAM	Canal CP FAM	Canal CP FAM	Canal CP FAM	Canal CP TEX	Canal CP FAM	Canal CP TEX	Canal CP FAM	Canal CP TEX
	Dilución 1	Dilución 2	Dilución 3	Dilución 1		Dilución 2		Dilución 3	
1	39,3	38,91	/	/	39,59	45,44	/	/	/
2	40,27	39,29	/	39,62	38,92	/	38,96	/	/
3	40,51	40,49	/	39,84	39,65	41,5	39,29	/	/
4	38,51	/	/	39,27	38,25	/	/	/	/
5	42,98	41	/	40,65	37,73	/	40,32	/	/
6	/	/	/	40,4	40,18	/	/	/	/
7	38,85	40,67	/	/	40,25	41,49	39,59	/	/
8	/	39,49	/	/	/	40,9	/	/	/
9	/	/	/	/	/	/	/	/	/
10	/	40,82	/	/	/	41,61	/ 38,34	/	/
11	39,91	42,11	/	41,43	40,18	47,37	41,6	/	/
12	41,91	40,21	/	47,22	43,9	44,43	42,33	/	/
13	/	/	/	42,73	39,76	43,89	/	/	/
14	41,96	39,19	/	44,42	42,31	/	41,28	/	/
15	39,9	42,2	/	41,81	40,08	45,84	44,03	/	/
16	38,68	39,96	/	43	40,48	45,62	41,35	/	/
17	41,63	/	/	47,04	43,53	42,02	40,64	/	/
18	40,51	44,28	/	45,11	/	43,74	42,15	/	/
19	40,95	39,89	/	44,65	41,62	/	42,66	/	/
20	37,81	38,65	/	44,15	41,67	44,34	43,28	/	/
21	/	40,09	/	/	/	/	40,02	/	/
22	/	/	/	/	/	/	/	/	/
23	42,47	40,29	/	41,06	38,46	39,84	/	/	/
24	/	/	/	/	/	42,65	39,48	40,68	/
25	40,85	/	/	40,77	37,97	/	/	/	/
26	38,87	38,75	/	39,12	38,59	/	/	/	/

ES 2 570 828 T3

27	/	40	/	38,68	39,36	42,54	38,6	/	/
28	37,89	/	/	40,72	38,83	/	39,84	/	/
29	39,63	/	/	41,87	/	39,61	/	/	/
29	39,29	39,56	/	45,7	38,52	/	/	/	/
Número de muestras detectadas	21	20	0	24		23		1	

Ejemplo 7: Mejoras de los ejemplos 3 - 6

Aislamiento por medio de los gránulos de Kit de ARN/ADN Viral Chemagic (Chemagen Biopolymer-Technologie AG, Alemania, Número de Artículo 1002) - Protocolo II:

5 Se recolectó plasma como se describe en el documento WO 2006/113770. En resumen, se extrajo sangre en tubos de plasma EDTA de 10 ml utilizando el sistema Vacutainer. Los tubos se centrifugaron a 1500 x g durante 10 min, el sobrenadante se transfirió a un nuevo tubo y se centrifugó una segunda vez a 1500 xg durante 10 min. El sobrenadante es el plasma para su uso adicional (4-5 ml).

10 Para el aislamiento de ADN, se agregaron 5 ml de Regulador de Lisis, 1,7 µl de poli-A ARN, 30 µl de solución de Proteinasa K y 15 µl de una dilución 1:10 de antiespumante (Sigma-Aldrich Chemie GmbH, Número de Artículo A5633) a las muestras de plasma (todas ajustadas a 5 ml). Las muestras se incubaron a 56° C durante 10 min. Después de eso se agregaron 100 µl de gránulos magnéticas (Número de Artículo 1002) y 15 ml de Regulador de Unión 2, 2*1, 2*2, 2*3 o 2*4. Con el fin de mantener los gránulos en suspensión mediante agitación gentil, las muestras se colocaron en un mezclador rotativo a temperatura ambiente durante aproximadamente 10 o 60 min, respectivamente, para permitir la unión del ADN a los gránulos. los gránulos magnéticas se separaron al colocar el tubo de reacción en un soporte magnético y descartar la mezcla de plasma/ regulador de lisis. los gránulos se lavaron una sola vez o dos veces con 3 ml de Regulador de Lavado 3, antes de que se resuspendieran en 1 ml de Regulador de Lavado 4, y se transfirieron a tubos nuevos. los gránulos se separaron sobre un soporte magnético, el Regulador de Lavado se vertió y se secaron los gránulos a 56° C. Después de adición de 100 µl Regulador de Elución 5, se incubó la suspensión durante 15 min en el termomezclador a 65° C. Después de separación de los gránulos, se recuperó el regulador de elución que contenía ADN genómico. (Todos los reactivos fueron suministrados por el Kit de ADN/ARN Viral Chemagic si no se indica lo contrario; los Reguladores de Unión 2*1, 2*2, 2*3, y 2*4 son variaciones del Regulador de Unión 2 que están disponibles comercialmente de Chemagen Biopolymer-Technologie AG, Alemania).

Para el tratamiento con bisulfito, el ADN genómico recuperado se sometió al protocolo del Ejemplo 4.

25 Para purificación, el ADN tratado con bisulfito de acuerdo con el Ejemplo 4 se sometió a purificación según el protocolo del Ejemplo 5 (A).

Para la detección de secuencias metiladas del gen Septina 9, el ADN purificado obtenido por el protocolo del Ejemplo 5 se sometió a PCR HeavyMethyl de Septina 9 sencillo (PCR2 del dúplex PCR) del Ejemplo 6.

30 Los resultados de este PCR se muestran en la Figura 9. Se obtienen mejores resultados es decir aumento de recuperación de ADN de alto y bajo peso molecular por (i) un único lavado con regulador 3 de lavado, (ii) por incubación de 60 min para permitir la unión del ADN a gránulos, y (iii) por uso de los reguladores de unión 2*3 y 2*4.

Ejemplo 8: Estudio de flujo de trabajo

Recolección de Muestras

35 Las muestras de plasma se recogieron utilizando tubos Vacutainer Lavender con EDTA (BD, Número de Artículo 366643). Las muestras recogidas (volumen 5 ml) se almacenaron congeladas a -80° C luego de uso. En total, se recolectaron 268 muestras de plasma: 171 normales (sanas), 97 con cáncer colorrectal de lo cual, 22 eran de etapa I, 37 de etapa II, y 38 eran de etapa III.

Extracción de ADN

5 ml de regulador de lisis I, 7 µl poli (A) ARN 1 µg/µl (Roche), y 30 µl de proteinasa K se agregaron a cada muestra, y se mezclaron a fondo durante 10 s. Posteriormente, las muestras se incubaron a 56° C durante 10 min. 100 µl de gránulos magnéticas Chemagen y 15 ml Regulador de Unión 2*3 se agregaron a cada muestra y se mezclaron a fondo durante 10 s. La muestra se incubó durante 60 min a temperatura ambiente en agitación continua. Después de eso cada muestra se colocó en un separador magnético para 4 min antes de que se descarte el sobrenadante. Los gránulos de cada muestra se resuspendieron en 3 ml de regulador de lavado 3 y 1.5 ml de cada muestra se transfirieron en un tubo de 2.0 ml. Cada tubo se colocó en un separador magnético durante 2 min antes de descartar el sobrenadante. Los restos de cada muestra se combinaron de nuevo en un tubo de 2 ml. Luego dicho tubo se colocó en un separador magnético durante 2 min. y se descartó el sobrenadante. Después de una breve centrifugación, cada tubo se colocó de nuevo en un separador magnético durante 2 min y se eliminó el sobrenadante restante. los gránulos de cada muestra se secaron a 56° C durante 3-5 min con la tapa de tubo abierto. Para la elución de ADN, se agregaron 100 µl de Regulador de Elución 5 a los gránulos de cada muestra. Después de resuspensión, los gránulos de cada muestra se incubaron a 65° C durante 15 min en agitación continua (1,400 rpm). Los gránulos de cada muestra se centrifugaron brevemente, antes cada tubo se colocó en un separador magnético durante 2 min y el eluado con ADN se transfirió a un tubo de 0.5 ml. En caso de que el eluado aún contuviera gránulos, se repitió la etapa de separación magnética. El volumen de cada eluado se ajustó a 100 µl antes de almacenamiento a 4° C. (Todos los reactivos se suministraron por el Kit de ARN/ADN Viral de Chemagic (Chemagen Biopolymer-Technologie AG, Alemania, Número de Artículo 1002) si no se indica lo contrario; los Reguladores de Unión 2*3 son la variación del Regulador de Unión 2, que está disponible comercialmente de Chemagen Biopolymer-Technologie AG, Alemania)

20 Tratamiento con bisulfito

Se prepararon las siguientes soluciones. Fueron suficientes para 25 reacciones.

- Solución de bisulfito: 4.71 g de disulfito de sodio (Merck Número de Artículo 1.06528.0500) y 1.13 g de sulfito de sodio (Número de Artículo Fluka 71988) se

25 disuelven al agregar 10 ml de ddH₂O. Esto resultó en una solución con 4.9 mol/l de sulfito de hidrógeno (el reactivo activo para tratamiento de bisulfito). Si la necesidad ha sido, el pH de la solución se ajustó por medio de 0.2 mol/l de NaOH (VWR o Sigma Aldrich) que estuvo en el rango entre 5.4 y 5.5. Con el fin de disolver las sales completamente, la mezcla se puede haber mezclado vigorosamente y se calentó a 50° C.

30 - Solución de eliminador de radicales de DME: se disolvieron 188 mg de ácido 6-hidroxi-2,5,7,8- tetrametil-croman-2-carboxílico (Número de Artículo Aldrich 23,881-3) en 1.5 ml de DME (Número de Artículo Merck 8.02934.0250). Con el fin de garantizar que ninguna partícula sin disolver permanezca, la mezcla se mezcló vigorosamente.

Se agregaron 190 µl de solución de bisulfito y 30 µl de solución de DME que contenía el eliminador de radicales a cada 100 µl muestra de ADN eluido. Se aplicó el siguiente protocolo de temperatura sobre las muestras por medio de un Termociclador Eppendorf (Eppendorf masterciclor): 5 min 99° C; 25 min 50° C; 5 min 99° C; 1 h 25 min 50° C; 5 min 99° C; 4h 55min 50° C, 20° C

35 Purificación de bisulfito:

Se transfirieron 320 µl de cada muestra tratada con bisulfito a un tubo de 2.0 ml. Se agregó 1 µl de ARN polyA 500 ng/µl (Roche) y 1.5 ml de Regulador de Unión 1 a cada muestra. Después de mezclar a fondo, se agregaron 10 µl de gránulos magnéticos Chemagen y se mezclaron brevemente. Las muestras se incubaron 60 min a temperatura ambiente en agitación continua (1,000 rpm). Después de eso, cada muestra se colocó en un separador magnético durante 2 min y se descartó el sobrenadante. Las muestras se centrifugaron brevemente, se colocaron de nuevo en los separadores magnéticos durante 2 min y se descartó el sobrenadante. Las muestras se lavaron dos veces al agregar 300 µl de Regulador de Lavado 2 a cada tubo, resuspender los gránulos, colocar cada tubo durante 2 min en un separador magnético, y descartar el sobrenadante. Posteriormente, las muestras se lavaron por adición de 300 µl de etanol al 70% (VWR o Sigma Aldrich) a cada tubo, se resuspendieron los gránulos, se colocó cada tubo durante 2 minutos en un separador magnético, y se descartó el sobrenadante. Los tubos se centrifugaron brevemente, se colocaron de nuevo en separadores magnéticos y se eliminaron los sobrenadantes restantes. Después de eso, las muestras se secaron a 55° C durante 3-5 min con la tapa de tubo abierta. Para la elución de ADN, 55 µl de 10 mmol/l de Tris pH 7.2 (VWR o Sigma Aldrich) se agregaron a cada muestra. Las muestras se incubaron durante 15 min a 55° C en agitación continua (1,000 rpm). Después de eso, cada una de las muestras se centrifugaron brevemente, se colocaron en un separador magnético y el eluado que contenía ADN se transfirió a un nuevo tubo de 1.7 ml. El volumen de cada eluado se ajustó a 55 µl con Tris 10 mM pH 7.2 antes de almacenamiento a 4° C. (Todos los reactivos se suministraron por el Kit de ARN/ADN Viral Chemagic (Chemagen Biopolymer-Technologie AG, Alemania, Número de Artículo 1002) si no se indica lo contrario).

Análisis de PCR de metilación del gen Septina 9 en tiempo real

ES 2 570 828 T3

Cada muestra se analizó por triplicado. Para cuantificación de amplificadores, se utilizaron los siguientes estándares: 2x 20 ng, 2x 5 ng, 2x 1 ng, 3x 0.4 ng de ADN genómico tratado como las muestras que se van a analizar.

5 Se preparó una mezcla maestra que contenía todos los reactivos para PCR. Se pipetearon 15 µl de esta mezcla maestra en cada pozo de una placa de 96 pozos. Posteriormente, se agregaron respectivamente 10 µl de bisulfito purificado tratado con ADN a cada pozo.

Cada mezcla de reacción contenía los siguientes (volumen final 25 µl):

Reactivo (concentración)	Volumen	Concentración final
	1.875 µl	
cebador (30 µmol/l)	0.25 µl	0.30 µmol/l
SEQ ID NO: 5 5' – AAATAATCCCATCCA ACTA – 3'		
cebador (30 µmol/l)	0.25 µl	0.30 µmol/l
SEQ ID NO: 6 5' - GATT-X-GTTGTTTATTAGTTATTATGT –3'		
bloqueador (100 µmol/l)	0.25 µl	1.00 µmol/l
SEQ ID NO: 7 5' - GTTATTATGTTGGATTTTGTGGTTAATGTGTAG - 3'C3		
sonda (20 µmol/l)	0.125 µl	0.10 µmol/l
SEQ ID NO: 8 5' - FAM - TTAACCGCGAAATCCGAC - 3'BHQ1		
Soplador PCR 2x	12.5 µl	1 x
Kit QuantiTect multiplex PCR NoROX (Quiagen Número de Artículo 204743 o 204745)		
ADN	10.0 µl	

Las placas se colocaron en un Termociclador PCR en tiempo real 480 LightCiclor (Roche Diagnostics) y se aplicó el siguiente protocolo de temperatura: 95° C 30 min; 55x: 95° C 10 s, 56° C 30 s (detección individual), 40° C 5 s.

10 Los amplificadores de PCR son indicadores de presencia de metilación de los dinucleótidos CpG cubiertos por PCR

Los datos resultantes se analizaron de tres maneras:

- 1) Una muestra se consideró como positiva, cuando uno de los triplicados fue positivo.
- 2) Una muestra se consideró como positiva, cuando dos de los triplicados fueron positivos.
- 3) Análisis cuantitativo con punto de corte optimizado utilizando análisis ROC con especificidad en 95% y 90%.

15 Las siguientes Tablas 5 y 6 resumen los resultados:

Tabla 5

Desempeño de PCR de Septina 9 sobre controles saludables y muestras de cáncer colorrectal		
Modo de interpretación de datos	Sensibilidad	especificidad
1/3	73/97 75.3%	23/171 86.5%

2/3	55/97 56,7%	4/171 97.6%
cuantitativo	61% 68%	95%, o 90%

Tabla 6

Desempeño de PCR de Septina 9 sobre muestras de cáncer colorrectal por etapa				
Modo de interpretación de datos	1/3		2/3	
etapa I	10/22		7/22	
etapa II	31/37		24/37	
etapa III	32/38		24/38	
general	73/97	75.3%	55/97	57%

Ejemplo 8: Preparación de ADN a partir de orina:

5 Se agregaron a cada 8 ml de muestra de orina 8 ml de Regulador de Lisis Chemagen, 10.5 µl de ácido poliadenílico (poli A ARN de Roche Applied Sciences # 10108626, 1 µg/µl), y 45 µl de solución de Proteasa Chemagen. Las muestras se mezclaron por agitación durante 10 s, y se incubaron a 56° C durante 10 min. Se agregaron 150 µl de glóbulos Chemagen al lisado, y 22.5 µl de Regulador de Unión Chemagen 2*3. La muestra se mezcló por agitación durante 10 s. 10 Las muestras luego se mezclaron en un rotador durante 1 h a temperatura ambiente. Las muestras luego se colocaron en un separador magnético durante 4 min, se descartó el sobrenadante y se agregaron 3 ml de regulador de lavado. Las muestras se mezclaron. Se transfirieron alícuotas de 1.5 ml a un tubo safelock de 2 ml, colocado sobre un separador magnético durante 2 min y el regulador de lavado se retiró al pipetear. La muestra restante se transfirió al tubo safelock, colocado sobre el separador y se retiró el regulador de separación y lavado. Se eliminó el regulador residual después de 15 20 s de centrifugación a 1,000 rpm, y las partículas magnéticas se secaron al aire durante 5 min a 65° C. Se agregó 100 µl de regulador de elución y los gránulos se incubaron a 65° C en un mezclador térmico a 1,000 rpm. Las muestras luego se colocaron en un separador magnético durante 2 min y el eluado que contenía el ADN extraído se transfirió a un tubo de microcentrifuga y se almacenó para procesamiento adicional.

Este flujo de trabajo se prueba en un estudio de 20 muestras de orina, dichas muestras se recolectan de pacientes después de masajes de próstata. Dos 8 ml de muestras de orina completas se prueban por paciente. Las muestras se preparan sin centrifugación y se extraen como se describió anteriormente. Luego de extracción, las muestras de ADN se diluyen 1/10 en regulador de elución y se determina la recuperación de ADN genómico total mediante PCR en tiempo real con el ensayo CFF1 (realizado como se describe en WO 2007/039101). Como se ilustra en la siguiente tabla, la recuperación de ADN total es muy similar entre réplicas del mismo paciente, lo que demuestra extracción de ADN consistente. Los niveles de ADN total varían en gran medida entre pacientes, consistente las observaciones previas.

Tabla 7: Recuperación de ADN total (CFF1) de réplica de extracciones de 8 ml de 20 muestras de pacientes.

Muestra	ng/ml de ADN	Promedio	Desviación estándar
1A	143.75	142.50	1.77
1B	141.25		
2A	19.75	21.88	3.01
2B	24.00		

ES 2 570 828 T3

Muestra	ng/ml de ADN	Promedio	Desviación estándar
3A	8.00	7.88	0.17
3B	7.76		
4A	22.88	22.81	0.09
4B	22.75		
5A	4.59	4.33	0.36
5B	4.08		
6A	185.00	194.38	13.26
6B	203.75		
7A	45.13	45.75	0.88
7B	46.38		
8A	12.18	11.99	0.27
8B	11.80		
9A	72.63	72.13	0.71
9B	71.63		
10A	43.88	41.19	3.80
10B	38.50		
11A	20.50	20.38	0.18
11B	20.25		
12A	9.71	9.35	0.51
12B	8.99		
13A	119.38	99.06	28.73
13B	78.75		
14A	130.00	165.63	50.38
14B	201.25		
15A	22.25	24.19	2.74
15B	26.13		
16A	152.50	142.50	14.14
16B	132.50		

Muestra	ng/ml de ADN	Promedio	Desviación estándar
17A	14.88	13.30	2.23
17B	11.73		
18A	17.25	17.75	0.71
18B	18.25		
19A	3.65	3.61	0.06
19B	3.56		
20A	472.50	451.88	29.17
20B	431.25		

(Todos los reactivos y soluciones no especificadas de otra forma se obtienen de Chemagen, Biopolymer-Technologie AG, Alemania)

Breve descripción de las figuras

- 5 Figura 1 Curvas de amplificación representativas de 6 muestras analizadas por el PCR HeavyMethyl dúplex Septina 9. Las señales obtenidas en el canal 533 nm se especifican para el PCR1.
- Figura 2 Curvas de amplificación representativas de 6 muestras analizadas por el PCR HeavyMethyl dúplex Septina 9. Las señales obtenidas en el canal 610 nm se especifican para el PCR2.
- 10 Figura 3 Curvas de amplificación representativas de 6 muestras analizadas por el PCR HeavyMethyl sencillo Septina 9. Las señales se obtienen en el canal 533 nm.
- Figura 4 Diagrama que ilustra el índice de detección determinado de muestras de números de copias con bajo objetivo. 3 diluciones diferentes, que se preparan en 30 réplicas cada una. 20 ng de ADN PBL (dos barras izquierdas) y 20 ng de ADN PBL que contienen 37.5 pg de ADN metilado (dos barras en el centro) y 20 ng de ADN PBL que contienen 75 pg de ADN metilado son bisulfito convertido en 30 réplicas. Después de tratamiento con bisulfito cada muestra se eluye en 50 µl de agua y 10 µl (1/5th) se aplica a el PCR HeavyMethyl sencillo y dúplex Septina 9. Los índices de detección obtenidos se calculan a partir de los números detectaron muestras fuera de 30 réplicas (véase Tabla 4). Las barras de error representan el 95% de intervalo de confianza a cada medición.
- 15
- Figura 5 Curva estándar del PCR1 como parte del ensayo HeavyMethyl Septina 9 dúplex. La serie de dilución de bisulfito metilado convertido a ADN contiene 25, 5, 1 y 0.2 ng por reacción. La eficiencia de PCR se calcula con 1.838.
- 20
- Figura 6 Curva estándar del PCR2 como parte del ensayo HeavyMethyl Septina 9 dúplex. La serie de dilución de bisulfito metilado convertido a ADN contiene 25, 5, 1 y 0.2 ng por reacción. La eficiencia de PCR se calcula con 1.810.
- Figura 7 Curva estándar del PCR HeavyMethyl sencillo Septina 9 generado por una serie de dilución de bisulfito metilado convertido a ADN en el rango de concentración de 25 a 0.2 ng por reacción. La eficiencia de PCR se calcula con 1.903.
- 25
- Figura 8: Esquema de los dos amplicones del PCR HeavyMethyl dúplex Septina 9. El PCR sencillo de septina 9 es similar al PCR2 del ensayo dúplex.
- Figura 9. Se muestran los resultados del Ejemplo 7. Se detecta el aumento de recuperación de ADN de alto y bajo peso molecular para muestras tratadas con (i) un único lavado con regulador 3 de lavado, (ii) con una incubación de 60 min. para permitir la unión del ADN a gránulos, y (iii) con el uso de los reguladores de unión 2*3 y 2*4. (SOP = 10 min. de incubación para unión de ADN a gránulos y Regulador de Unión 2; 60 min_SOP = 60 min. de incubación para unión de ADN a gránulos y Regulador de Unión 2; 60 min*1 = 60 min. de incubación para unión de ADN a gránulos y Regulador de Unión 2*1; 60 min*2 = 60 min. de incubación para unión de ADN a gránulos y Regulador de Unión 2*2; 60 min*3 = 60 min. de incubación para unión de ADN a gránulos y Regulador de Unión 2*3; 60 min*4 = 60 min. de incubación para
- 30

unión de ADN a gránulos y Regulador de Unión 2*4; triángulos y líneas entre ellos representan puntos o rangos de medición de muestras tratadas como se indica).

Listado de Secuencias

<110> Epigenomics AG

<120> método PARA ANÁLISIS DE METILACIÓN DE SEPTINA 9

<130> 536-14 EPT1

5 <150> EP 07109907.1

<151> 2007-06-08

<150> EP 07110409.5

<151> 2007-06-15

<150> EP 07113516.4

10 <151> 2007-07-31

<150> EP 07114659.1

<151> 2007-08-21

<150> EP 07114863.9

<151> 2007-08-23

15 <150> EP 08150552.1

<151> 2008-01-23

<150> EP 08151442.4

<151> 2008-02-14

<150> EP 08789067.9

20 <151> 2008-06-06

<160> 105

<210> 1

<211> 17

<212> ADN

25 <213> Secuencia Artificial

<220>

<223> oligonucleótido para análisis de metilación de septina 9

<400> 1

ccaccaacca tcatatc 17

30 <210> 2

<211> 27

<212> ADN
<213> Secuencia Artificial
<220>
<223> oligonucleótido para análisis de metilación de septina 9
5 <220>
<221> no seguro
<222> (7)
<223> base no conocida
<400> 2
10 gaagtngaa atgatttat ttagttg 27
<210> 3
<211> 31
<212> ADN
<213> Secuencia Artificial
15 <220>
<223> oligonucleótido para análisis de metilación de septina 9
<400> 3
ccatcatatc aaacccaca atcaacacac a 31
<210> 4
20 <211> 17
<212> ADN
<213> Secuencia Artificial
<220>
<223> oligonucleótido para análisis de metilación de septina 9
25 <400> 4
gatcgcgggg ttcgata 17
<210> 5
<211> 19
<212> ADN
30 <213> Secuencia Artificial
<220>

<223> oligonucleótido para análisis de metilación de septina 9
<400> 5
aaataatccc atccaacta 19
<210> 6
5 <211> 26
<212> ADN
<213> Secuencia Artificial
<220>
<223> oligonucleótido para análisis de metilación de septina 9
10 <220>
<221> no seguro
<222> (5)
<223> base no conocida
<400> 6
15 gatngttgt ttattagta ttatgt 26
<210> 7
<211> 33
<212> ADN
<213> Secuencia Artificial
20 <220>
<223> oligonucleótido para análisis de metilación de septina 9
<400> 7
gttattatgt tggatttgt ggtaaatgtg tag 33
<210> 8
25 <211> 18
<212> ADN
<213> Secuencia Artificial
<220>
<223> oligonucleótido para análisis de metilación de septina 9
30 <400> 8
ttaaccgcga aatccgac 18

<210> 9
<211> 32
<212> ADN
<213> Secuencia Artificial
5 <220>
<223> oligonucleótido para análisis de metilación de septina 9
<400> 9
accatcatat caaacccac aatcaacaca ca 32
<210> 10
10 <211> 63
<212> ADN
<213> Secuencia Artificial
<220>
<223> oligonucleótido para análisis de metilación de septina 9
15 <220>
<221> no seguro
<222> (7)
<223> base no conocida
<400> 10
20 gaagtngaa atgatttat ttagttgcg gttgatcgcg gggttcgata tgatggttg 60 tgg 63
<210> 11
<211> 65
<212> ADN
<213> Secuencia Artificial
25 <220>
<223> oligonucleótido para análisis de metilación de septina 9
<220>
<221> no seguro
<222> (5)
30 <223> base no conocida
<400> 11

gattngttgt ttattagtta ttatgtcggg tttcgcgggt aacgcgtagt tggatgggat 60 tattt 65

<210> 12

<211> 17

<212> ADN

5 <213> Secuencia Artificial

<220>

<223> oligonucleótido para análisis de metilación de septina 9

<400> 12

cccaccaacc atcatat 17

10 <210> 13

<211> 18

<212> ADN

<213> Secuencia Artificial

<220>

15 <223> oligonucleótido para análisis de metilación de septina 9

<400> 13

cccaccaacc atcatatc 18

<210> 14

<211> 17

20 <212> ADN

<213> Secuencia Artificial

<220>

<223> oligonucleótido para análisis de metilación de septina 9

<400> 14

25 accaccaac catcata 17

<210> 15

<211> 20

<212> ADN

<213> Secuencia Artificial

30 <220>

<223> oligonucleótido para análisis de metilación de septina 9

<400> 15
ctaccaccca accatcatat 20
<210> 16
<211> 26
5 <212> ADN
<213> Secuencia Artificial
<220>
<223> oligonucleótido para análisis de metilación de septina 9
<400> 16
10 gaagttggaa atgattttat ttagtt 26
<210> 17
<211> 27
<212> ADN
<213> Secuencia Artificial
15 <220>
<223> oligonucleótido para análisis de metilación de septina 9
<400> 17
gaagttggaa atgattttat ttagttg 27
<210> 18
20 <211> 26
<212> ADN
<213> Secuencia Artificial
<220>
<223> oligonucleótido para análisis de metilación de septina 9
25 <400> 18
gaagttgaa atgattttat ttagtt 26
<210> 19
<211> 27
<212> ADN
30 <213> Secuencia Artificial
<220>

<223> oligonucleótido para análisis de metilación de septina 9
<400> 19
gaagtagaa atgatttat ttagtg 27
<210> 20
5 <211> 25
<212> ADN
<213> Secuencia Artificial
<220>
<223> oligonucleótido para análisis de metilación de septina 9
10 <220>
<221> no seguro
<222> (6)
<223> base no conocida
<400> 20
15 aagtngaaa tgatttatt tagtt 25
<210> 21
<211> 26
<212> ADN
<213> Secuencia Artificial
20 <220>
<223> oligonucleótido para análisis de metilación de septina 9
<220>
<221> no seguro
<222> (7)
25 <223> base no conocida
<400> 21
gaagtngaa atgatttat ttagtt 26
<210> 22
<211> 26
30 <212> ADN
<213> Secuencia Artificial

<220>
<223> oligonucleótido para análisis de metilación de septina 9
<220>
<221> no seguro
5 <222> (6)
<223> base no conocida
<400> 22
aagttngaaa tgattttatt tagttg 26
<210> 23
10 <211> 32
<212> ADN
<213> Secuencia Artificial
<220>
<223> oligonucleótido para análisis de metilación de septina 9
15 <400> 23
catcatatca aaccccacaa tcaacacaca ac 32
<210> 24
<211> 32
<212> ADN
20 <213> Secuencia Artificial
<220>
<223> oligonucleótido para análisis de metilación de septina 9
<400> 24
ccatcatatc aaaccccaca atcaacacac aa 32
25 <210> 25
<211> 32
<212> ADN
<213> Secuencia Artificial
<220>
30 <223> oligonucleótido para análisis de metilación de septina 9
<400> 25

atcatatcaa accccacaat caacacacaa ct 32

<210> 26

<211> 31

<212> ADN

5 <213> Secuencia Artificial

<220>

<223> oligonucleótido para análisis de metilación de septina 9

<400> 26

accatcatat caaacccac aatcaacaca c 31

10 <210> 27

<211> 32

<212> ADN

<213> Secuencia Artificial

<220>

15 <223> oligonucleótido para análisis de metilación de septina 9

<400> 27

aaccatcata tcaaacccca caatcaacac ac 32

<210> 28

<211> 28

20 <212> ADN

<213> Secuencia Artificial

<220>

<223> oligonucleótido para análisis de metilación de septina 9

<400> 28

25 agttgtgtgt tgattgtggg gttgata 28

<210> 29

<211> 25

<212> ADN

<213> Secuencia Artificial

30 <220>

<223> oligonucleótido para análisis de metilación de septina 9

<400> 29
agttgtgtgt tgattgtggg gtttg 25
<210> 30
<211> 31
5 <212> ADN
<213> Secuencia Artificial
<220>
<223> oligonucleótido para análisis de metilación de septina 9
<400> 30
10 atttagttgt ggttgattg tggggttga t 31
<210> 31
<211> 19
<212> ADN
<213> Secuencia Artificial
15 <220>
<223> oligonucleótido para análisis de metilación de septina 9
<400> 31
gaaccccgcg atcaacgcg 19
<210> 32
20 <211> 20
<212> ADN
<213> Secuencia Artificial
<220>
<223> oligonucleótido para análisis de metilación de septina 9
25 <400> 32
tagttgcgcg ttgatcgcg 20
<210> 33
<211> 18
<212> ADN
30 <213> Secuencia Artificial
<220>

<223> oligonucleótido para análisis de metilación de septina 9
<400> 33
tagttgcgcg ttgatcgc 18
<210> 34
5 <211> 15
<212> ADN
<213> Secuencia Artificial
<220>
<223> oligonucleótido para análisis de metilación de septina 9
10 <400> 34
ccgcatcaa cgcgc 15
<210> 35
<211> 15
<212> ADN
15 <213> Secuencia Artificial
<220>
<223> oligonucleótido para análisis de metilación de septina 9
<400> 35
cgcttgatc gcggg 15
20 <210> 36
<211> 14
<212> ADN
<213> Secuencia Artificial
<220>
25 <223> oligonucleótido para análisis de metilación de septina 9
<400> 36
cgcttgatc gcgg 14
<210> 37
<211> 15
30 <212> ADN
<213> Secuencia Artificial

<220>
<223> oligonucleótido para análisis de metilación de septina 9
<400> 37
accccgcgat caacg 15
5 <210> 38
<211> 15
<212> ADN
<213> Secuencia Artificial
<220>
10 <223> oligonucleótido para análisis de metilación de septina 9
<400> 38
tgatcgcggg gttcg 15
<210> 39
<211> 15
15 <212> ADN
<213> Secuencia Artificial
<220>
<223> oligonucleótido para análisis de metilación de septina 9
<400> 39
20 aaccccgca tcaac 15
<210> 40
<211> 15
<212> ADN
<213> Secuencia Artificial
25 <220>
<223> oligonucleótido para análisis de metilación de septina 9
<400> 40
gttgatcgcg gggtt 15
<210> 41
30 <211> 14
<212> ADN

<213> Secuencia Artificial
<220>
<223> oligonucleótido para análisis de metilación de septina 9
<400> 41
5 ccccgcatc aacg 14
<210> 42
<211> 18
<212> ADN
<213> Secuencia Artificial
10 <220>
<223> oligonucleótido para análisis de metilación de septina 9
<400> 42
cgatcaacgc gcaactaa 18
<210> 43
15 <211> 20
<212> ADN
<213> Secuencia Artificial
<220>
<223> oligonucleótido para análisis de metilación de septina 9
20 <400> 43
aaataatccc atccaactac 20
<210> 44
<211> 26
<212> ADN
25 <213> Secuencia Artificial
<220>
<223> oligonucleótido para análisis de metilación de septina 9
<400> 44
gattggtgt ttattagta ttatgt 26
30 <210> 45
<211> 25

- <212> ADN
- <213> Secuencia Artificial
- <220>
- <223> oligonucleótido para análisis de metilación de septina 9
- 5 <400> 45
attggtggt tattagttat tatgt 25
- <210> 46
- <211> 26
- <212> ADN
- 10 <213> Secuencia Artificial
- <220>
- <223> oligonucleótido para análisis de metilación de septina 9
- <400> 46
gattagttgt ttattagtta ttatgt 26
- 15 <210> 47
- <211> 25
- <212> ADN
- <213> Secuencia Artificial
- <220>
- 20 <223> oligonucleótido para análisis de metilación de septina 9
- <400> 47
attagttggt tattagttat tatgt 25
- <210> 48
- <211> 25
- 25 <212> ADN
- <213> Secuencia Artificial
- <220>
- <223> oligonucleótido para análisis de metilación de septina 9
- <220>
- 30 <221> no seguro
- <222> (4)

<223> base no conocida
<400> 48
atnngttgtt tattagttat tatgt 25
<210> 49
5 <211> 33
<212> ADN
<213> Secuencia Artificial
<220>
<223> oligonucleótido para análisis de metilación de septina 9
10 <400> 49
attatgttg atttgtggt taatgtgtag ttg 33
<210> 50
<211> 33
<212> ADN
15 <213> Secuencia Artificial
<220>
<223> oligonucleótido para análisis de metilación de septina 9
<400> 50
attatgttg atttgtggt taatgtgtag ttg 33
20 <210> 51
<211> 31
<212> ADN
<213> Secuencia Artificial
<220>
25 <223> oligonucleótido para análisis de metilación de septina 9
<400> 51
ccatccaact acacattaac cacaaaatcc a 31
<210> 52
<211> 29
30 <212> ADN
<213> Secuencia Artificial

<220>
<223> oligonucleótido para análisis de metilación de septina 9
<400> 52
atccaactac acattaacca caaaatcca 29

5 <210> 53
<211> 28
<212> ADN
<213> Secuencia Artificial
<220>

10 <223> oligonucleótido para análisis de metilación de septina 9
<400> 53
ccaactacac attaaccaca aaatccaa 28
<210> 54
<211> 26
<212> ADN
<213> Secuencia Artificial
<220>

15 <223> oligonucleótido para análisis de metilación de septina 9
<400> 54
caactacaca ttaaccacaa aatcca 26
<210> 55
<211> 37
<212> ADN
<213> Secuencia Artificial

25 <220>
<223> oligonucleótido para análisis de metilación de septina 9
<400> 55
attagttatt atgttgatt ttgtggtaa tgtgtag 37
<210> 56

30 <211> 37
<212> ADN

<213> Secuencia Artificial

<220>

<223> oligonucleótido para análisis de metilación de septina 9

<400> 56

5 agttattatg ttggattttg tggtaaatgt gtagttg 37

<210> 57

<211> 33

<212> ADN

<213> Secuencia Artificial

10 <220>

<223> oligonucleótido para análisis de metilación de septina 9

<400> 57

ttatgttga tttgtggft aatgttagt tgg 33

<210> 58

15 <211> 19

<212> ADN

<213> Secuencia Artificial

<220>

<223> oligonucleótido para análisis de metilación de septina 9

20 <400> 58

cggatttcgc ggtaacgc 19

<210> 59

<211> 18

<212> ADN

25 <213> Secuencia Artificial

<220>

<223> oligonucleótido para análisis de metilación de septina 9

<400> 59

cgtaaccgc gaaatccg 18

30 <210> 60

<211> 18

<212> ADN
<213> Secuencia Artificial
<220>
<223> oligonucleótido para análisis de metilación de septina 9
5 <400> 60
cgcgtaacc gcgaaatc 18
<210> 61
<211> 17
<212> ADN
10 <213> Secuencia Artificial
<220>
<223> oligonucleótido para análisis de metilación de septina 9
<400> 61
atttcgcggt taacgcg 17
15 <210> 62
<211> 25
<212> ADN
<213> Secuencia Artificial
<220>
20 <223> oligonucleótido para análisis de metilación de septina 9
<220>
<221> no seguro
<222> (4)
<223> base no conocida
25 <400> 62
attngttgt tattagttat tatgt 25
<210> 63
<211> 26
<212> ADN
30 <213> Secuencia Artificial
<220>

- <223> oligonucleótido para análisis de metilación de septina 9
<400> 63
gattggtgt ttattagta ttatgt 26
<210> 64
5 <211> 26
<212> ADN
<213> Secuencia Artificial
<220>
<223> oligonucleótido para análisis de metilación de septina 9
10 <400> 64
gattagtgt ttattagta ttatgt 26
<210> 65
<211> 16
<212> ADN
15 <213> Secuencia Artificial
<220>
<223> oligonucleótido para análisis de metilación de septina 9
<400> 65
cccaacaccc accttc 16
20 <210> 66
<211> 17
<212> ADN
<213> Secuencia Artificial
<220>
25 <223> oligonucleótido para análisis de metilación de septina 9
<400> 66
caacaaccaa cccaaca 17
<210> 67
<211> 18
30 <212> ADN
<213> Secuencia Artificial

<220>
<223> oligonucleótido para análisis de metilación de septina 9
<400> 67
caacaaccaa cccaacac 18
5 <210> 68
<211> 16
<212> ADN
<213> Secuencia Artificial
<220>
10 <223> oligonucleótido para análisis de metilación de septina 9
<400> 68
aacccaacac ccacct 16
<210> 69
<211> 17
15 <212> ADN
<213> Secuencia Artificial
<220>
<223> oligonucleótido para análisis de metilación de septina 9
<400> 69
20 caaccaaca cccacct 17
<210> 70
<211> 17
<212> ADN
<213> Secuencia Artificial
25 <220>
<223> oligonucleótido para análisis de metilación de septina 9
<400> 70
caaccaaca cccacct 17
<210> 71
30 <211> 17
<212> ADN

<213> Secuencia Artificial
<220>
<223> oligonucleótido para análisis de metilación de septina 9
<400> 71
5 aaccaaacac ccacctt 17
<210> 72
<211> 20
<212> ADN
<213> Secuencia Artificial
10 <220>
<223> oligonucleótido para análisis de metilación de septina 9
<400> 72
accaaccaa cacccacctt 20
<210> 73
15 <211> 31
<212> ADN
<213> Secuencia Artificial
<220>
<223> oligonucleótido para análisis de metilación de septina 9
20 <400> 73
gttattatgt tggatttgt ggtaatgtg t 31
<210> 74
<211> 35
<212> ADN
25 <213> Secuencia Artificial
<220>
<223> oligonucleótido para análisis de metilación de septina 9
<400> 74
tattatgtg gatttggg ttaatgtga gttgg 35
30 <210> 75
<211> 33

<212> ADN
<213> Secuencia Artificial
<220>
<223> oligonucleótido para análisis de metilación de septina 9
5 <400> 75
gttattatgt tggatttgt ggtaatgtg tag 33
<210> 76
<211> 33
<212> ADN
10 <213> Secuencia Artificial
<220>
<223> oligonucleótido para análisis de metilación de septina 9
<400> 76
gttattatgt tggatttgt ggtaatgtg tag 33
15 <210> 77
<211> 19
<212> ADN
<213> Secuencia Artificial
<220>
20 <223> oligonucleótido para análisis de metilación de septina 9
<400> 77
tcgcggttaa cgcgtagtt 19
<210> 78
<211> 22
25 <212> ADN
<213> Secuencia Artificial
<220>
<223> oligonucleótido para análisis de metilación de septina 9
<400> 78
30 atgggattat ttcggatttc ga 22
<210> 79

<211> 18
<212> ADN
<213> Secuencia Artificial
<220>
5 <223> oligonucleótido para análisis de metilación de septina 9
<400> 79
tttcgcggtt aacgcgta 18
<210> 80
<211> 23
10 <212> ADN
<213> Secuencia Artificial
<220>
<223> oligonucleótido para análisis de metilación de septina 9
<400> 80
15 ttggatggga ttatttggga ttt 23
<210> 81
<211> 25
<212> ADN
<213> Secuencia Artificial
20 <220>
<223> oligonucleótido para análisis de metilación de septina 9
<400> 81
atccgaaata atcccatcca actac 25
<210> 82
25 <211> 18
<212> ADN
<213> Secuencia Artificial
<220>
<223> oligonucleótido para análisis de metilación de septina 9
30 <400> 82
cgttaaccgc gaaatccg 18

ES 2 570 828 T3

- <210> 83
- <211> 19
- <212> ADN
- <213> Secuencia Artificial
- 5 <220>
- <223> oligonucleótido para análisis de metilación de septina 9
- <400> 83
- cggatttcgc ggtaacgc 19
- <210> 84
- 10 <211> 19
- <212> ADN
- <213> Secuencia Artificial
- <220>
- <223> oligonucleótido para análisis de metilación de septina 9
- 15 <400> 84
- aactacgcgt taaccgca 19
- <210> 85
- <211> 2582
- <212> ADN
- 20 <213> Homo Sapiens
- <400> 85

ctgcctagct	ccttccttca	caccttcott	cggaaacgtc	tgctcctgac	aaggtctact	60
tcctgctctc	aggaggccct	tattgtggag	gaagggaggc	gtcgcccgtc	cctggcttct	120
ctgacagccg	tgttccatcc	ccgccctgtg	ccccttctcc	cggacagtgc	cttctccagg	180
gctcaccag	gaggggtgcag	cgggtggccc	cggggcggtg	gtcgtggtgg	gggtgttagc	240
tgcaggggtg	ccctcgggtg	gtgggagttg	gtggcctctc	gctggtgcca	tgggactcgc	300
atgttcgcc	tgcgccctc	ggctcttgag	cccacaggcc	gggatcctgc	ctgccagccg	360
cgtgcgctgc	cgtttaacct	ttgcaggcgc	agagcgcgcg	gcggcggtga	cagagaactt	420

ES 2 570 828 T3

```

tgtttgctg cccaaataca gcctcctgca gaaggacct gcgcccgggg aaggggagga 480
atctcttccc ctctggggcgc ccgccctcct cgccatggcc cggcctccac atccgcccac 540
atctggccgc agcggggcgc cgggggggag gggctgaggc cgcgtctctc gccgtcccct 600
gggcgccggc caggcgggga ggaggggggc gctccggctg tgtcccagg actgtcccc 660
agcggccact cgggccccag cccccaggc ctggccttga caggcggggc gagcagccag 720
tgcgagacag ggaggccggt gcggggtgcg gaacctgat cgcgccgggag gcgggggcgg 780
ggcggggggc cagcgcgcgg ggagggggcg gcgcccgcct tctccccca ttcattcagc 840
tgagccaggg ggctagggg ctctccggc ggctagctct gcactgcagg agcgcggggc 900
cggcgcccca gccagcgcgc agggcccggg ccccgccggg ggcgcttct cgcgctgcc 960
ctccgcgcga cccgctgcc accagccatc atgtcggacc ccgcggtcaa cgcgcagctg 1020
gatgggatca tttcggactt cgaaggtggg tgctgggctg gctgctgagg ccgaggact 1080
gctggagagg accctgcggg tgggcctggc gcgggacggg ggtgcgctga ggggagacgg 1140
gagtgcgctg aggggagacg ggaccctaa tccaggcgc ctcccgtga gagcgcggc 1200
cgccccggc cccgtgcccg cgcgcctac gtgggggacc ctgttagggg caccgcgta 1260
gacctgcgc gccctcacag gacctgtgc tcgttctgcg cactgccgc tgggtttct 1320
tccttttatt gttgtttgtg tttgccaaag gacagcgacc tctcgaggg ctcgcgaggc 1380
tgctcggaa ctctccagga cgcacagttt cactctggga aatccatcgg tcccctcct 1440
ttgctctcc ccggcggctc tcgggccccg cttggaccgg gcaacgggat agggaggtcg 1500
ttcctcacct ccgactgagt ggacagcgc gtctgctcg ggtggacagc cctcccctcc 1560
cccacgccag tttcggggcc gccaaagtgt gcagcccgtg ggccgggagc accgaacgga 1620
cacagcccag gtcgtggcag ggtctagagt gggatgtccc atggcccca tccaggcctg 1680
gggatatcct catccgcctc ccagaatcgg gccgtggggg acagaagggg cctgcgtgcg 1740
ggcagggaga gtattttggc tctctcctgt cttcggggtt tacaaagtgt gttgggactt 1800
gcggggctgc tctgtccaag cctgggtctg gcgtccgct ctctgagcct gtgagtgcgt 1860
gcgcttctc cgtcctctt gactgccggg gctggggctc tgcgtcctgc gtccgcggga 1920
gtaaatacag caggcgaagg ggaagctcac acaatggtct ccagcgtctt ggggcagggc 1980
ttctgagggg cgggcctgcc tctgccggga cctggagccc ccgccctcg gagaggctcc 2040
taggctgact tgggcagagc cctctggtgg gccgggagg ggaaaggctg tgttgaatg 2100
agcaaactgt ccaggtgtca ggccaagctg ggaggtgacc agcctgaggt cctccccgct 2160
ccatggccag aaccagggct gacatctggg tgcctgagc ccagctgcc acacggcca 2220
cctggggtca gccctatctg agtgggggag gcggggcctc ctgggggacc agaactttgg 2280
ctggacgcca agcagagtgc cagtggctgt tcttcagggc tgggcctgag gagggtgtgg 2340
ggcggcgaag ggacgggagg gggttgtgat ccagtggcca ctggcgctgt gcagagtgtg 2400
agctggaaac atcgtagtta ctttgtcagc ttagtggtga aagccctttt tcaggctcta 2460
tccctttgca tccctgcttc ccagagggag gggaggtctg ggtctgcaga gctgggaggg 2520
cttgcgttcc ccgccccct cccccacaac acctcctcat ctggacatct ttgggcacat 2582
gc

```

<210> 86

<211> 99

<212> ADN

5 <213> Homo Sapiens

<400> 86

```

gaccgctgc ccaccagcca tcatgtcggg ccccgcggtc aacgcgcagc tggatgggat 60
catttcggac ttcgaagggt ggtgctgggc tggctgctg 99

```

<210> 87

<211> 68

10 <212> ADN

<213> Homo Sapiens

<400> 87

ES 2 570 828 T3

cgaccgctg cccaccagcc atcatgtcgg accccgcggt caacgcgcag ctggatggga 60
 tcatttcg 68

<210> 88

<211> 67

<212> ADN

5 <213> Homo Sapiens

<400> 88

gaagtccgaa atgatcccat ccagctgcgc gttgaccgcg gggcccgaca tgatggctgg 60
 tgggcag 67

<210> 89

<211> 139

10 <212> ADN

<213> Homo Sapiens

<400> 89

ctgcgcgctg ccctccgcgc gaccgctgc ccaccagcca tcatgtcggga ccccgcggtc 60
 aacgcgcagc tggatgggat catttcggac ttcgaaggtg ggtgctgggc tggctgctgc 120
 ggccgaggac gtgctggag 139

<210> 90

15 <211> 119

<212> ADN

<213> Homo Sapiens

<400> 90

ccctccgcgc gaccgctgc ccaccagcca tcatgtcggga ccccgcggtc aacgcgcagc 60
 tggatgggat catttcggac ttcgaaggtg ggtgctgggc tggctgctgc ggcccgga 119

20 <210> 91

<211> 30

<212> ADN

<213> Secuencia Artificial

<220>

25 <223> oligonucleótido para análisis de metilación de septina 9

<400> 91

ccatcatac aaacccaca atcaacacac 30

<210> 92

- <211> 26
- <212> ADN
- <213> Secuencia Artificial
- <220>
- 5 <223> oligonucleótido para análisis de metilación de septina 9
- <400> 92
- gtagtagta gtttagtatt tatttt 26
- <210> 93
- <211> 17
- 10 <212> ADN
- <213> Secuencia Artificial
- <220>
- <223> oligonucleótido para análisis de metilación de septina 9
- <400> 93
- 15 cccaccaacc atcatat 17
- <210> 94
- <211> 32
- <212> ADN
- <213> Secuencia Artificial
- 20 <220>
- <223> oligonucleótido para análisis de metilación de septina 9
- <400> 94
- catcatatca aacccccaaa tcaacacaca ac 32
- <210> 95
- 25 <211> 25
- <212> ADN
- <213> Secuencia Artificial
- <220>
- <223> oligonucleótido para análisis de metilación de septina 9
- 30 <400> 95
- gttcgaaatg attttatta gttgc 25

<210> 96
<211> 17
<212> ADN
<213> Secuencia Artificial
5 <220>
<223> oligonucleótido para análisis de metilación de septina 9
<400> 96
cgttgatcgc ggggttc 17
<210> 97
10 <211> 31
<212> ADN
<213> Secuencia Artificial
<220>
<223> 17378-7B3C3
15 <400> 97
ccatcatatc aaaccccaaca atcaacacac a 31
<210> 98
<211> 32
<212> ADN
20 <213> Secuencia Artificial
<220>
<223> 17378-7B5
<400> 98
atcatatcaa accccacaat caacacacaa ct 32
25 <210> 99
<211> 31
<212> ADN
<213> Secuencia Artificial
<220>
30 <223> 17378-7B9
<400> 99

accatcatat caaacccac aatcaacaca c 31

<210> 100

<211> 32

<212> ADN

5 <213> Secuencia Artificial

<220>

<223> 17378-7B10

<400> 100

aaccatcata tcaaaccaca caatcaacac ac 32

10 <210> 101

<211> 31

<212> ADN

<213> Secuencia Artificial

<220>

15 <223> 17378-7B3C3

<400> 101

ccatcatatc aaaccacaca atcaacacac a 31

<210> 102

<211> 24

20 <212> ADN

<213> Secuencia Artificial

<220>

<223> 17378.7PF2

<400> 102

25 gaaatgatt tatttagtg cgcg 24

<210> 103

<211> 15

<212> ADN

<213> Secuencia Artificial

30 <220>

<223> 17378.7PR2

ES 2 570 828 T3

<400> 103

tgatcgcggg gttcg 15

<210> 104

<211> 15

5 <212> ADN

<213> Secuencia Artificial

<220>

<223> 17378.7PF4

<400> 104

10 cccgcatca acgcg 15

<210> 105

<211> 27

<212> ADN

<213> Secuencia Artificial

15 <220>

<223> 17378.7PR4

<400> 105

aactaaataa aatcattcg aactcg 27

Reivindicaciones

1. Un método para análisis de metilación, comprende

5

a) tratar ADN genómico con uno o más reactivos para convertir bases de citosina no metiladas a sulfonato de uracilo o a otra base que tenga un comportamiento de unión diferente de citosina, mientras que la citosina metilada permanece sin cambio;

b) amplificar el ADN tratado por medio de

i) un oligonucleótido que comprende o que consiste de una secuencia definida por la SEQ ID NO: 5 o una variante de la misma con supresión de 5'-terminal y/o 3'-terminal de 1, 2, 3, 4 o 5 nucleótidos; y

10

ii) un oligonucleótido que comprende o que consiste de una secuencia que se define por la SEQ ID NO: 44 o una variante de la misma con supresión de 5'-terminal y/o 3'-terminal de 1, 2, 3, 4 o 5 nucleótidos;

en donde dichos oligonucleótidos son adecuados para uso como cebadores;

c) deducir la presencia o ausencia de metilación de los dinucleótidos CpG amplificados en la etapa b) a partir de los resultados de la etapa b).

15

2. El método de la reivindicación 1, en donde la amplificación de etapa b) de método adicionalmente comprende el uso de

i) por lo menos un oligonucleótido que comprende o que consiste esencialmente de una secuencia seleccionada del grupo que consiste de la SEQ ID NO: 7 y 49-57, en donde dicho uno o más oligonucleótidos son adecuados para uso como bloqueadores;

20

ii) por lo menos un oligonucleótido que comprende o que consiste esencialmente de una secuencia seleccionada del grupo que consiste de la SEQ ID NO: 8 y 58-61, en donde dicho uno o más oligonucleótidos son adecuados para uso como sondas; y

iii) una polimerasa, preferiblemente una polimerasa estable al calor.

3. El método de la reivindicación 2, comprende

25

a) utilizar un oligonucleótido que comprende o que consiste esencialmente de la secuencia de la SEQ ID NO: 7 en el ítem (i); y

b) utilizar un oligonucleótido que comprende o que consiste esencialmente de la secuencia de la SEQ ID NO: 8 en el ítem (ii).

4. Un método para detectar y/o clasificar trastornos proliferativos celulares, que comprenden;

30

a) tratar ADN genómico con uno o más reactivos para convertir bases de citosina no metiladas a sulfonato de uracilo o a otra base que tenga un comportamiento de unión diferente al de la citosina, mientras que la citosina metilada permanece sin cambio ;

b) amplificar el ADN tratado por medio de

35

i) un oligonucleótido que comprende o que consiste de una secuencia que se define por la SEQ ID NO: 5, o variantes de la misma con supresión de 5'-terminal y/o 3'-terminal de 1, 2, 3, 4 o 5 nucleótidos, dicho uno o más oligonucleótidos son adecuados para uso como cebadores; y

ii) un oligonucleótido que comprende o que consiste de una secuencia que se define por la SEQ ID NO: 44 o variantes de la misma con supresión de 5'-terminal y/o 3'-terminal de 1, 2, 3, 4 o 5 nucleótidos; dicho uno o más oligonucleótidos son adecuados para uso como cebadores;

40

c) deducir la presencia o ausencia de metilación de los dinucleótidos CpG amplificados en la etapa b) a partir del resultado de la etapa b), en donde por lo menos se proporciona uno de los trastornos proliferativos celulares de detección y clasificación, por lo menos en parte.

5. El método de la reivindicación 4, en donde la amplificación de etapa b) de método adicionalmente comprende el uso de

5 i) por lo menos un oligonucleótido que comprende o que consiste esencialmente de una secuencia seleccionada del grupo que consiste de la SEQ ID NO: 7 y 49-57, dicho uno o más oligonucleótidos son adecuados para uso como bloqueadores;

ii) por lo menos un oligonucleótido que comprende o que consiste esencialmente de una secuencia seleccionada del grupo que consiste de la SEQ ID NO: 8 y 58-61, dicho uno o más oligonucleótidos son adecuados para uso como sondas; y

iii) una polimerasa, preferiblemente una polimerasa estable al calor.

10 6. Uso de un método de las reivindicaciones 1-3 para

el descubrimiento de un marcador de metilación, en donde el marcador es indicador de eventos adversos para pacientes o individuos, por lo cual estos eventos adversos pertenecen a por lo menos una de las siguientes categorías:

15 interacciones de fármaco no deseadas; enfermedades cancerígenas; trastornos proliferativos celulares; carcinoma de colon; carcinoma de hígado; mal funcionamiento del SNC; lesión o enfermedad; síntomas de agresión o alteraciones del comportamiento; consecuencias de lesiones cerebrales clínicas, psicológicas y sociales; trastornos sicóticos y trastornos de personalidad; demencia y/o síndromes asociados; enfermedad cardiovascular, mal funcionamiento o lesión; mal funcionamiento, lesión o enfermedad del tracto gastrointestinal; mal funcionamiento, lesión o enfermedad del sistema respiratorio; lesión, inflamación, infección, inmunidad y/o convalecencia; mal funcionamiento, lesión o enfermedad del cuerpo como una anomalía del proceso de desarrollo; mal funcionamiento, lesión o enfermedad de la piel, de los músculos, del tejido conectivo de los huesos; mal funcionamiento, lesión o enfermedad endocrina y metabólica; dolores de cabeza o disfunción sexual.

20

Figura 1

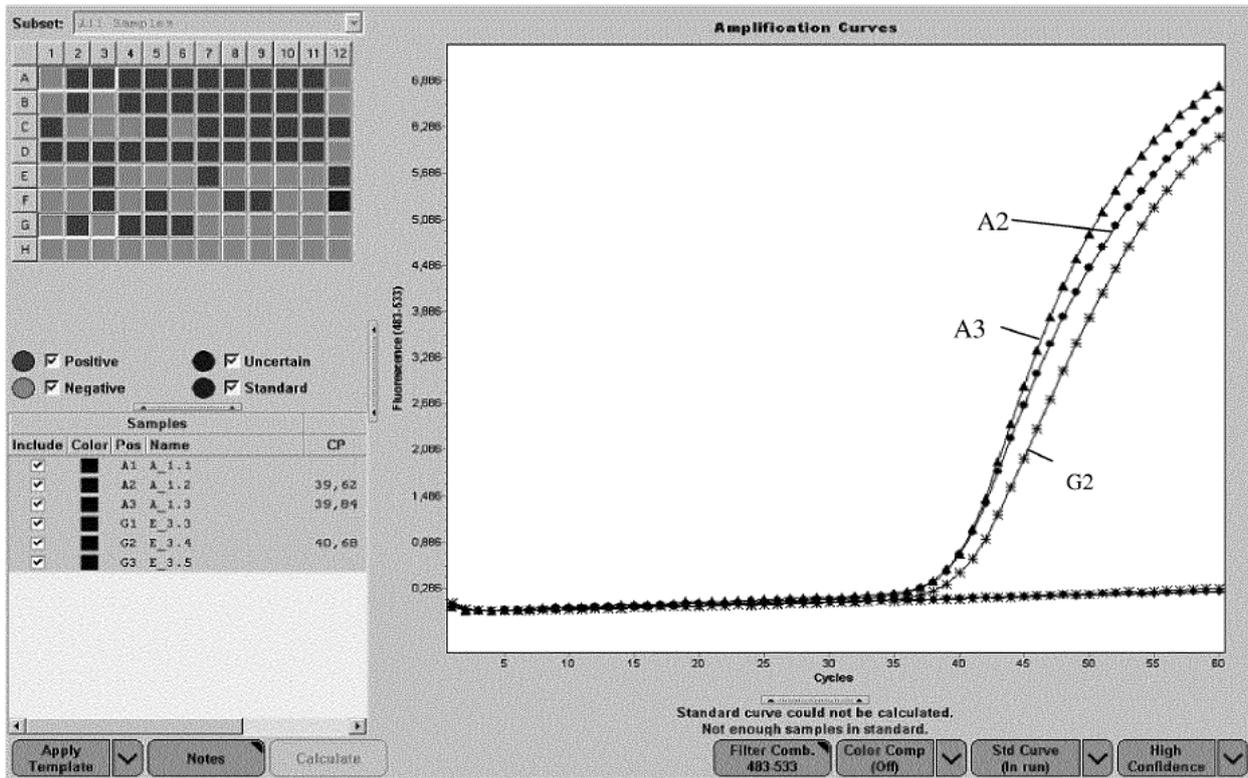


Figura 2

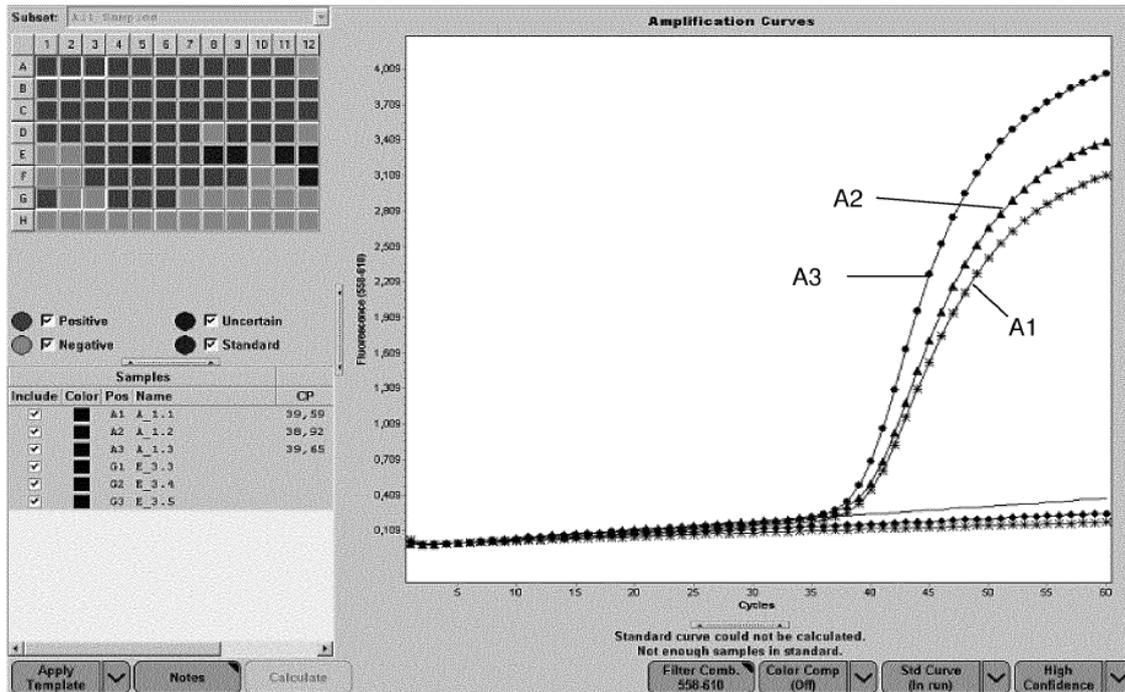


Figura 3

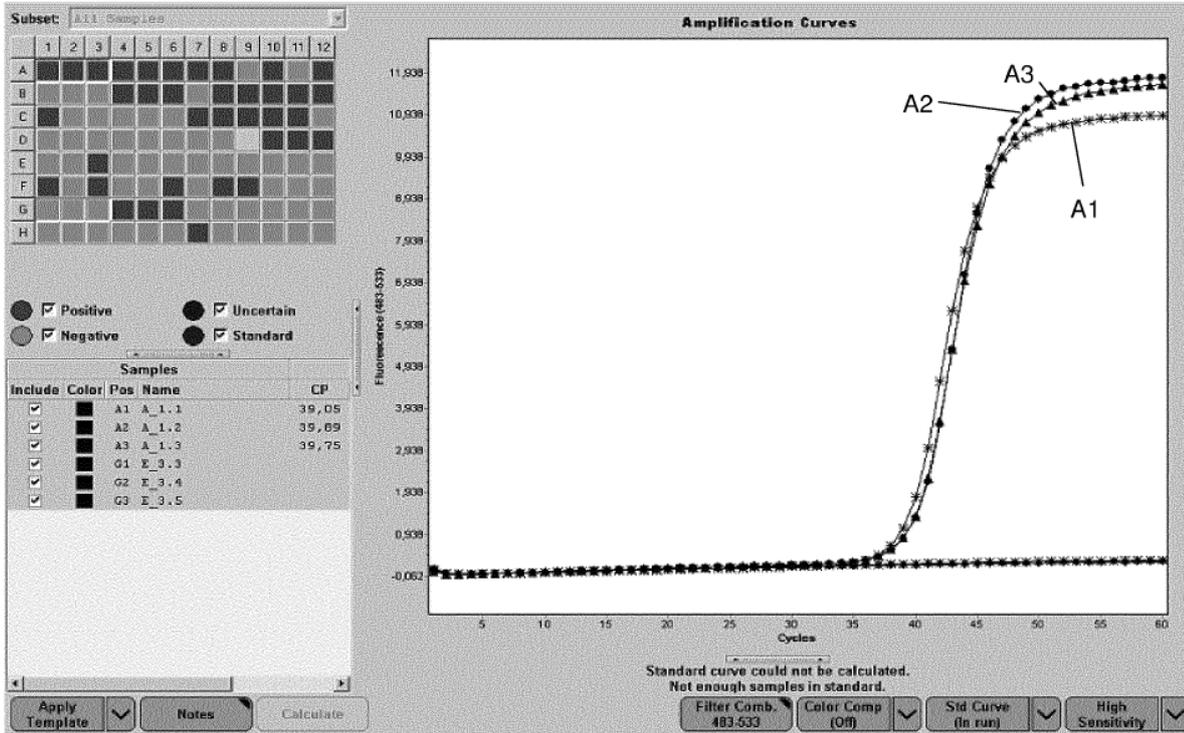


Figura 4

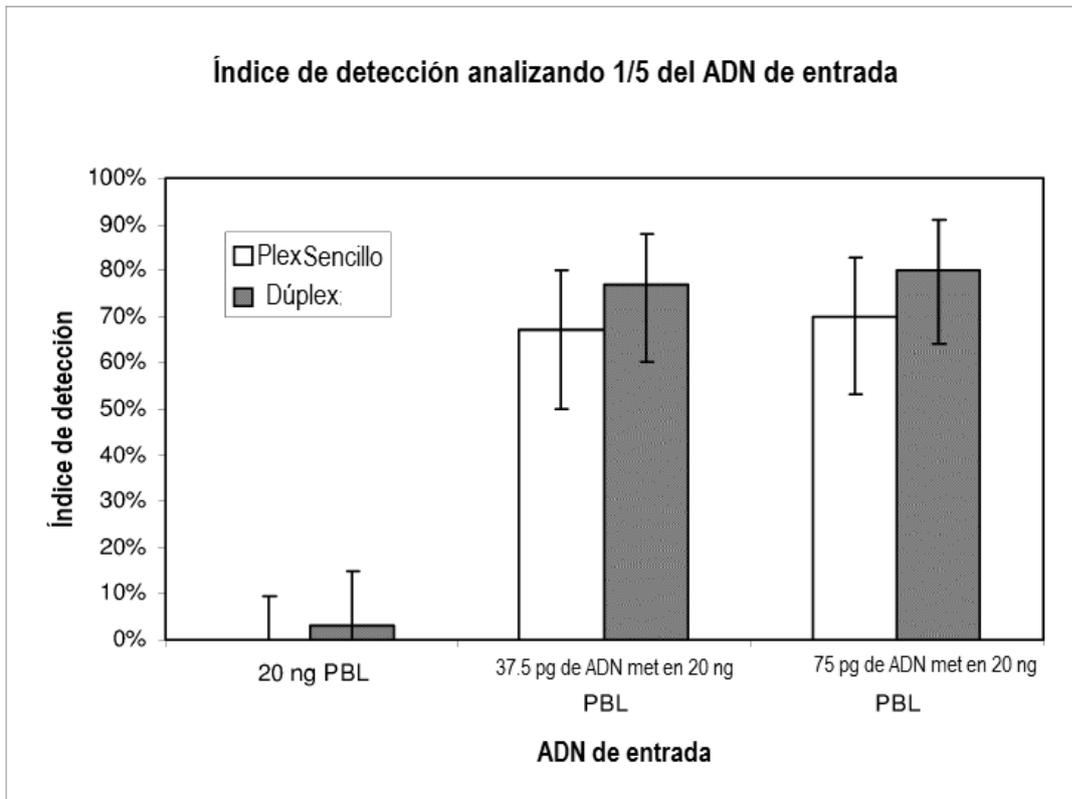


Figura 5

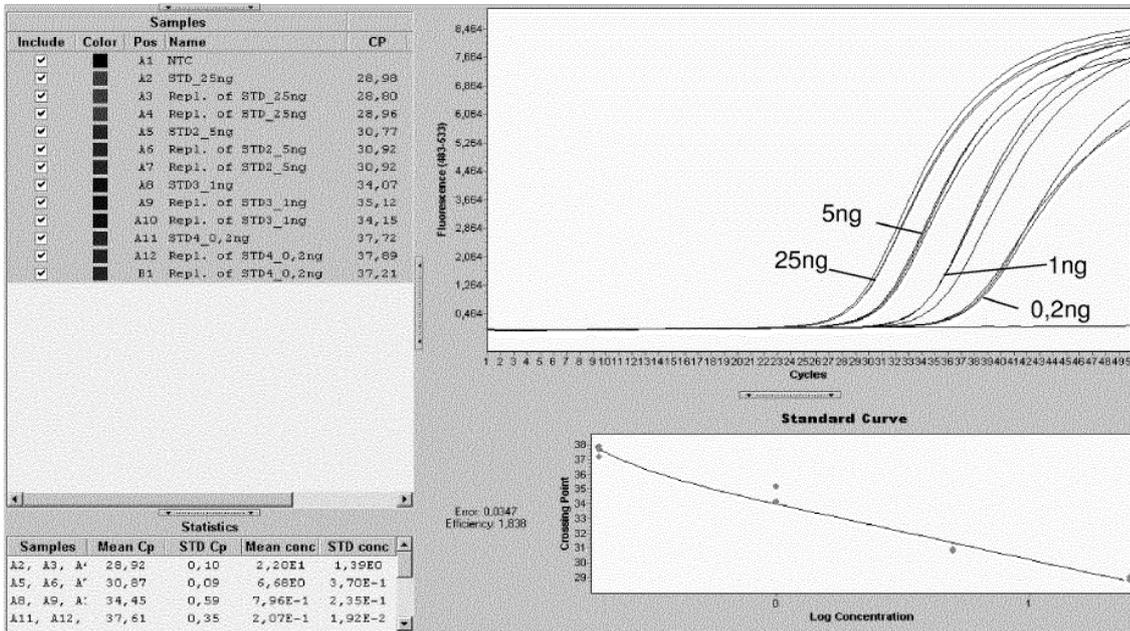


Figura 6

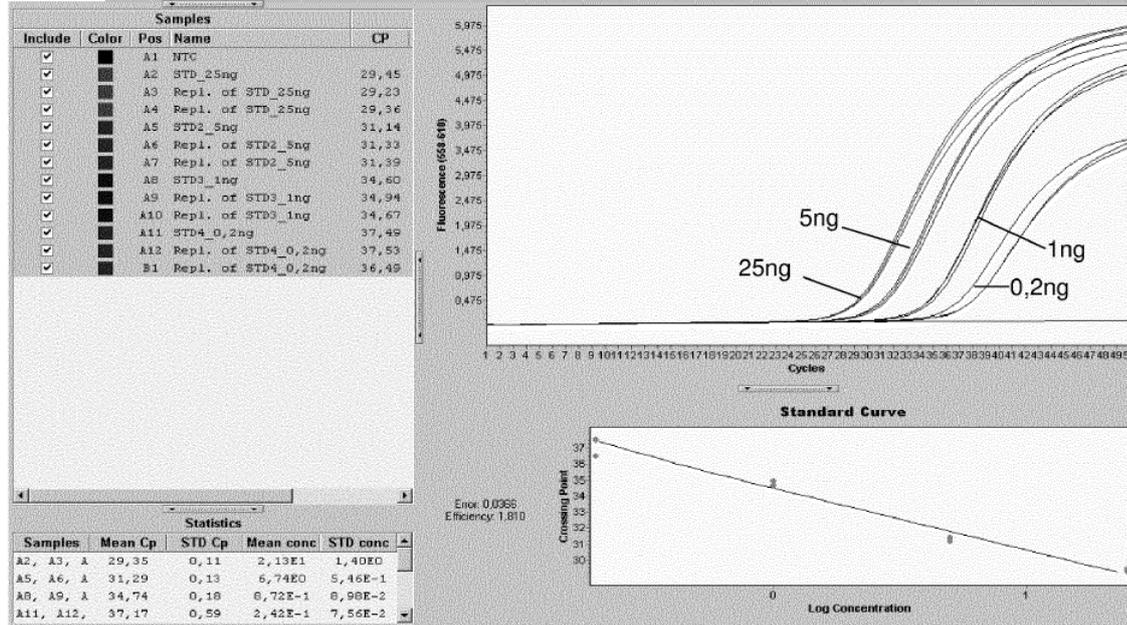


Figura 7

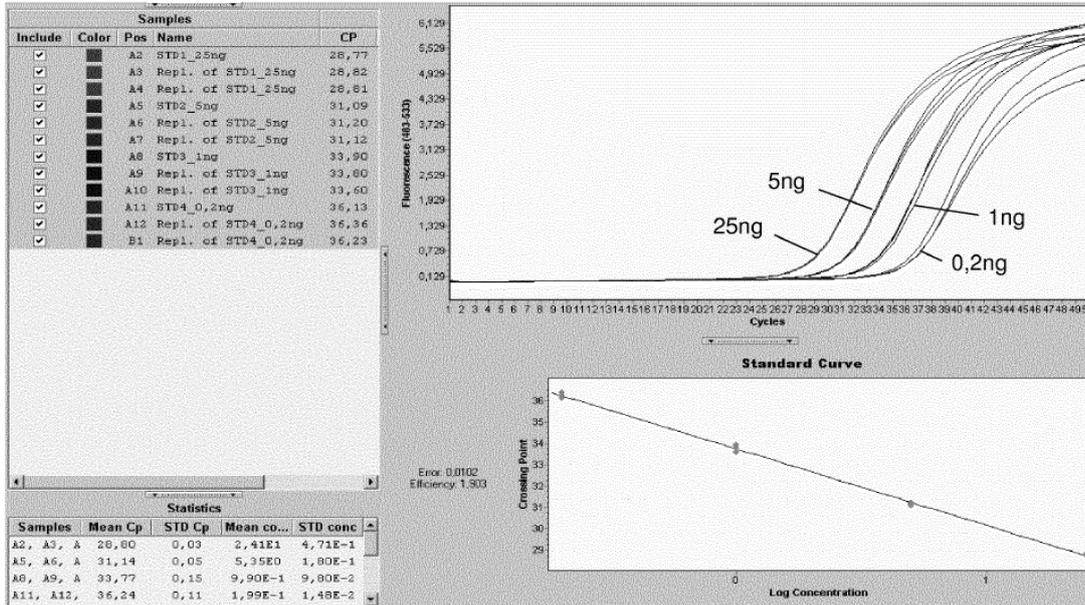


Figura 8

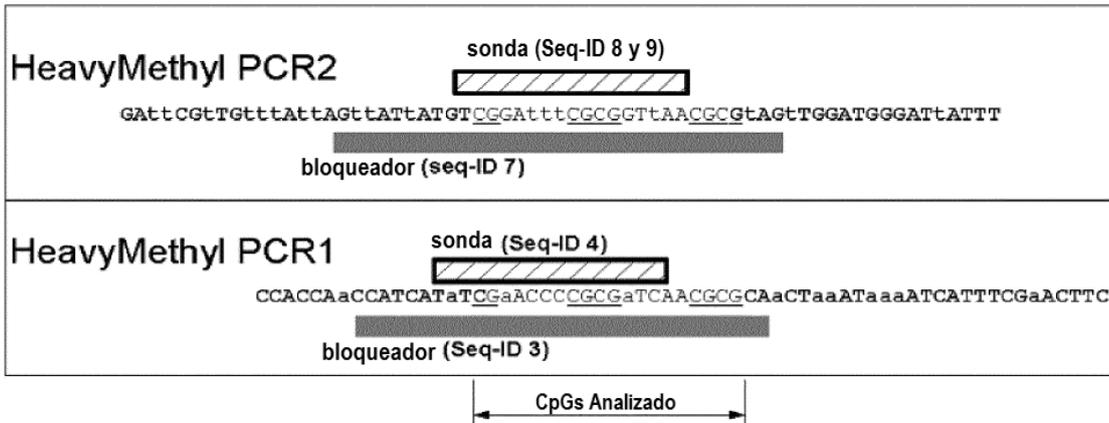


Figura 9

