

19



OFICINA ESPAÑOLA DE
PATENTES Y MARCAS

ESPAÑA



11 Número de publicación: **2 606 703**

51 Int. Cl.:

C12Q 1/68 (2006.01)

12

TRADUCCIÓN DE PATENTE EUROPEA

T3

96 Fecha de presentación y número de la solicitud europea: **15.07.2009** E 13179002 (4)

97 Fecha y número de publicación de la concesión europea: **14.09.2016** EP 2660337

54 Título: **Método para predecir el pronóstico de una terapia de cáncer de mama con base en el análisis de metilación del gen**

30 Prioridad:

15.07.2008 EP 08160382

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

27.03.2017

73 Titular/es:

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

72 Inventor/es:

**DIETRICH, DIMO;
LESCHE, RALF;
FASSBENDER, ANNE;
KRISPIN, MANUEL y
DIETRICH, JÖRN**

74 Agente/Representante:

SÁEZ MAESO, Ana

Observaciones :

Véase nota informativa (Remarks, Remarques o Bemerkungen) en el folleto original publicado por la Oficina Europea de Patentes

ES 2 606 703 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 para predecir el pronóstico de una terapia de cáncer de mama con base en el análisis de metilación del gen

Campo de la invención

5 La presente invención se relaciona con marcadores de ADN genómicos útiles en la determinación del pronóstico de un sujeto que tiene trastorno proliferativo celular, preferiblemente cáncer, subsecuente a una terapia. Realizaciones particulares proveen métodos, ácidos nucleicos, arreglos de ácido nucleico y kits útiles para la determinación del pronóstico de un sujeto que tiene un trastorno proliferativo celular subsecuente a una terapia.

Antecedentes

10 Las antraciclinas son un gran grupo de compuestos sintetizados por diferentes especies de *Streptomyces*. Poseen actividad antibiótica y tienen efectos citotóxicos sobre las células eucariotas. Todas las antraciclinas tienen una estructura de anillo tetrahidronaftacenosidona unido por un enlace glicosídico a una molécula de azúcar, la diversidad estructural de las antraciclinas se genera por modificaciones del esqueleto que incluyen un gran número de diferentes cadenas laterales.

15 Las antraciclinas tienen excelente actividad antineoplásica en configuración metastásicas, neoadyuvantes, y de adyuvantes y se utilizan en el tratamiento de diversos tumores hematopoyéticos y sólidos. Comúnmente las antraciclinas utilizadas incluyen, pero no se limitan a mitoxantrona, doxorubicina, aclarrubicina, daunorrubicina, epirubicina e idarrubicina. Aunque su mecanismo de acción quimioterapéutica no está claro involucra intercalación no covalente de ADN, formación de aductos de ADN covalentes, envenenamiento de topoisomerasa II (topo II), y los efectos de radicales libres en las membranas celulares y el ADN. Sin embargo, la utilidad clínica de las antraciclinas es limitada debido a la toxicidad aguda y crónica, particularmente cardiotoxicidad, mielosupresión, náuseas y vómitos, y alopecia.

20 El fallo cardíaco después de la terapia con antraciclina es un problema clínico importante en el tratamiento del cáncer. Aunque se conocen métodos para el pronóstico y/o la predicción del resultado del tratamiento con el tratamiento con antraciclina de pacientes con trastorno proliferativo celular (WO 2007/085497A2) el establecimiento de predictores del resultado del tratamiento con antraciclina permitiría la identificación y la exclusión de individuos que no se beneficiarían de dicho tratamiento, y así incrementar la seguridad del tratamiento con antraciclina. Adicionalmente determinando qué pacientes se beneficiarían del tratamiento con antraciclina, pero en el que dicho resultado predicho es subóptimo los pacientes puede ser recomendados para tratamientos quimioterapéuticos adicionales u otros tratamientos. Por el contrario, determinando qué pacientes se pueden tratar adecuadamente con un tratamiento solo con antraciclinas, se puede prevenir el sobretratamiento de los pacientes.

Resumen de la invención

La invención se define en las reivindicaciones adjuntas.

35 La presente divulgación se relaciona con un método para determinar el pronóstico de un sujeto que tiene trastorno proliferativo celular, preferiblemente cáncer, subsecuente a una terapia, en un sujeto que comprende la determinación de los niveles de expresión de al menos un gen seleccionado del grupo que consiste de CDO1; APC; BMPR1A; CTAGE5; CXCL12; NCR1; NFATC2; PAX9; POU4F3; ZBTB16 en una muestra biológica aislada de dicho sujeto, en el que la metilación y/o estado de expresión es indicativo del pronóstico de dicho sujeto. Dicho método es particularmente adecuado para determinar el pronóstico de dicho sujeto subsecuente a una terapia que comprende al menos una antraciclina. Diversos aspectos de la presente divulgación se relacionan con los marcadores genéticos, por lo que el análisis de expresión de dicho marcador permite la determinación del pronóstico de un sujeto que tiene trastorno proliferativo celular, preferiblemente cáncer. El método de acuerdo con la divulgación se puede usar para el análisis de una amplia variedad de trastornos proliferativos celulares adecuados para el tratamiento con antraciclinas, incluyendo, pero no limitado a, cáncer de mama, cáncer de ovario, cáncer de vejiga de células transicionales, cáncer de pulmón broncogénico, cáncer de tiroides, cáncer de páncreas, cáncer de próstata, 45 cáncer de útero, cáncer testicular, cáncer gástrico, de tejidos blandos y sarcomas osteogénicos, neuroblastoma, tumor de Wilms, linfoma maligno, (de Hodgkin y no Hodgkin), leucemia mieloblástica aguda, leucemia linfoblástica aguda, sarcoma de Kaposi, tumor de Ewing, mieloma múltiple refractario, carcinomas de células escamosas de la cabeza, el cuello, la cervix uterino y la vagina.

50 El método de acuerdo con la divulgación puede ser utilizado para proveer una predicción de la supervivencia del paciente y/o la recaída después del tratamiento por medio de una terapia que comprende al menos una antraciclina.

En una realización, la divulgación se relaciona con un método para determinar el pronóstico de dicho sujeto que comprende determinar los niveles de expresión de al menos un gen seleccionado del grupo que consiste de CDO1; APC; BMPR1A; CTAGE5; CXCL12; NCR1; NFATC2; PAX9; POU4F3; ZBTB16 en una muestra biológica aislada de dicho sujeto, en el que la sub expresión y/o la metilación de CpG es indicativo del pronóstico de dicho sujeto. En una

realización, dicho pronóstico es el pronóstico del sujeto subsecuente a una terapia que comprende al menos una antraciclina. En una realización, dicho nivel de expresión se determina detectando la presencia, ausencia o nivel de ARNm transcrito a partir de dicho gen. En una realización adicional, dicho nivel de expresión se determina detectando la presencia, ausencia o nivel de un polipéptido codificado por dicho gen o secuencia del mismo.

- 5 En una realización preferida adicional, dicha expresión se determina detectando la presencia, ausencia o cantidad de metilación de CpG dentro de dicho gen, y de deducir el pronóstico de dicho sujeto que tiene el trastorno proliferativo celular, preferiblemente cáncer.

Dicho método comprende las siguientes etapas: i) poner en contacto el ADN genómico aislado de una muestra biológica (preferiblemente seleccionado del grupo que consiste de líneas celulares, cortes histológicos, tejidos embebidos en parafina, biopsias, tejido embebido en parafina, fluidos corporales (tales como, pero no limitados a aspirar pezón y la sangre) y todas las posibles combinaciones de los mismos) obtenidos del sujeto con al menos un reactivo, o serie de reactivos que distinguen entre los dinucleótidos CpG metilados y no metilados dentro de al menos una región objetivo del ADN genómico, en donde la secuencia de nucleótido de dicha región objetivo comprende al menos una secuencia de dinucleótido CpG de al menos un gen seleccionado del grupo que consiste de CDO1; APC; BMPR1A; CTAGE5; CXCL12; NCR1; NFATC2; PAX9; POU4F3; y ZBTB16 y ii) determinar el pronóstico de un sujeto que tiene trastorno proliferativo celular, preferiblemente cáncer. Preferiblemente, la región objetivo comprende, o se hibrida bajo condiciones rigurosas a una secuencia de al menos 16 nucleótidos contiguos de SEQ ID NO: 1-10, o regiones preferidas de las mismas de acuerdo con SEQ ID NO: 11-20. En una realización, dicho pronóstico es el pronóstico del sujeto subsecuente a una terapia que comprende al menos una antraciclina.

20 Dicho uso del gen se puede habilitar por medio de cualquier análisis de la expresión del gen, por medio de análisis de la expresión del ARNm o análisis de la expresión de proteínas. Sin embargo, en la realización más preferida de la divulgación la determinación del pronóstico de un sujeto que tiene trastorno proliferativo celular, preferiblemente cáncer, se habilita por medio del análisis del estado de metilación de al menos un gen seleccionado del grupo que consiste de CDO1; APC; BMPR1A; CTAGE5; CXCL12; NCR1; NFATC2; PAX9; POU4F3; y ZBTB16, y/o elementos promotores o reguladores de los mismos.

La divulgación se relaciona con un método para el análisis de muestras biológicas para detectar características asociadas con la progresión del trastorno proliferativo celular, preferiblemente cáncer, el método caracterizado porque el ácido nucleico, o un fragmento del mismo de la SEQ ID NO: 1-10, o regiones preferidas de los mismos de acuerdo con SEQ ID NO: 11-20 se pone en contacto con un reactivo o una serie de reactivos capaces de distinguir entre los dinucleótidos CpG metilados y no metilados dentro de la secuencia genómica.

La presente divulgación se relaciona con un método para establecer parámetros epigenéticos de ADN genómico asociados con el desarrollo de trastorno proliferativo celular, preferiblemente cáncer.

Preferiblemente, la fuente de la muestra de prueba se selecciona del grupo que consiste de líneas celulares, cortes histológicos, tejidos embebidos en parafina, biopsias, tejido embebido en parafina, fluidos corporales (tales como, pero no limitados a aspirado de pezón y sangre) y todas las combinaciones posibles de los mismos y combinaciones de los mismos.

Específicamente, la presente divulgación se relaciona con un método para determinar el pronóstico de un sujeto que tiene trastorno proliferativo celular, preferiblemente cáncer, posterior a una terapia, adecuado para uso como un pronóstico y/o herramienta de predicción, que comprende: obtener una muestra biológica que comprende ácidos nucleicos genómicos; que ponen en contacto los ácidos nucleicos, o un fragmento de los mismos, con un reactivo o una pluralidad de reactivos suficientes para distinguir entre las secuencias de dinucleótidos CpG metilados y no metilados dentro de una secuencia objetivo del ácido nucleico del sujeto, en donde la secuencia objetivo comprende, o se hibrida bajo condiciones rigurosas a, una secuencia que comprende al menos 16 nucleótidos contiguos de SEQ ID NO: 1-10, o regiones preferidas de las mismas de acuerdo con SEQ ID NO: 11-20 dichos nucleótidos contiguos que comprenden al menos una secuencia de dinucleótido CpG; y determinar, con base al menos en parte sobre dicha distinción, el estado de metilación de al menos una secuencia de dinucleótido CpG objetivo, o un promedio, o un valor que refleja un estado promedio de metilación de una pluralidad de secuencias de dinucleótidos CpG objetivo. En una realización preferida, dicho pronóstico es el pronóstico del sujeto posterior a una terapia que comprende al menos una antraciclina.

50 Preferiblemente, distinguiendo entre las secuencias de dinucleótidos CpG metilados y no metilados dentro de la secuencia objetivo comprende la conversión o no conversión dependiente del estado de metilación de al menos una de tales secuencias de dinucleótidos CpG de la correspondiente secuencia de dinucleótidos convertida o no convertida dentro de una secuencia seleccionada del grupo que consiste de SEQ ID NO: 21-40 y 61-80 o regiones preferidas de las mismas de acuerdo con SEQ ID NO: 41-60 y 81-100, y las regiones contiguas de los mismos correspondientes a la secuencia objetivo.

Las realizaciones adicionales proveen un método para la determinación del pronóstico de un sujeto que tiene trastorno proliferativo celular, preferiblemente cáncer, posterior a una terapia, que comprende: obtener una muestra

biológica que tiene ADN genómico del sujeto; extraer el ADN genómico; tratar el ADN genómico, o un fragmento del mismo, con uno o más reactivos para convertir las bases de citosina no metiladas de la posición 5 en uracilo o en otra base que sea detectablemente diferente a la citosina en términos de propiedades de hibridación; poner en contacto el ADN genómico tratado, o el fragmento tratado del mismo, con una enzima de amplificación y al menos dos cebadores que comprenden, en cada caso una secuencia contigua de al menos 9 nucleótidos de longitud que es complementaria a, o se hibrida bajo condiciones moderadamente rigurosas o rigurosas a una secuencia seleccionada del grupo que consiste de SEQ ID NO: 21-40 y 61-80 o regiones preferidas de las mismas de acuerdo con SEQ ID NO: 41-60 y 81-100, y complementos de las mismas, en el que el ADN tratado o el fragmento del mismo, o bien es amplificado para producir un amplificado, o no se amplifica; y determinar, sobre la base de una presencia, ausencia o la clase de, o en una propiedad de dicho amplificado, el estado de metilación o un promedio, o un valor que refleja un promedio del nivel de metilación de al menos uno, pero más preferiblemente una pluralidad de dinucleótidos CpG de SEQ ID NO: 1-10, o regiones preferidas de las mismas de acuerdo con SEQ ID NO: 11-20.

Preferiblemente, la determinación comprende el uso de al menos un método seleccionado del grupo que consiste de: i) hibridar al menos una molécula de ácido nucleico que comprende una secuencia contigua de al menos 9 nucleótidos de longitud que es complementaria a, o se hibrida bajo condiciones moderadamente rigurosas o rigurosas a una secuencia seleccionada del grupo que consiste de SEQ ID NO: 21-40 y 61-80 o regiones preferidas de las mismas de acuerdo con SEQ ID NO: 41-60 y 81-100, y complementos de las mismas; ii) hibridar al menos una molécula de ácido nucleico, unida a una fase sólida, que comprende una secuencia contigua de al menos 9 nucleótidos de longitud que es complementaria a, o se hibrida bajo condiciones moderadamente rigurosas o rigurosas a una secuencia seleccionada del grupo que consiste de SEQ ID NO: 21-40 y 61-80 o regiones preferidas de las mismas de acuerdo con SEQ ID NO: 41-60 y 81-100, y complementos de las mismas; iii) hibridar al menos una molécula de ácido nucleico que comprende una secuencia contigua de al menos 9 nucleótidos de longitud que es complementaria a, o se hibrida bajo condiciones moderadamente rigurosas o rigurosas a una secuencia seleccionada del grupo que consiste de SEQ ID NO: 21-40 y 61-80 o regiones preferidas de las mismas de acuerdo con SEQ ID NO: 41-60 y 81-100, y complementos de las mismas, y que extiende al menos una de tales moléculas de ácido nucleico hibridado por al menos una base de nucleótido; y iv) la secuenciación del amplificado.

Realizaciones adicionales proveen un método para el análisis (esto es, la determinación de progresión de la enfermedad y/o pronóstico del paciente) de un trastorno proliferativo celular, preferiblemente cáncer, posterior a una terapia, que comprende: obtener una muestra biológica que tiene ADN genómico del sujeto; extraer el ADN genómico; poner en contacto el ADN genómico, o un fragmento del mismo, que comprende una o más secuencias seleccionadas del grupo que consiste de SEQ ID NO: 1-10, o regiones preferidas de las mismas de acuerdo con SEQ ID NO: 11-20 o una secuencia que se hibrida bajo condiciones rigurosas a la misma, con una o más enzimas de restricción sensibles a la metilación, en donde el ADN genómico se digiere ya sea de ese modo para producir fragmentos de digestión, o no se digiere de esta manera; y determinar, sobre la base de una presencia, ausencia o la clase de, o en la propiedad de al menos un fragmento tal, el estado de metilación de al menos una secuencia de dinucleótido CpG de la SEQ ID NO: 1-10, o regiones preferidas de las mismas de acuerdo con SEQ ID NO: 11-20 o un promedio, o un valor que refleja un estado promedio de metilación de una pluralidad de secuencias de dinucleótidos CpG de los mismos. Preferiblemente, el ADN genómico digerido o no digerido se amplifica antes de dicha determinación.

Las realizaciones adicionales proveen nuevas secuencias genómicas y químicamente modificados de ácidos nucleicos, así como los oligonucleótidos y/o PNA-oligómeros para el análisis de los patrones de metilación de citosina dentro de la SEQ ID NO: 1-10, o regiones preferidas de las mismas de acuerdo con SEQ ID NO: 11-20 .

Descripción detallada de la invención

Definiciones:

El término "pronóstico" tal como se utiliza aquí se relaciona con una predicción del curso de una enfermedad que es de esperarse sin la aplicación de cualquier tratamiento o intervención, mientras que dicho curso de la enfermedad incluye la probabilidad de progresión de la enfermedad, en particular, su agresividad y potencial metastásico en caso de que la enfermedad sea un tumor maligno.

El término "predicción" tal como se utiliza aquí se refiere a la probabilidad de que un paciente que sufre de una enfermedad para responder a un tratamiento o una intervención dirigida contra dicha enfermedad. De esta manera, dicha respuesta se define preferiblemente de acuerdo con la supervivencia del paciente. El término "predicción" se usa preferiblemente para definir pacientes con longitud alta, baja e intermedia de la supervivencia o recurrencia después del tratamiento.

El término "Relación de Observado/Esperado" ("relación O/E") se refiere a la frecuencia de dinucleótidos CpG dentro de una secuencia de ADN particular, y corresponde al [número de sitios de CpG/(número de bases C x número de bases G)]/longitud de banda para cada fragmento.

El término "isla CpG" se relaciona con una región contigua de ADN genómico que satisface los criterios de (1) que tiene una frecuencia de dinucleótidos CpG que corresponde a un "Relación de Observado/Esperado" > 0.6, y (2) que tiene un "contenido GC" > 0.5. Las islas CpG están típicamente, pero no siempre, entre aproximadamente 0.2 a aproximadamente 1 KB, o a aproximadamente 2 kb de longitud.

5 El término "estado de metilación" o "estatus de metilación" se refiere a la presencia, ausencia o clase de 5-metilcitosina ("5-mCyt") en uno o una pluralidad de dinucleótidos CpG dentro de una secuencia de ADN. Los estados de metilación en uno o más sitios de metilación CpG particulares (que tienen cada uno dos secuencias de dinucleótidos CpG) dentro de una secuencia de ADN incluyen "no metilado", "totalmente metilado-" y "hemi-metilado".

10 El término "hemi-metilación" o "hemimetilación" se refiere al estado de metilación de un ADN de doble cadena en donde solamente una de las cadenas de los mismos está metilado.

15 El término "AUC" tal como se utiliza aquí es una abreviatura para el área bajo una curva. En particular, se refiere al área bajo una curva de Características de Funcionamiento del Receptor (ROC). La curva ROC es una representación de la verdadera tasa positiva contra la tasa de falsos positivos para los diferentes puntos de corte posibles de una prueba diagnóstica. Se muestra el compromiso entre la sensibilidad y la especificidad dependiendo del punto de corte seleccionado (cualquier incremento en la sensibilidad vendrá acompañado por una disminución en la especificidad). El área bajo una curva ROC (AUC) es una medida de la exactitud de una prueba (cuanto mayor sea el área mejor, óptimo es 1, una prueba aleatoria tendría una curva ROC que cae en la diagonal con un área de 0.5; para referencia Teoría JP Egan Signal Detection Theory and ROC Analysis, Academic Press, New York, 1975).

20 El término "microarreglo" se refiere ampliamente tanto a "microarreglos de ADN", y "chip(s) de ADN", como se reconoce en la técnica, abarca todos los soportes sólidos reconocidos en la técnica, y abarca todos los métodos para la colocación de moléculas de ácido nucleico para el mismo o síntesis de ácidos nucleicos sobre el mismo.

25 "Los parámetros genéticos" son mutaciones y polimorfismos de genes y secuencias requeridas además para su regulación. Para ser designadas como mutaciones son, en particular, inserciones, deleciones, mutaciones puntuales, inversiones y polimorfismos y, particularmente preferida, los SNP (polimorfismos de nucleótido individual).

"Parámetros epigenéticos" son, en particular, metilación de citosina. Parámetros epigenéticos adicionales incluyen, por ejemplo, la acetilación de histonas que, sin embargo, no se pueden analizar directamente usando el método descrito pero que, a su vez, se correlacionan con la metilación del ADN.

30 El término "reactivo de bisulfito" se relaciona con un reactivo que comprende bisulfito, disulfito, sulfito de hidrógeno o combinaciones de los mismos, útiles como se describe aquí para distinguir entre las secuencias de dinucleótidos CpG metiladas y no metiladas.

El término "ensayo de metilación" se refiere a cualquier ensayo para la determinación del estado de metilación de una o más secuencias de dinucleótidos CpG dentro de una secuencia de ADN.

35 El término "MS.AP-PCR" (Reacción en Cadena de la Polimerasa Cebada Arbitrariamente Sensible a la metilación) se refiere a la tecnología reconocida en la técnica que permite una exploración global del genoma usando cebadores ricos en CG para centrarse en las regiones con mayor probabilidad de contener dinucleótidos CpG, y descrita por Gonzalgo et al, Cancer Research 57: 594-599, 1997.

El término "MethyLight™" se refiere al a la técnica de PCR en tiempo real basada en la fluorescencia reconocida en la técnica descrita por Eads et al., Cancer Res. 59: 2302-2306, 1999.

40 El término ensayo de "HeavyMethyl™", en la realización del mismo implementado aquí, se relaciona con un ensayo, en donde las sondas de bloqueo específicas de metilación (también denominado aquí como bloqueadores) que cubren las posiciones de CpG entre, o cubiertas por los cebadores de amplificación permiten la amplificación selectiva específica de metilación de una muestra de ácido nucleico.

45 El término ensayo de "HeavyMethyl™ MethyLight™", en la realización del mismo implementado aquí, se relaciona con un ensayo HeavyMethyl™ MethyLight™, que es una variación del ensayo MethyLight™, en donde el ensayo de MethyLight™ se combina con las sondas de bloqueo específicas de metilación que cubren posiciones CpG entre los cebadores de amplificación.

El término "Ms-SNuPE" (Extensión por Cebador de Nucleótido Individual Sensible a Metilación) se refiere al ensayo reconocido en la técnica descrito por Gonzalgo and Jones, Nucleic Acids Res. 25: 2529-2531, 1997.

50 El término "MSP" (PCR específico para metilación) se refiere al ensayo de metilación reconocido en la técnica descrito por Herman et al. Proc. Natl. Acad. Sci. USA 93:9821-9826, 1996, y por la patente US No. 5,786,146.

El término "COBRA" (Análisis Combinado de Restricción con Bisulfito) se refiere al ensayo de metilación reconocido en la técnica descrito por Xiong and Laird, *Nucleic Acids Res.* 25:2532-2534, 1997.

El término "MCA" (Amplificación de Aislado de CpG Metilado) se refiere al ensayo de metilación descrito por Toyota et al., *Cancer Res.* 59: 2307-12, 1999 y en el documento WO 00/26401.

5 El término "hibridación" ha de entenderse como un enlace de un oligonucleótido con una secuencia complementaria a lo largo de las líneas de los emparejamientos de bases de Watson-Crick en el ADN de muestra, formando una estructura dúplex.

"Condiciones de hibridación rigurosas", tal como se definen aquí, involucran la hibridación a 68°C en solución de Denhardt 5 x SSC/5 x /1.0% SDS, y lavado en 0.2 xSSC/0.1% SDS a temperatura ambiente, o involucra las equivalentes reconocidas en la técnica de la misma (por ejemplo, condiciones en las que una hibridación se lleva a cabo a 60°C en 2.5 x SSC de regulador, seguido por varias etapas de lavado a 37°C en una concentración baja de regulador, y permanece estable). Las condiciones moderadamente rigurosas, como se define aquí, involucran incluyendo el lavado en 3xSSC a 42°C, o lo equivalente reconocido en la técnica de las mismas. Los parámetros de concentración de sal y la temperatura se pueden variar para alcanzar el nivel óptimo de identidad entre la sonda y el ácido nucleico objetivo. La orientación con respecto a tales condiciones está disponible en la técnica, por ejemplo, por Sambrook et al., 1989, *Molecular Cloning, A Laboratory Manual*, Cold Spring Harbor Press, N.Y.; and Ausubel et al. (eds.), 1995, *Current Protocols in Molecular Biology*, (John Wiley and Sons, N.Y.) en las Unidad 2.10

Los términos "Enzimas de restricción específicas de la metilación" o "enzimas de restricción sensibles a la metilación" deberán interpretarse únicamente como una enzima que digiere selectivamente un ácido nucleico dependiente del estado de metilación de su sitio de reconocimiento. En el caso de tales enzimas de restricción que cortan específicamente si el sitio de reconocimiento no está metilado o hemimetilado, el corte no se llevará a cabo, o con una eficiencia significativamente reducida, si el sitio de reconocimiento está metilado. En el caso de tales enzimas de restricción que cortan específicamente si el sitio de reconocimiento está metilado, el corte no se llevará a cabo, o con una eficiencia significativamente reducida si el sitio de reconocimiento no está metilado. Se prefieren las enzimas de restricción específicas de la metilación, la secuencia de reconocimiento de las cuales contiene un dinucleótido CG (por ejemplo cgcg o cccggg). Se prefieren además para algunas realizaciones enzimas de restricción que no cortan si la citosina en este dinucleótido es metilado en el átomo C5 de carbono.

"Enzimas de restricción no específicas de metilación" o "enzimas de restricción no sensibles a la metilación" son enzimas de restricción que cortan una secuencia de ácido nucleico con independencia del estado de metilación con eficiencia casi idéntica. También se les llama "enzimas de restricción inespecíficas a la metilación".

En referencia a las secuencias del arreglo de material compuesto, la expresión "nucleótidos contiguos" se refieren a una región de secuencia contigua de cualquier secuencia contigua individual del arreglo compuesto, pero no incluye una región de la secuencia de arreglo compuesta que incluya un "nodo", como se define aquí más arriba.

El término "al menos un gen seleccionado del grupo que consiste de CDO1; APC; BMPR1A; CTAGE5; CXCL12; NCR1; NFATC2; PAX9; POU4F3; y ZBTB16" se considera que incluye todas las variantes transcritas de los mismos y todos los promotores y elementos reguladores de los mismos. Adicionalmente puesto que una pluralidad de SNPs son conocidos dentro de dicho gen se entiende que el término incluye todas las variantes de secuencia de los mismos.

Visión general:

40 La presente divulgación se relaciona con un método para determinar el pronóstico de un sujeto que tiene trastorno proliferativo celular, preferiblemente cáncer, posterior a una terapia, que comprende la determinación de los niveles de metilación y/o de expresión de al menos un gen seleccionado del grupo que consiste de CDO1; APC; BMPR1A; CTAGE5; CXCL12; NCR1; NFATC2; PAX9; POU4F3; y ZBTB16 en una muestra biológica aislada de dicho sujeto, en el que la metilación y/o estatus de expresión es indicativo del pronóstico de dicho sujeto que tiene trastorno proliferativo celular, preferiblemente cáncer. En una realización, dicho pronóstico es el pronóstico del sujeto posterior a una terapia que comprende al menos una antraciclina.

Además de las realizaciones anteriores en donde el análisis de metilación de al menos un gen seleccionado del grupo que consiste de CDO1; APC; BMPR1A; CTAGE5; CXCL12; NCR1; NFATC2; PAX9; POU4F3; y ZBTB16 es analizado, la divulgación presenta paneles adicionales de genes que comprenden al menos un gen seleccionado del grupo que consiste de CDO1; APC; BMPR1A; CTAGE5; CXCL12; NCR1; NFATC2; PAX9; POU4F3; y ZBTB16 con utilidad novedosa para la determinación del pronóstico de un sujeto que tiene trastorno proliferativo celular, preferiblemente cáncer.

La modificación con bisulfito del ADN es una herramienta reconocida en la técnica utilizada para evaluar el estatus de metilación de CpG. El método más frecuentemente utilizado para el análisis de ADN para la presencia de 5-metilcitosina se basa en la reacción de bisulfito con citosina por el que, tras la hidrólisis alcalina subsecuente, la

citosina se convierte en uracilo que corresponde a timina en su comportamiento de apareamiento de bases. Significativamente, sin embargo, 5-metilcitosina permanece sin modificar bajo estas condiciones. Consecuentemente, el ADN original se convierte de tal manera que la metilcitosina, que originalmente no podía distinguirse de la citosina por su comportamiento de hibridación, ahora se puede detectar como la única citosina que queda usando técnicas estándar reconocidas en la técnica de biología molecular, por ejemplo, por amplificación e hibridación, o por secuenciación. Todas estas técnicas se basan en las propiedades de apareamiento de bases diferenciales, que ahora pueden ser totalmente explotadas.

Una visión general de los métodos reconocidos en la técnica para la detección de 5-metilcitosina es provista por Rein, T., et al, *Nucleic Acids Res.*, 26:2255, 1998.

La técnica de bisulfito, salvo algunas excepciones (por ejemplo, Zeschnigk M, et al., *Eur J Hum Genet.* 5:94-98, 1997), sólo se usa actualmente en investigación. En general, fragmentos específicos cortos de un gen conocido son amplificados subsecuente a un tratamiento con bisulfito, y, o bien completamente secuenciados (Olek and Walter, *Nat Genet.* 1997 17:275-6, 1997), sometidos a una o más reacciones de extensión de cebador (Gonzalzo and Jones, *Nucleic Acids Res.*, 25:2529-31, 1997; WO 95/00669; patente U.S. No. 6,251,594) para analizar las posiciones de citosina individuales, o tratadas por digestión enzimática (Xiong and Laird, *Nucleic Acids Res.*, 25:2532-4, 1997). La detección por hibridación también se ha descrito en la técnica (Olek et al., WO 99/28498). Adicionalmente, el uso de la técnica de bisulfito para la detección de metilación con respecto a los genes individuales ha sido descrita (Grigg and Clark, *Bioessays*, 16:431-6, 1994; Zeschnigk M, et al., *Hum Mol Genet.*, 6:387-95, 1997; Feil R, et al., *Nucleic Acids Res.*, 22:695-, 1994; Martin V, et al., *Gene*, 157:261-4, 1995; WO 97/46705 and WO 95/15373).

La presente divulgación se refiere a la utilización de la técnica de bisulfito, en combinación con uno o más ensayos de metilación, para la determinación del estatus de metilación de las secuencias de dinucleótido CpG dentro de la SEQ ID NO: 1-10, o regiones preferidas de las mismas de acuerdo con SEQ ID NO: 11-20. Los dinucleótidos CpG genómicos pueden ser o metilados o no metilados (alternativamente conocido como sobre o submetilados, respectivamente). Sin embargo, los métodos de la presente divulgación son adecuados para el análisis de muestras biológicas de naturaleza heterogénea, por ejemplo, una baja concentración de células tumorales dentro de un fondo de sangre o de eyaculado.

De acuerdo con lo anterior, al analizar el estatus de metilación de una posición de CpG dentro de una muestra tal la persona experta en la técnica puede usar un ensayo cuantitativo para determinar el nivel (por ejemplo, por ciento, fracción, relación, proporción o grado) de metilación en una posición CpG particular en oposición a un estado de metilación. De acuerdo con lo anterior el término estatus de metilación o estado de metilación también se deben tomar que significa un valor que refleja el grado de metilación en una posición CpG. A menos que se indique específicamente los términos "hipermetilado" o "sobremetilado" se considera que significan un nivel de metilación por encima del de un punto de corte especificado, en donde dicho corte puede ser un valor que representa el nivel promedio o medio de metilación para una población determinada o es preferiblemente un nivel de corte optimizado. El "corte" también se denomina aquí como un "umbral". En el contexto de la presente divulgación los términos "metilado", "hipermetilado" o "sobremetilado" tendrán que incluir un nivel de metilación por encima del corte cero (0)% (o equivalentes de los mismos) de metilación para todas las posiciones CpG dentro de y asociadas con (por ejemplo, en las regiones promotoras o reguladoras) al menos un gen seleccionado del grupo que consiste de CDO1; APC; BMP1A; CTAGE5; CXCL12; NCR1; NFATC2; PAX9; POU4F3; y ZBTB16.

De acuerdo con la presente divulgación la determinación del estatus de metilación de las secuencias de dinucleótido CpG dentro de la SEQ ID NO: 1-10, o regiones preferidas de las mismas de acuerdo con SEQ ID NO: 11-20 tienen utilidad en la determinación del pronóstico de un sujeto que tiene trastorno proliferativo celular, preferiblemente cáncer.

Procedimientos de ensayo de metilación. Diversos procedimientos de ensayo de metilación son conocidos en la técnica, y se pueden utilizar en conjunción con la presente invención. Estos ensayos permiten la determinación del estado de metilación de uno o una pluralidad de dinucleótidos CpG (por ejemplo, islas de CpG) dentro de una secuencia de ADN. Tales ensayos implican, entre otras técnicas, la secuenciación de ADN del ADN tratado con bisulfito, PCR (para la amplificación específica de secuencia), análisis por transferencia Southern, y el uso de enzimas de restricción sensibles a la metilación.

Por ejemplo, la secuenciación genómica se ha simplificado para el análisis de los patrones de metilación de ADN y la distribución de 5-metilcitosina usando tratamiento con bisulfito (Frommer et al., *Proc. Natl. Acad. Sci. USA* 89:1827-1831, 1992). Adicionalmente, se utiliza la digestión con enzimas de restricción de productos de PCR amplificados a partir de ADN convertido con bisulfito, por ejemplo, el método descrito por Sadri y Hornsby (*Nucl. Acids Res.* 24:5058-5059, 1996), or COBRA (Combined Bisulfite Restriction Analysis) (Xiong and Laird, *Nucleic Acids Res.* 25:2532-2534, 1997).

COBRA. El análisis COBRA™ es un ensayo de metilación cuantitativo útil para determinar los niveles de metilación de ADN en los loci de genes específicos en cantidades pequeñas de ADN genómico (Xiong and Laird, *Nucleic Acids*

Res. 25:2532-2534, 1997). En pocas palabras, la digestión con enzimas de restricción se utiliza para revelar las diferencias de secuencia dependientes de metilación en los productos de PCR de ADN tratado con bisulfito de sodio. Las diferencias de secuencia dependientes de metilación se introducen primero en el ADN genómico por tratamiento estándar con bisulfito de acuerdo con el procedimiento descrito por Frommer et al. (Proc. Natl. Acad. Sci. USA 89:1827-1831, 1992). La amplificación por PCR del ADN convertido con bisulfito se lleva a cabo entonces utilizando cebadores específicos para las islas CpG de interés, seguido de digestión con endonucleasas de restricción, electroforesis en gel, y la detección usando sondas de hibridación específicas, etiquetadas. Los niveles de metilación en la muestra de ADN original se representan por las cantidades relativas de producto de PCR digerido y no digerido de una manera linealmente cuantitativa a través de un amplio espectro de niveles de metilación del ADN. Además, esta técnica se puede aplicar de forma fiable con el ADN obtenido a partir de muestras de tejido embebidas en parafina microdisseccionadas.

Los reactivos típicos (por ejemplo, como se podría encontrar en un típico kit a base de COBRA™) para el análisis COBRA™ pueden incluir, pero no se limitan a: cebadores de PCR para el gen específico (o secuencia de ADN tratada con bisulfito o isla CpG); enzima de restricción y regulador apropiado; oligonucleótido de hibridación de genes; oligonucleótidos de hibridación de control; kit de marcaje de quinasa para sonda de oligonucleótido; y nucleótidos marcados. Adicionalmente, los reactivos de conversión de bisulfito pueden incluir: regulador de desnaturalización de ADN; regulador de sulfonación; reactivos o kits de recuperación de ADN (por ejemplo, precipitación, ultrafiltración, columna de afinidad); regulador de desulfonación; y componentes de recuperación de ADN.

Preferiblemente, ensayos tales como "MethyLight™" (una técnica de PCR en tiempo real basada en la fluorescencia) (Eads et al., Cancer Res. 59:2302-2306, 1999), reacciones de MS-SNuPE™ (Extensión por Cebador de Nucleótido Individual Sensible a Metilación) (Gonzalzo and Jones, Nucleic Acids Res. 25:2529-2531, 1997), PCR específico para metilación ("MSP"; Herman et al., Proc. Natl. Acad. Sci. USA 93:9821-9826, 1996; US Patent No. 5,786,146), y amplificación de la isla de CpG metilado ("MCA"; Toyota et al., Cancer Res. 59:2307-12, 1999) se utilizan solos o en combinación con otro de estos métodos.

La técnica del ensayo "HeavyMethyl™", es un método cuantitativo para establecer diferencias de metilación con base en la amplificación específica de metilación de ADN tratado con bisulfito. Las sondas de bloqueo específicas de metilación (también denominados aquí como bloqueadores) que cubren las posiciones de CpG entre, o cubiertas por los cebadores de amplificación permiten la amplificación selectiva específica de metilación de una muestra de ácido nucleico.

El término ensayo de "HeavyMethyl™ MethyLight™", en la realización del mismo implementado aquí, se relaciona con un ensayo HeavyMethyl™ MethyLight™, que es una variación del ensayo MethyLight™, en el que el ensayo de MethyLight™ se combina con sondas de bloqueo específicas de metilación que cubren posiciones de CpG entre los cebadores de amplificación. El ensayo de Heavy-Methyl™ también se pueden usar en combinación con cebadores de amplificación específicos de metilación.

Los reactivos típicos (por ejemplo, como se podría encontrar en un kit típico basado en MethyLight™) para el análisis Heavy-Methyl™ pueden incluir, pero no se limitan a: cebadores de PCR para genes específicos (o secuencia de ADN tratada con bisulfito o isla CpG); el bloqueo de los oligonucleótidos; reguladores de PCR optimizados y desoxinucleótidos; y Taq polimerasa.

MSP. MSP (PCR específica para metilación) permite establecer el estatus de metilación de virtualmente cualquier grupo de sitios CpG dentro de una isla de CpG, independiente del uso de enzimas de restricción sensibles a la metilación (Herman et al. Proc. Natl. Acad. Sci. EE.UU. 93:9821-9826, 1996; patente US No. 5,786,146). En resumen, el ADN es modificado por bisulfito de sodio convirtiendo todas las citosinas metiladas como las no metiladas, en uracilo, y subsecuentemente amplificadas con cebadores específicos para metilado versus ADN no metilado. MSP requiere solamente cantidades pequeñas de ADN, es sensible a 0.1% de alelos metilados de un locus dado de isla CpG, y puede realizarse sobre el ADN extraído de muestras embebidas en parafina. Los reactivos típicos (por ejemplo, como podrían encontrarse en un kit típico basado en MSP) para análisis de MSP pueden incluir, pero no se limitan a: cebadores de PCR metilados y no metilados para gen específico (o secuencia de ADN tratada con bisulfito o isla CpG), reguladores PCR optimizados y desoxinucleótidos, y sondas específicas.

MethyLight™. El ensayo MethyLight™ es un ensayo de metilación cuantitativo de alto rendimiento que utiliza la tecnología PCR en tiempo real por basado en fluorescencia (TaqMan™) que no requiere manipulaciones adicionales después de la etapa de PCR (Eads et al, Cancer Res. 59:2302-2306, 1999). En resumen, el proceso MethyLight™ comienza con una muestra mixta de ADN genómico que se convierte, en una reacción de bisulfito de sodio, a un grupo mixto de diferencias de secuencia dependientes de metilación de acuerdo con procedimientos estándar (el proceso de bisulfito convierte los residuos de citosina no metiladas en uracilo). Se realiza entonces la PCR basada en fluorescencia en una reacción "desplazada" (con cebadores de PCR que superponen dinucleótidos CpG conocidos). La discriminación de secuencia puede producirse tanto en el nivel del proceso de amplificación como a nivel del proceso de detección de fluorescencia.

El ensayo MethyLight™ puede ser usado como una prueba cuantitativa de los patrones de metilación en la muestra de ADN genómico, en donde la discriminación de secuencia ocurre en el nivel de hibridación de la sonda. En esta versión cuantitativa, la reacción de PCR provee una amplificación específica de metilación en presencia de una sonda fluorescente que superpone un sitio de metilación putativo particular. Un control no desplazado para la cantidad de ADN de entrada se provee por una reacción en la que ni los cebadores, ni la sonda se depositan sobre ningún dinucleótido CpG. Alternativamente, una prueba cualitativa para la metilación genómica se logra mediante el sondeo de la reserva de PCR desplazada, ya sea con oligonucleótidos de control que no "cubren" sitios de metilación conocidos (una versión basada en fluorescencia de las técnicas HeavyMethyl™ y MSP), o con oligonucleótidos que cubren sitios de metilación potenciales.

El proceso MethyLight™ Puede utilizarse con cualquier sonda adecuada, por ejemplo "TaqMan®", LightCycler® y similares. Por ejemplo, el ADN genómico de doble cadena se trata con bisulfito de sodio y se somete a uno de los dos conjuntos de reacciones de PCR usando sondas TaqMan®; por ejemplo, con cebadores MSP y/o oligonucleótidos bloqueadores HeavyMethyl y sonda TaqMan®. La sonda TaqMan® tiene marcación doble con moléculas fluorescente "informadoras" y "de detención", y está diseñada para ser específica para una región de contenido relativamente alto de GC de tal forma que se funde a una temperatura de aproximadamente 10°C por encima en el ciclo de PCR con respecto a los cebadores de avance o retroceso. Esto permite que la sonda TaqMan® permanezca completamente hibridada durante la etapa de fusión/extensión en PCR. Puesto que la Taq polimerasa sintetiza enzimáticamente una nueva cadena durante el PCR, eventualmente alcanzará la sonda TaqMan® fusionada. La actividad de endonucleasa de la Taq polimerasa 5' a 3' desplazará entonces la sonda TaqMan® digiriéndola para liberar la molécula informadora fluorescente para detección cuantitativa de su señal ahora no detenida utilizando un sistema de detección fluorescente en tiempo real.

Los reactivos típicos (por ejemplo, como se podrían encontrar en un kit típico basado en MethyLight™) para análisis MethyLight™ pueden incluir, pero no se limitan a: cebadores de PCR para el gen específico (o secuencia de ADN tratada con bisulfito o isla CpG); sondas TaqMan® o LightCycler®; reguladores y desoxinucleótidos para PCR optimizados; y Taq polimerasa.

El ensayo QM™ (metilación cuantitativa) es una prueba cuantitativa alternativa para los patrones de metilación en muestras de ADN genómico, en donde la discriminación de secuencia ocurre a nivel de hibridación de la sonda. En esta versión cuantitativa, la reacción de PCR provee amplificación no desplazada en presencia de una sonda fluorescente que superpone un sitio de metilación putativo particular. Un control no desplazado para la cantidad de ADN de entrada se provee por una reacción en la que ni los cebadores, ni la sonda se depositan sobre ningún dinucleótido CpG. Alternativamente, se logra una prueba cualitativa para metilación genómica sondeando la reserva de PCR desplazada bien sea con oligonucleótidos de control que no "cubren" sitios de metilación conocidos (una versión basada en fluorescencia de las técnicas HeavyMethyl™ y MSP), o con oligonucleótidos que cubren sitios de metilación potenciales.

El proceso QM™ puede utilizarse con cualquier sonda adecuada, por ejemplo "TaqMan®", LightCycler® etc., en el proceso de amplificación. Por ejemplo, el ADN genómico de doble cadena se trata con bisulfito de sodio y es sometido a cebadores no desplazados y la sonda TaqMan®. La sonda TaqMan® tiene marcación doble con moléculas fluorescente "informadoras" y "de detención", y está diseñada para ser específica para una región de contenido relativamente alto de GC de tal forma que se funde a una temperatura de aproximadamente 10°C por encima en el ciclo de PCR con respecto a los cebadores de avance o retroceso. Esto permite que la sonda TaqMan® permanezca completamente hibridada durante la etapa de fusión/extensión en PCR. Puesto que la Taq polimerasa sintetiza enzimáticamente una nueva cadena durante el PCR, eventualmente alcanzará la sonda TaqMan® fusionada. La actividad de endonucleasa de la Taq polimerasa 5' a 3' desplazará entonces la sonda TaqMan® digiriéndola para liberar la molécula informadora fluorescente para detección cuantitativa de su señal ahora no detenida utilizando un sistema de detección fluorescente en tiempo real. Los reactivos típicos (por ejemplo, como se podrían encontrar en un kit típico basado en QM™) para el análisis QM™ puede incluir, pero no se limitan a: cebadores de PCR para el gen específico (o secuencia de ADN tratado con bisulfito o isla CpG); sondas TaqMan® o LightCycler®; reguladores y desoxinucleótidos de PCR optimizados; y Taq polimerasa.

Ms-SNuPE. La técnica Ms-SNuPE™ es un método cuantitativo para establecer las diferencias de metilación en sitios de CpG específicos basado en el tratamiento con bisulfito del ADN, seguido por la extensión del cebador de un nucleótido individual (Gonzalvo and Jones, Nucleic Acids Res. 25:2529-2531, 1997). En resumen, se hace reaccionar el ADN genómico con bisulfito de sodio para convertir la citosina no metilada en uracilo, dejando la 5-metilcitosina sin cambios. La amplificación de la secuencia objetivo deseada se realiza entonces usando cebadores de PCR específicos para el ADN convertido con bisulfito, y el producto resultante se aísla y se utiliza como una plantilla para el análisis de metilación en los sitios CpG de interés. Se pueden analizar pequeñas cantidades de ADN (por ejemplo, secciones de patología microdisseccionadas), y evita la utilización de enzimas de restricción para determinar el estatus de metilación en los sitios de CpG.

Los reactivos típicos (por ejemplo, como se podría encontrar en un kit típico basado en Ms-SNuPE™) para el análisis Ms-SNuPE™ pueden incluir, pero no se limitan a: cebadores de PCR para el gen específico (o secuencia de ADN tratada con bisulfito o isla CpG); reguladores y desoxinucleótidos de PCR optimizados; kit de extracción en gel;

5 cebadores de control positivo; cebadores Ms-SNuPE™ para el gen específico; regulador de reacción (para la reacción Ms-SNuPE); y nucleótidos etiquetados. Adicionalmente, los reactivos de conversión con bisulfito pueden incluir: regulador de desnaturalización de ADN; regulador de sulfonación; regentes de recuperación de ADN o kit (por ejemplo, precipitación, ultrafiltración, columna de afinidad); regulador de desulfonación; y componentes de recuperación de ADN.

10 Las secuencias genómicas de acuerdo con SEQ ID NO: 1-10 o regiones preferidas de las mismas de acuerdo con SEQ ID NO: 11-20, y variantes tratadas de origen no natural de las mismas de acuerdo con SEQ ID NO: 21-40 y 61-80 o regiones preferida de la misma de acuerdo con SEQ ID NO: 41-60 y 81-100, se determinaron por tener utilidad novedosa para la determinación del pronóstico de un sujeto que tiene trastorno proliferativo celular, preferiblemente cáncer.

15 En una realización, el método de la divulgación comprende las siguientes etapas: i) determinar la metilación y/o expresión de al menos un gen seleccionado del grupo que consiste de CDO1; APC; BMPR1A; CTAGE5; CXCL12; NCR1; NFATC2; PAX9; POU4F3; y ZBTB16 y ii) determinar el pronóstico de un sujeto que tiene trastorno proliferativo celular, preferiblemente cáncer. En una realización preferida, dicho pronóstico es el pronóstico del sujeto posterior a una terapia que comprende al menos una antraciclina.

20 El método de la descripción puede ser habilitado por medio de cualquier análisis de la expresión de un ARN transcrito del mismo o polipéptido o proteína traducida a partir de dicho ARN, preferiblemente por medio de análisis de la expresión de ARNm o análisis de la expresión del polipéptido. Sin embargo, en la realización más preferida de la divulgación la determinación del pronóstico de un sujeto que tiene trastorno proliferativo celular, preferiblemente cáncer, se activa por medio del análisis del estatus de metilación de al menos un gen seleccionado del grupo que consiste de CDO1; APC; BMPR1A; CTAGE5; CXCL12; NCR1; NFATC2; PAX9; POU4F3; y ZBTB16, y/o elementos promotores o reguladores de los mismos.

25 DE acuerdo con lo anterior, la presente divulgación también se relaciona con ensayos y métodos de pronóstico y/o predictivos, ambos cuantitativos y cualitativos para la detección de la expresión de al menos un gen seleccionado del grupo que consiste de CDO1; APC; BMPR1A; CTAGE5; CXCL12; NCR1; NFATC2; PAX9; POU4F3; y ZBTB16 en un sujeto y determinando la misma el pronóstico de un sujeto que tiene trastorno proliferativo celular, preferiblemente cáncer en dicho sujeto.

30 La expresión aberrante del ARNm transcrito a partir de al menos un gen seleccionado del grupo que consiste de CDO1; APC; BMPR1A; CTAGE5; CXCL12; NCR1; NFATC2; PAX9; POU4F3; y ZBTB16 se asocia con la progresión de trastorno proliferativo celular, preferiblemente cáncer en un sujeto.

35 Para detectar la presencia de ARNm que codifica un gen o secuencia genómica, se obtiene una muestra del sujeto. La muestra puede ser cualquier muestra adecuada que comprende materia celular del tumor. Tipos de muestras adecuadas incluyen líneas celulares, cortes histológicos, tejidos embebidos en parafina, biopsias, tejido embebido en parafina, fluidos corporales (tales como, pero no limitados a aspirado de pezón y sangre) y todas las combinaciones posibles de los mismos. Se prefiere que dichos tipos de muestras sean líneas celulares, cortes histológicos, tejidos embebidos en parafina, biopsias, tejido embebido en parafina, fluidos corporales (tales como, pero no limitados a, aspirado de pezón y sangre) y todas las posibles combinaciones de los mismos.

40 La muestra puede ser tratada para extraer el ARN contenido en el mismo. se analiza emtonces, el ácido nucleico resultante de la muestra. Muchas técnicas se conocen en el estado de la técnica para determinar los niveles absolutos y relativos de la expresión génica, técnicas comúnmente utilizadas adecuadas para uso en la presente divulgación incluyen la hibridación in situ (por ejemplo FISH), análisis de Northern, ensayos de protección de RNasa (RPA), microarreglos y técnicas basadas en PCR tales como PCR cunatitativo y PCR de presentación diferencial o cualquier otro método de detección de ácido nucleico.

45 Particularmente preferido es el uso de la técnica de reacción en cadena de transcripción/polimerización inversa (RT-PCR). El método de RT-PCR es bien conocido en la técnica (por ejemplo, véase Watson and Fleming, supra).

50 El método RT-PCR puede llevarse a cabo como sigue. El ARN celular total se aísla mediante, por ejemplo, el método de isotiocianato de guanidinio estándar y el ARN total es transcrito en forma reversa. El método de transcripción reversa implica síntesis de ADN en una plantilla de ARN utilizando una enzima de transcriptasa reversa y un cebador dT oligonucleótido de extremo 3' y/o cebadores hexámeros aleatorios. El ADNc así producido se amplifica por medio de PCR. (Belyavsky et al, Nucl Acid Res 17:2919-2932, 1989; Krug and Berger, Methods in Enzymology, Academic Press, N.Y., Vol. 152, pp. 316-325, 1987, que se incorporan por referencia.). Se prefiere adicionalmente la variante "en tiempo real" de RT-PCR, en donde el producto de PCR se detecta por medio de sondas de hibridación (por ejemplo, TaqMan, LightCycler, Balizas Moleculares y Scorpion) o verde SYBR. La señal detectada de las sondas o verde SYBR es entonces cuantificada bien por referencia a una curva estándar o mediante la comparación de los valores de Ct a la de un estándar de calibración. El análisis de los genes cuidadores se usa frecuentemente para normalizar los resultados.

55

En el análisis de transferencia Northern total o poli(A)+ ARNm se ejecuta en un gel de agarosa desnaturante y se detecta por hibridación con una sonda marcada en el gel secado por sí mismo o en una membrana. La señal resultante es proporcional a la cantidad de ARN objetivo en la población de ARN.

5 La comparación de las señales de dos o más poblaciones de células o tejidos revela diferencias relativas en los niveles de expresión génica. La cuantificación absoluta se puede realizar mediante la comparación de la señal con una curva estándar generada usando cantidades conocidas de una transcripción in vitro que corresponden al ARN objetivo. Se espera que el análisis de genes cuidadores, genes cuyos niveles de expresión permanecen relativamente constantes independientemente de las condiciones, sea con frecuencia utilizada para normalizar los resultados, eliminando cualesquier diferencias aparentes causados por transferencia desigual de ARN a la membrana o carga desigual de ARN en el gel.

10 El primer paso en el análisis Northern es aislar ARN puro, intacto de las células o tejido de interés. Debido a transferencias Northern que distinguen ARN por tamaño, la integridad de la muestra influye en el grado en el que una señal se localiza en una banda individual. Muestras de ARN parcialmente degradadas darán como resultado la señal que está manchada o distribuida sobre varias bandas con una pérdida global de la sensibilidad y posiblemente una interpretación errónea de los datos. En el análisis de transferencia de Northern, las sondas de ADN, ARN y oligonucleótidos se pueden utilizar y estas sondas se marcan preferiblemente (por ejemplo, marcadores radiactivos, marcadores de masa o marcadores fluorescentes). El tamaño del ARN objetivo, no de la sonda, determinará el tamaño de la banda detectada, por lo que los métodos tales como el etiquetado cebado al azar, que genera sondas de longitudes variables, son adecuados para la síntesis de la sonda. La actividad específica de la sonda determinará el nivel de sensibilidad, por lo que se prefiere que se utilicen las sondas con altas actividades específicas.

15 En un ensayo de protección de RNasa, el ARN objetivo y una sonda de ARN de una longitud definida se hibridaron en solución. Después de la hibridación, el ARN se digiere con RNasas específicas para los ácidos nucleicos de cadena sencilla para eliminar cualquier ARN objetivo de cadena sencilla no hibridada y la sonda. Las RNasas se inactivan, y el ARN se separa, por ejemplo, por electroforesis en gel de poliacrilamida desnaturante. La cantidad de sonda de ARN intacta es proporcional a la cantidad de ARN objetivo en la población de ARN. Se puede utilizar RPA para la cuantificación relativa y absoluta de la expresión génica y también para la estructura del ARN de mapeo, tales como límites intrón/exón y sitios de inicio de la transcripción. El ensayo de protección de RNasa es preferible a análisis de transferencia Northern, ya que generalmente tiene un límite inferior de detección.

20 Las sondas de ARN antisentido utilizadas en RPA son generadas por transcripción in vitro de una plantilla de ADN con un punto final definido y están típicamente en el rango de 50-600 nucleótidos. El uso de sondas de ARN que incluyan secuencias adicionales no homólogas al ARN objetivo permite que el fragmento protegido sea distinguido de la sonda de longitud completa. Las sondas de ARN se utilizan típicamente en lugar de sondas de ADN debido a la facilidad de generar sondas de ARN de cadena simple y la reproducibilidad y fiabilidad de la digestión de ARN:ARN dúplex con RNasas (Ausubel et al. 2003), particularmente preferidas son sondas con altas actividades específicas. Particularmente preferido es el uso de microarreglos. El proceso de análisis de microarreglos se puede dividir en dos partes principales. Primero, es la inmovilización de secuencias de genes conocidos en láminas de vidrio u otro soporte sólido seguido por la hibridación del ADNc marcado con fluorescencia (que comprende las secuencias que se van a interrogar) a los genes conocidos inmovilizados sobre láminas de vidrio (u otra fase sólida). Después de la hibridación, los arreglos son escaneados utilizando un escáner de microarreglos fluorescente. El análisis de la intensidad de fluorescencia relativa de diferentes genes provee una medida de las diferencias en la expresión génica.

25 Los arreglos de ADN pueden generarse inmovilizando oligonucleótidos presintetizados en láminas de vidrio preparadas u otras superficies sólidas. En este caso, las secuencias de genes representativos se fabrican y se preparan utilizando métodos estándar de síntesis y purificación de oligonucleótidos. Estas secuencias de genes sintetizados son complementarias a las transcripciones de ARN de al menos un gen seleccionado del grupo que consiste de CDO1; APC; BMPR1A; CTAGE5; CXCL12; NCR1; NFATC2; PAX9; POU4F3; y ZBTB16 y tienden a ser secuencias más cortas en el rango de 25-70 nucleótidos. Alternativamente, los oligonucleótidos inmovilizados pueden sintetizarse químicamente in situ sobre la superficie de la lámina. La síntesis de oligonucleótidos in situ implica la adición consecutiva de los nucleótidos adecuados a las manchas en el microarreglo; las manchas que no reciben un nucleótido se protegen durante cada etapa del proceso usando máscaras físicas o virtuales. Preferiblemente, dichos ácidos nucleicos sintetizados son ácidos nucleicos bloqueados.

30 En los experimentos de microarreglos de perfiles de expresión, las plantillas de ARN utilizadas son representativas del perfil de transcripción de las células o tejidos bajo estudio. El ARN es primero aislado de las poblaciones de células o tejidos que se van a comparar. Cada muestra de ARN se utiliza entonces como una plantilla para generar ADNc marcado con fluorescencia a través de una reacción de transcripción reversa. El etiquetado fluorescente del ADNc puede realizarse por cualquiera de los métodos de marcaje directo o métodos de marcaje indirecto. Durante el marcaje directo, los nucleótidos fluorescentemente modificados (por ejemplo, Cy@3- o Cy@5-dCTP) se incorporan directamente en el ADNc durante la transcripción reversa. Alternativamente, el marcaje indirecto puede lograrse mediante la incorporación de nucleótidos modificados con aminoalilos durante la síntesis de ADNc y luego conjugación de un colorante de N-hidroxisuccinimida (NHS) -éster al ADNc modificado con aminoalilos después de

que la reacción de transcripción reversa se ha completado. Alternativamente, la sonda puede estar sin marcar, pero puede ser detectable mediante el enlazamiento con un ligando que está marcado, ya sea directa o indirectamente. Etiquetas y métodos adecuados para marcar ligandos (y sondas) adecuados son conocidos en la técnica, e incluyen, por ejemplo, marcadores radiactivos que pueden ser incorporados por métodos conocidos (por ejemplo, desplazamiento de muesca o tratamiento con quinasa). Otros marcadores adecuados incluyen, pero no se limitan a biotina, grupos fluorescentes, grupos quimioluminiscentes (por ejemplo, dioxetanos, particularmente dioxetanos activados), enzimas, anticuerpos, y similares.

Para llevar a cabo el análisis de expresión génica diferencial, el ADNc generado a partir de diferentes muestras de ARN se etiquetan con Cy³. El ADNc marcado resultante se purifica para eliminar los nucleótidos no incorporados, colorante libre y el ARN residual. Después de la purificación, las muestras de ADNc marcadas se hibridan al microarreglo. La rigurosidad de la hibridación se determina por un número de factores durante la hibridación y durante el procedimiento de lavado, incluyendo la temperatura, fuerza iónica, longitud de tiempo y concentración de formamida. Estos factores se delinean en, por ejemplo, Sambrook et al. (Molecular Cloning: A Laboratory Manual, 2nd ed., 1989). El microarreglo se escanea después de la hibridación utilizando un escáner de microarreglos fluorescente. La intensidad fluorescente de cada punto indica el nivel de expresión del gen analizado; puntos brillantes corresponden a genes fuertemente expresado, mientras que las manchas oscuras indican expresión débil.

Una vez obtenidas las imágenes, se deben analizar los datos sin procesar. En primer lugar, la fluorescencia de fondo se debe restar de la fluorescencia de cada mancha. Los datos se normalizaron entonces a una secuencia de control, tales como ácidos nucleicos añadidos exógenamente (preferiblemente ARN o ADN), o un panel de genes cuidadores para dar cuenta de cualquier hibridación no específica, imperfecciones del arreglo o la variabilidad en la configuración de la matriz, el etiquetado de ADNc, la hibridación o el lavado. La normalización de datos permite se comparen los resultados de múltiples arreglos.

Otro aspecto de la divulgación se relaciona con un kit para su uso en la determinación del pronóstico de un sujeto que tiene trastorno proliferativo celular, preferiblemente cáncer de acuerdo con los métodos de la presente divulgación dicho kit comprende: un medio para medir el nivel de transcripción de al menos un gen seleccionado del grupo que consiste de CDO1; APC; BMPR1A; CTAGE5; CXCL12; NCR1; NFATC2; PAX9; POU4F3; y ZBTB16. En una realización preferida los medios para medir el nivel de transcripción comprenden oligonucleótidos o polinucleótidos capaces de hibridar bajo condiciones rigurosas o moderadamente rigurosas a los productos de transcripción de al menos un gen seleccionado del grupo que consiste de CDO1; APC; BMPR1A; CTAGE5; CXCL12; NCR1; NFATC2; PAX9; POU4F3; y ZBTB16. En una realización más preferida, el nivel de transcripción se determina por técnicas seleccionadas del grupo de los análisis de transferencia Northern, PCR con transcriptasa reversa, PCR en tiempo real, de protección de RNasa, y microarreglos. En otra realización de la divulgación el kit comprende además medios para obtener y/o almacenar una muestra biológica del sujeto. Se prefiere un kit, que comprende además un recipiente que es lo más preferiblemente adecuado para contener los medios para medir el nivel de la transcripción y la muestra biológica del sujeto, y lo más preferiblemente comprende además instrucciones para el uso y la interpretación de los resultados del kit.

En una realización preferida, el kit comprende (a) una pluralidad de oligonucleótidos o polinucleótidos capaces de hibridar bajo condiciones rigurosas o moderadamente rigurosas a los productos de la transcripción de al menos un gen seleccionado del grupo que consiste de CDO1; APC; BMPR1A; CTAGE5; CXCL12; NCR1; NFATC2; PAX9; POU4F3; y ZBTB16 (b) un recipiente, preferiblemente adecuado para contener los oligonucleótidos o polinucleótidos y una muestra biológica del sujeto que comprende los productos de transcripción en el que los oligonucleótidos o polinucleótidos pueden hibridar bajo condiciones rigurosas o moderadamente rigurosas a los productos de transcripción, (c) medios para detectar la hibridación de (b); y, opcionalmente (d) instrucciones para el uso y la interpretación de los resultados del kit

El kit también puede contener otros componentes, tales como regulador de hibridación (donde los oligonucleótidos son para ser utilizados como una sonda) empacados en un recipiente separado. Alternativamente, cuando los oligonucleótidos son para ser utilizados para amplificar una región objetivo, el kit puede contener, empacados en envases separados, una polimerasa y un regulador de reacción optimizado para la extensión del cebador mediada por la polimerasa, tal como PCR. Preferiblemente, dicha polimerasa es una transcriptasa reversa. Además, se prefiere que dicho kit contenga además un reactivo de RNasa.

La presente divulgación se refiere además a métodos para la detección de la presencia del polipéptido codificado por dichas secuencias de genes en una muestra obtenida de dicho sujeto.

Los niveles aberrantes de expresión de polipéptidos de los polipéptidos codificados al menos un gen seleccionado del grupo que consiste de CDO1; APC; BMPR1A; CTAGE5; CXCL12; NCR1; NFATC2; PAX9; POU4F3; ZBTB16 están asociados con el pronóstico de un sujeto que tiene trastorno proliferativo celular, preferiblemente cáncer.

De acuerdo con la presente divulgación la subexpresión de dichos polipéptidos se asocia con un pronóstico negativo de un sujeto que tiene trastorno proliferativo celular, preferiblemente cáncer.

5 Se puede utilizar cualquier método conocido en la técnica para detectar polipéptidos. Tales métodos incluyen, pero no se limitan a la espectrometría de masa, inmunodifusión, inmunoelectroforesis, métodos inmunoquímicos, ensayos de aglomerante-ligando, técnicas inmunohistoquímicas, aglutinación y ensayos de complemento (por ejemplo, véase Basic and Clinical Immunology, Sites and Terr, eds., Appleton and Lange, Norwalk, Conn. pp 217-262, 1991 que se incorpora por referencia). Se prefieren los métodos de inmunoensayo de aglomerante-ligando que incluyen hacer reaccionar anticuerpos con un epítipo o epítipos y desplazar competitivamente un polipéptido marcado o derivado del mismo.

10 Ciertas realizaciones de la presente divulgación comprenden el uso de anticuerpos específicos para el (los) polipéptido(s) codificado(s) por al menos un gen seleccionado del grupo que consiste de CDO1; APC; BMPR1A; CTAGE5; CXCL12; NCR1; NFATC2; PAX9; POU4F3; y ZBTB16.

15 Tales anticuerpos son útiles para determinar el pronóstico de un sujeto que tiene trastorno proliferativo celular, preferiblemente cáncer. En ciertas realizaciones la producción de anticuerpos monoclonales o policlonales se puede inducir por el uso de un epítipo codificado por un polipéptido de al menos un gen seleccionado del grupo que consiste de CDO1; APC; BMPR1A; CTAGE5; CXCL12; NCR1; NFATC2; PAX9; POU4F3; y ZBTB16 como un antígeno. Tales anticuerpos pueden a su vez ser usados para detectar polipéptidos expresados. Los niveles de tales polipéptidos presentes pueden cuantificarse por métodos convencionales. El enlazamiento de anticuerpo-polipéptido puede ser detectado y cuantificado por una variedad de medios conocidos en la técnica, tales como el etiquetado con ligandos fluorescentes o radiactivos. La divulgación comprende además kits para realizar los procedimientos antes mencionados, en donde tales kits contienen anticuerpos específicos para los polipéptidos investigados.

20 Numerosos inmunoensayos de enlazamiento de polipéptido competitivo y no competitivo son bien conocidos en la técnica. Los anticuerpos empleados en tales ensayos pueden no ser marcados, por ejemplo como se utiliza en pruebas de aglutinación, o marcados para uso una amplia variedad de métodos de ensayo. Las etiquetas que pueden usarse incluyen radionúclidos, enzimas, fluorescentes, quimioluminiscentes, sustratos enzimáticos o cofactores, inhibidores de enzimas, partículas, colorantes y similares. Los ensayos preferidos incluyen, pero no se limitan a radioinmunoensayo (RIA), inmunoensayos enzimáticos, por ejemplo, ensayo de inmunosorbente enlazado a enzimas (ELISA), inmunoensayos fluorescentes y similares. Los anticuerpos o epítipos policlonales o monoclonales de los mismos se pueden hacer para uso en inmunoensayos mediante cualquiera de una serie de métodos conocidos en la técnica.

30 En una realización alternativa del método las proteínas se pueden detectar por medio de análisis de transferencia Western. Dicho análisis es estándar en la técnica, las proteínas brevemente se separan por medio de electroforesis por ejemplo SDS-PAGE. Las proteínas separadas se transfieren entonces a una membrana adecuada (o papel), por ejemplo, nitrocelulosa, conservando la separación espacial lograda por electroforesis. La membrana se incuba entonces con un agente de bloqueo para unir restantes lugares adhesivos en la membrana, los agentes utilizados comúnmente incluyen proteína genérica (por ejemplo, proteína de la leche). Se añade entonces un anticuerpo específico a la proteína de interés, estando dicho anticuerpo marcado de forma detectable, por ejemplo, por colorantes o medios enzimáticos (por ejemplo, fosfatasa alcalina o peroxidasa de rábano picante). Se detecta entonces la ubicación del anticuerpo en la membrana.

40 En una realización alternativa del método las proteínas se pueden detectar por medio de inmunohistoquímica (el uso de anticuerpos para sondear antígenos específicos en una muestra). Dicho análisis es estándar en la técnica, en donde la detección de antígenos en tejidos es conocida como la inmunohistoquímica, mientras que la detección en las células cultivadas se denomina generalmente inmunocitoquímica. En resumen, el anticuerpo primario que se detecta mediante la unión a su antígeno específico. El complejo anticuerpo- antígeno se une entonces mediante un anticuerpo conjugado de enzima secundaria. En la presencia del sustrato y el cromógeno necesarios la enzima unida se detecta de acuerdo con los depósitos de color en los sitios de enlazamiento antígeno-anticuerpo. Hay un amplio rango de tipos adecuados de muestra, la afinidad de antígeno-anticuerpo, tipos de anticuerpos, y métodos de mejora de la detección. Por lo tanto las condiciones óptimas para la detección inmunohistoquímica o inmunocitoquímica deben ser determinadas por la persona experta en la técnica para cada caso individual.

50 Una metodología para preparar anticuerpos para un polipéptido es la selección y preparación de una secuencia de aminoácidos de la totalidad o parte del polipéptido, sintetizando químicamente la secuencia de aminoácidos e inyectarla en un animal apropiado, usualmente un conejo o un ratón (Milstein and Kohler Nature 256:495-497, 1975; Gutfre and Milstein, Methods in Enzymology: Immunochemical Techniques 73:1-46, Langone and Banatis eds., Academic Press, 1981, que se incorporan por referencia en su totalidad). Los métodos para la preparación de los polipéptidos o epítipos de los mismos incluyen, pero no se limitan a síntesis química, técnicas de ADN recombinante o aislamiento de muestras biológicas.

55 En el último paso del método se determina el pronóstico del sujeto, por lo que la subexpresión (del ARNm o polipéptidos) es indicativo de el pronóstico de un sujeto que tiene trastorno proliferativo celular, preferiblemente cáncer. El término subexpresión se entiende la expresión en un nivel detectado menos de un corte predeterminado que puede ser seleccionada del grupo que consiste de la media, la mediana o un valor umbral optimizado. El término

sobreexpresión se entiende la expresión en un nivel detectado mayor que un corte predeterminado que puede ser seleccionada del grupo que consiste de la media, la mediana o un valor umbral optimizado.

Otro aspecto de la divulgación se relaciona con un kit para uso en la determinación del pronóstico de un sujeto que tiene trastorno proliferativo celular, preferiblemente cáncer de acuerdo con los métodos de la presente divulgación, que comprende: un medio para detectar al menos un gen seleccionado del grupo que consiste de polipéptidos CDO1; APC; BMPR1A; CTAGE5; CXCL12; NCR1; NFATC2; PAX9; POU4F3; y ZBTB16. Los medios para la detección de los polipéptidos comprenden, preferiblemente, anticuerpos, derivados de anticuerpos, o fragmentos de anticuerpos. Los polipéptidos se detectan más preferiblemente por medio de inmunoprecipitación Western utilizando un anticuerpo marcado. En otra realización de la divulgación el kit comprende además medios para obtener una muestra biológica del sujeto. Se prefiere un kit, que comprenda además un recipiente adecuado para contener los medios para la detección de los polipéptidos en la muestra biológica del sujeto, y lo más preferiblemente comprende además instrucciones para uso y la interpretación de los resultados del kit. En una realización preferida, el kit comprende: (a) un medio para detectar al menos un gen seleccionado del grupo que consiste de polipéptidos CDO1; APC; BMPR1A; CTAGE5; CXCL12; NCR1; NFATC2; PAX9; POU4F3; y ZBTB16; (b) un recipiente adecuado para contener los dichos medios y la muestra biológica del sujeto que comprende los polipéptidos en donde los medios pueden formar complejos con los polipéptidos; (c) un medio para detectar los complejos de (b); y opcionalmente (d) instrucciones para uso e interpretación de los resultados del kit.

El kit también puede contener otros componentes tales como reguladores y soluciones adecuadas para el bloqueo, lavado o recubrimiento, empacado en un recipiente separado.

20 Análisis de metilación

Realizaciones particulares de la presente divulgación se relacionan con una novedosa aplicación del análisis de los niveles de metilación y/o patrones dentro de al menos un gen seleccionado del grupo que consiste de CDO1; APC; BMPR1A; CTAGE5; CXCL12; NCR1; NFATC2; PAX9; POU4F3; y ZBTB16 que permite la determinación del pronóstico de un sujeto que tiene el trastorno de proliferación celular, preferiblemente cáncer, posterior a una terapia. La determinación del pronóstico de un paciente que tiene trastorno proliferativo celular, preferiblemente cáncer permite al médico tomar mejores y más informadas decisiones de tratamiento. En una realización, dicho pronóstico es el pronóstico del sujeto posterior a una terapia que comprende al menos una antraciclina.

En la realización más preferida del procedimiento, el pronóstico de un sujeto que tiene trastorno proliferativo celular, preferiblemente cáncer, posterior a una terapia se determina por análisis del estatus de metilación de uno o más dinucleótidos CpG de al menos un gen seleccionado de entre el grupo que consiste de de CDO1; APC; BMPR1A; CTAGE5; CXCL12; NCR1; NFATC2; PAX9; POU4F3; y ZBTB16.

En una realización, la divulgación de dicho método comprende las siguientes etapas: i) poner en contacto el ADN genómico (preferiblemente aislado de las líneas celulares, cortes histológicos, tejidos embebidos en parafina, biopsias, tejido embebido en parafina, fluidos corporales (tales como, pero no limitado a, aspirado de pezón y sangre) y todas las posibles combinaciones de los mismos) obtenidos del sujeto con al menos un reactivo, o serie de reactivos que distinguen entre los dinucleótidos CpG metilados y no metilados dentro de al menos un gen seleccionado del grupo que consiste de CDO1; APC; BMPR1A; CTAGE5; CXCL12; NCR1; NFATC2; PAX9; POU4F3; y ZBTB16 (incluyendo regiones promotoras y reguladoras de los mismos) y ii) determinar el pronóstico de dicho sujeto que tiene trastorno proliferativo celular, preferiblemente cáncer.

Se prefiere que dichos uno o más dinucleótidos CpG de al menos un gen seleccionado del grupo que consiste de CDO1; APC; BMPR1A; CTAGE5; CXCL12; NCR1; NFATC2; PAX9; POU4F3; y ZBTB16 estén comprendidos dentro de una secuencia objetivo genómica correspondiente del mismo como se provee en la SEQ ID NO: 1-10, o regiones preferidas de los mismos de acuerdo con SEQ ID NO: 11-20 y complementos de las mismas. La presente divulgación se refiere además a un método para la determinación de parámetros genéticos y/o epigenéticos de al menos un gen seleccionado del grupo que consiste de CDO1; APC; BMPR1A; CTAGE5; CXCL12; NCR1; NFATC2; PAX9; POU4F3; y ZBTB16 y/o la secuencia genómica de acuerdo con SEQ ID NO: 1-10, o regiones preferidas de las mismas de acuerdo con SEQ ID NO: 11- 20 dentro de un sujeto mediante el análisis de la metilación de citosina. Dicho método comprende poner en contacto un ácido nucleico que comprende la SEQ ID NO: 1-10, o regiones preferidas de las mismas de acuerdo con SEQ ID NO: 11- 20 en una muestra biológica obtenida de dicho sujeto con al menos un reactivo o una serie de reactivos, en donde dicho reactivo o serie de reactivos, distingue entre dinucleótidos CpG metilados y no metilados dentro del ácido nucleico objetivo.

En una realización preferida, dicho método comprende las siguientes etapas: En la primera etapa, se obtiene una muestra del tejido que se va a analizar. La fuente puede ser cualquier fuente adecuada, tal como líneas celulares, cortes histológicos, tejidos embebidos en parafina, biopsias, tejido embebido en parafina, fluidos corporales (tales como, pero no limitado a aspirado de pezón y sangre) y todas las combinaciones posibles de los mismos. Se prefiere que dichas fuentes de ADN sean líneas celulares, cortes histológicos, tejidos embebidos en parafina, biopsias, tejido embebido en parafina, fluidos corporales (tales como, pero no limitado a, aspirado de pezón y sangre) y todas las posibles combinaciones de los mismos.

El ADN genómico es entonces aislado de la muestra. El ADN genómico puede ser aislado por cualquier medio estándar en la técnica, incluyendo el uso de kits disponibles en el mercado. En resumen, en donde el ADN de interés está encapsulado por una membrana celular la muestra biológica debe ser deshecha y sometida a lisis mediante medios enzimáticos, químicos o mecánicos. La solución de ADN puede entonces ser eliminada de las proteínas y otros contaminantes, por ejemplo, por digestión con proteinasa K. El ADN genómico es entonces recuperado a partir de la solución. Esto puede llevarse a cabo por medio de una variedad de métodos que incluyen precipitación por saturación salina, extracción orgánica o enlazamiento del ADN a un soporte en fase sólida. La elección del método se verá afectada por varios factores incluyendo tiempo, coste y cantidad necesaria de ADN.

En donde el ADN de la muestra no está encerrado en una membrana (por ejemplo, ADN circulante a partir de una muestra de sangre) se pueden emplear métodos estándar en la técnica para el aislamiento y/o purificación de ADN. Tales métodos incluyen el uso de un reactivo de degeneración de proteínas, por ejemplo, sal caotrópica, por ejemplo, clorhidrato de guanidina o urea; o un detergente, por ejemplo, dodecil sulfato de sodio (SDS), bromuro de cianógeno. Métodos alternativos incluyen, pero no se limitan a precipitación con etanol o precipitación con propanol, concentración al vacío, entre otros, por medio de una centrifuga. La persona experta en la técnica también puede hacer uso de dispositivos tales como dispositivos de filtro por ejemplo ultrafiltración, superficies de sílica o membranas, partículas magnéticas, partículas de poliestireno, poliestireno, superficies cargadas positivamente, y membranas cargadas positivamente, membranas cargadas, superficies cargadas, membranas de conmutación con carga, superficies conmutadas cargadas.

Una vez se han extraído los ácidos nucleicos, el ADN genómico de doble cadena se utiliza en el análisis, el análisis de metilación se puede llevar a cabo por cualquier medio conocido en la técnica, incluyendo pero no limitado a análisis de enzimas de restricción sensibles a la metilación y análisis de reactivo químico.

Análisis químico

En el segundo paso del método, la muestra de ADN genómico se trata de una manera tal que las bases de citosina que están sin metilar en la posición 5' se convierten en uracilo, timina, u otra base que es diferente a la citosina en términos de comportamiento de hibridación. Esto se entenderá aquí como "pretratamiento" o "tratamiento".

Esto se logra preferiblemente por medio de tratamiento con un reactivo de bisulfito. El término "reactivo de bisulfito" se relaciona con un reactivo que comprende bisulfito, disulfito, sulfito de hidrógeno o combinaciones de los mismos, útiles como se divulga aquí para distinguir entre las secuencias de dinucleótidos CpG metiladas y no metiladas. Métodos de dicho tratamiento son conocidos en la técnica (por ejemplo PCT/EP2004/011715, que se incorpora por referencia en su totalidad). Se prefiere que el tratamiento con bisulfito se lleve a cabo en presencia de solventes desnaturizantes tales como, pero no limitado a n-alquilenglicol, en particular dietilenglicol dimetil éter (DME), o en presencia de dioxano o derivados de dioxano. En una realización preferida los solventes desnaturizantes se usan en concentraciones de entre 1% y 35% (v/v). También se prefiere que la reacción de bisulfito se lleve a cabo en presencia de depuradores tales como, pero no limitado a derivados de cromano, por ejemplo, ácido 2-carboxílico de 6-hidroxi-2, 5,7,8,-tetrametilcromano o ácido de trihidroxibenceno y derivados de los mismos, por ejemplo, el ácido gálico (véase: PCT/EP2004/011715 que se incorpora por referencia en su totalidad). La conversión de bisulfito se lleva a cabo preferiblemente a una temperatura de reacción entre 30°C y 70°C, con lo cual la temperatura se incrementa a más de 85°C durante períodos cortos de veces durante la reacción (véase: PCT/EP2004/011715 que se incorpora por referencia en su totalidad). El ADN tratado con bisulfito se purifica preferiblemente priori a la cuantificación. Esto puede llevarse a cabo por cualquier medio conocido en la técnica, tales como, pero no limitado a, ultrafiltración, preferiblemente llevada a cabo por medio de columnas Microcon[^] (TM) (fabricado por Millipore[^](TM)). La purificación se lleva a cabo de acuerdo con el protocolo del fabricante modificado (véase: el documento WO 2005/038051 que se incorpora por referencia en su totalidad).

En la tercera etapa del método, los fragmentos de ADN tratado se amplifican, usando juegos conjuntos oligonucleótidos cebadores de acuerdo con la presente divulgación, y una enzima de amplificación.

La amplificación de varios segmentos de ADN puede llevarse a cabo simultáneamente en uno y el mismo recipiente de reacción. Típicamente, la amplificación se lleva a cabo utilizando una reacción en cadena de la polimerasa (PCR). Preferiblemente, dichos amplificados son 100 a 2,000 pares de bases de longitud. El conjunto de oligonucleótidos cebadores incluye al menos dos oligonucleótidos cuyas secuencias son cada una inversa complementaria, idéntica, o se hibridan bajo condiciones rigurosas o altamente rigurosas a un segmento al menos de 16 pares de bases de longitud de las secuencias de bases de una de las SEQ ID NO: 21-40 y 61-80 o regiones preferidas de las mismas de acuerdo con SEQ ID NO: 41-60 y 81-100 y secuencias complementarias a la misma.

En una realización alternativa del método, el estatus de metilación de las posiciones CpG preseleccionadas dentro de al menos un gen seleccionado del grupo que consiste de CDO1; APC; BMPR1A; CTAGE5; CXCL12; NCR1; NFATC2; PAX9; POU4F3; y ZBTB16 y preferiblemente dentro de las secuencias de ácido nucleico de acuerdo con SEQ ID NO: 1-10, o regiones preferidas de las mismas de acuerdo con SEQ ID NO: 11- 20, puede detectarse mediante el uso de oligonucleótidos de cebador específico de metilación. Esta técnica (MSP) se ha descrito en la Patente de Estados Unidos No. 6,265,171 de Herman. El uso de cebadores específicos de estatus de metilación

- para la amplificación de ADN tratado con bisulfito permite la diferenciación entre ácidos nucleicos metilados y no metilados. Pares de cebadores MSP contienen al menos un cebador que se hibrida a un dinucleótido CpG tratado con bisulfito. Por lo tanto, la secuencia de dichos cebadores comprende al menos un dinucleótido CpG. Cebadores de MSP específicos para el ADN no metilado contienen una "T" en la posición de la posición C en el CpG.
- 5 Preferiblemente, por lo tanto, la secuencia bases de dichos cebadores se requiere para comprender una secuencia que tiene una longitud de al menos 9 nucleótidos que se hibrida a una secuencia de ácido nucleico tratado de acuerdo con una de las SEQ ID NO: 21-40 y 61-80 o regiones preferidas de las mismas de acuerdo con SEQ ID NO: 41-60 y 81-100 y las secuencias complementarias de las mismas, en donde la secuencia bases de dichos oligómeros comprende al menos un dinucleótido CpG. Una realización preferida adicional del método comprende el
- 10 uso de oligonucleótidos bloqueadores (el ensayo HeavyMethyl™). El uso de tales oligonucleótidos bloqueadores se ha descrito por Yu et al, BioTechniques 23:714-720, 1997. Los oligonucleótidos de la sonda de bloqueo se hibridan con el ácido nucleico tratado con bisulfito simultáneamente con los cebadores de PCR. La amplificación por PCR del ácido nucleico se termina en la posición 5' de la sonda de bloqueo, de tal manera que la amplificación de un ácido nucleico es suprimida donde la secuencia complementaria a la sonda de bloqueo está presente. Las sondas pueden
- 15 diseñarse para hibridar con el ácido nucleico tratado con bisulfito de una manera específica al estatus de metilación. Por ejemplo, para la detección de ácidos nucleicos metilados dentro de una población de ácidos nucleicos no metilados, la supresión de la amplificación de ácidos nucleicos que son no metilados en la posición en cuestión podría llegarse a cabo mediante el uso de sondas de bloqueo que comprenden un 'CpA "o" TPA 'en la posición en cuestión, a diferencia de un "CpG" si se desea la supresión de la amplificación de ácidos nucleicos metilados.
- 20 Para los métodos de PCR utilizando oligonucleótidos bloqueadores, la interrupción eficiente de la amplificación mediada por polimerasa requiere que los oligonucleótidos bloqueadores no sean alargados por la polimerasa. Preferiblemente, esto se logra mediante el uso de los bloqueadores que son 3'desoxioligonucleótidos, u oligonucleótidos derivados en la posición 3' con un grupo diferente de hidroxilo "libre". Por ejemplo, oligonucleótidos 3'-O-acetilo son representativos de una clase preferida de molécula bloqueadora.
- 25 Adicionalmente, la descomposición mediada por polimerasa de los oligonucleótidos bloqueadores debería ser precluida. Preferiblemente, tal preclusión comprende bien sea el uso de una polimerasa que carece de actividad de 5'-3' exonucleasa, o el uso de oligonucleótidos bloqueadores modificados que tienen, por ejemplo, puentes tioato en los terminales 5' del mismo que hacen que la molécula de bloqueador sea resistente a la nucleasa. Aplicaciones particulares pueden no requerir tales modificaciones en 5' del bloqueador. Por ejemplo, si el bloqueador - y los sitios de enlazamiento del cebador se superponen, por lo tanto el enlazamiento precluyente del cebador (por ejemplo con
- 30 bloqueador en exceso), la degradación del oligonucleótido bloqueador será sustancialmente precluida. Esto se debe a que la polimerasa no extenderá el cebador hacia y a través de (en la dirección 5'-3') del bloqueador- un proceso que normalmente da como resultado la degradación del oligonucleótido bloqueador hibridado.
- Una realización del bloqueador /PCR particularmente preferida, para los propósitos de la presente divulgación y tal como es implementada aquí, comprende el uso de oligómeros de ácido nucleico peptídico (PNA) tales como oligonucleótidos bloqueadores. Tales oligómeros bloqueadores PNA son adecuados idealmente, puesto que ni son descompuestos ni extendidos por la polimerasa.
- 35 Preferiblemente, por lo tanto, la secuencia bases de dichos oligonucleótidos bloqueadores se requiere para comprender una secuencia que tiene una longitud de al menos 9 nucleótidos que hibridan con una secuencia de ácido nucleico tratado de acuerdo con una de las SEQ ID NO: 21-40 y 61-80 o regiones preferidas de los mismos de acuerdo con SEQ ID NO: 41-60 y 81-100 y las secuencias complementarias de las mismas, en donde la secuencia bases de dichos oligonucleótidos comprende al menos un dinucleótido CpG, TpG o CpA. Se prefiere particularmente que la secuencia bases de dichos oligonucleótidos de bloqueo es requerido para comprender una secuencia que tiene una longitud de al menos 9 nucleótidos que hibridan a una secuencia de ácido nucleico tratado
- 40 de acuerdo con una de las SEQ ID NO: 61-80 o regiones preferidas de las mismas de acuerdo con la SEQ ID NO: 81-100 y secuencias complementarias de las mismas, en donde la secuencia bases de dichos oligonucleótidos comprende al menos un dinucleótido TpG o CpA.
- Los fragmentos obtenidos por medio de la amplificación pueden llevar un marcador directa o indirectamente detectable. Se prefieren marcadores en la forma de marcadores fluorescentes, radionúclidos o fragmentos de moléculas desprendibles que tienen una masa típica que puede ser detectada en un espectrómetro de masas. Cuando dichos marcadores son marcadores de masa, se prefiere que los amplificados marcados tengan una carga neta individual positiva o negativa, permitiendo una mejor detección en el espectrómetro de masas. La detección puede llevarse a cabo y visualizarse por medio de, por ejemplo, espectrometría de masas de matriz de desorción/ionización asistida por láser (MALDI) o utilizando espectrometría de masas con aspersión de electrones
- 50 (ESI).
- 55 La espectrometría de masas de matriz de desorción/ionización asistida por (MALDI-TOF) es un desarrollo muy eficiente para el análisis de biomoléculas (Karas & Hillenkamp, Anal Chem., 60:2299-301, 1988). Un analito es embebido en una matriz absorbente de luz. La matriz es evaporada mediante un pulso corto de láser transportando así la molécula del analito hacia la fase de vapor de una manera no fragmentada. El analito es ionizado por colisiones con moléculas de la matriz. Un voltaje aplicado acelera los iones hacia un tubo de vuelo libre de campo.
- 60

Debido a sus diferentes masas, los iones son acelerados a diferentes velocidades. Los iones más pequeños alcanzan el detector más pronto que los más grandes. La espectrometría MALDI-TOF es muy adecuada para el análisis de péptidos y proteínas. El análisis de ácidos nucleicos es de alguna manera más difícil (Gut & Beck, Current Innovations and Future Trends, 1:147-57, 1995). La sensibilidad con respecto al análisis de ácidos nucleicos es aproximadamente 100 veces menos que para péptidos, y disminuye de manera no proporcional con el incremento del tamaño del fragmento. Además, para ácidos nucleicos que tienen un esqueleto cargado negativamente de manera múltiple, el proceso de ionización a través de la matriz es considerablemente menos eficiente. En la espectrometría MALDI-TOF, la selección de la matriz juega un papel eminentemente importante. Para la desorción de péptidos, se han encontrado varias matrices muy eficientes que producen una cristalización muy fina. Hay ahora varias matrices que responden al ADN, sin embargo, la diferencia en sensibilidad entre los péptidos y los ácidos nucleicos no ha sido reducida. Esta diferencia en sensibilidad puede ser reducida, sin embargo, modificando químicamente el ADN de tal manera que se haga más similar a un péptido. Por ejemplo, los ácidos nucleicos fosforotioato, en los cuales los fosfatos usuales del esqueleto son sustituidos con tiofosfatos, pueden ser convertidos en un ADN de carga neutra utilizando química de alquilación sencilla (Gut & Beck, Nucleic Acids Res. 23: 1367-73, 1995). El acoplamiento de una etiqueta de carga a este ADN modificado da como resultado un incremento en la sensibilidad por MALDI-TOF al mismo nivel que la encontrada para péptidos. Una ventaja adicional de la marcación de carga es el aumento de la estabilidad del análisis contra las impurezas, que hace la detección de sustratos no modificados considerablemente más difícil.

En el cuarto paso del método, los amplificadores obtenidos durante el tercer paso del método se analizan con el fin de determinar el estatus de metilación de los dinucleótidos CpG antes del tratamiento.

En realizaciones en las que los amplificadores fueron obtenidos por medio de la amplificación MSP, la presencia, ausencia o la clase de un amplificador es por sí misma indicativa del estado de metilación de las posiciones CpG cubiertas por el cebador, de acuerdo con las secuencias bases de dicho cebador.

Los amplificadores obtenidos por medio del estándar y PCR específica de metilación pueden analizarse adicionalmente por medio de métodos basados en la base tales como, pero no limitado a las tecnologías, la tecnología de matriz y basada en sonda, así como por medio de técnicas tales como la secuenciación y la extensión de la plantilla dirigida.

En una realización del método, los amplificadores sintetizados en el paso tres se hibridan posteriormente a un arreglo o un conjunto de oligonucleótidos y/o sondas de PNA. En este contexto, la hibridación se lleva a cabo de la siguiente manera: el conjunto de sondas usadas durante la hibridación está compuesto preferiblemente de al menos 2 oligonucleótidos o oligómeros de PNA; en el proceso, los amplificadores sirven como sondas que se hibridan con oligonucleótidos previamente unidos a una fase sólida; los fragmentos no hibridados se eliminan posteriormente; dichos oligonucleótidos contienen al menos una secuencia base que tiene una longitud de al menos 9 nucleótidos que es complementaria inversa o idéntica a un segmento de las secuencias bases especificadas en el presente listado de secuencias; y el segmento comprende al menos un dinucleótido CpG, TpG o CpA. La porción de hibridación de los ácidos nucleicos de hibridación es típicamente de al menos 9, 15, 20, 25, 30 o 35 nucleótidos de longitud. Sin embargo, las moléculas más largas tienen utilidad, y están así dentro del alcance de la presente divulgación.

En una realización preferida, dicho dinucleótido está presente en el tercio central del oligómero. Por ejemplo, en donde el oligómero comprende un dinucleótido CpG, dicho dinucleótido es preferiblemente el quinto a noveno nucleótido desde el extremo 5' de un 13-mer. Existe un oligonucleótido para el análisis de cada dinucleótido CpG dentro de una secuencia seleccionada del grupo que consiste de SEQ ID NO: 1-10 o regiones preferidas de las mismas de acuerdo con SEQ ID NO: 11-20, y las posiciones equivalentes dentro de SEQ ID NO: 21-40 y 61-80 o regiones preferidas de las mismas de acuerdo con SEQ ID NO: 41-60 y 81-100. Dichos oligonucleótidos también pueden estar presentes en forma de ácidos nucleicos peptídicos. Los amplificadores no hibridados son entonces eliminados. Los amplificadores hibridados son entonces detectados. En este contexto, se prefiere que los marcadores unidos a los amplificadores sean identificables en cada posición de la fase sólida en la que se encuentra una secuencia de oligonucleótidos.

En aún una realización adicional del método, el estatus de metilación genómica de las posiciones de CpG puede determinarse por medio de sondas de oligonucleótidos (como se detalló más arriba) que se hibridan con el ADN tratado con bisulfito concurrentemente con los cebadores de amplificación por PCR (en donde dichos cebadores pueden ser o bien específicos de metilación o estándar).

Una realización particularmente preferida de este método es el uso de PCR Cuantitativa en Tiempo Real basada en fluorescencia; (Heid et al, Genome Res 6 986-994, 1996 véase también la Patente de Estados Unidos N° 6,331,393) que emplea una sonda de oligonucleótido fluorescente de marcado dual (PCR TaqMan™, utilizando un sistema ABI Prism 7700 de Detección de Secuencias, Perkin Elmer Applied Biosystems, Foster City, California). La reacción PCR TaqMan™ emplea el uso de un oligonucleótido de interrogación no extensible, llamado sonda TaqMan™, que, en realizaciones preferidas, está diseñada para hibridar con una secuencia rica en CpG situada entre los cebadores de amplificación de avance y reverso. La sonda TaqMan™ comprende además una "unidad estructural informadora"

fluorescente y una " unidad estructural de detención" unida covalentemente a unidades estructurales enlazantes (por ejemplo, fosforamiditas) unidas a los nucleótidos del oligonucleótido TaqMan™. Para el análisis de metilación dentro de los ácidos nucleicos posteriores al tratamiento con bisulfito, se requiere que la sonda sea específica de metilación, tal como se describe en la Patente de Estados Unidos No. 6,331,393, (incorporada aquí por referencia en su totalidad) también conocida como el ensayo de MethyLight™. Las variaciones en la metodología de detección TaqMan™, que también son adecuadas para uso con la invención descrita incluyen el uso de tecnología de sonda dual (LightCycler™) o cebadores de amplificación fluorescentes (tecnología de Sunrise™). Ambas técnicas se pueden adaptar de una manera adecuada para el uso con ADN tratado con bisulfito, y por otra parte para el análisis de metilación dentro de los dinucleótidos CpG.

10 En una realización preferida adicional del método, el cuarto paso del método comprende el uso de la extensión de oligonucleótidos dirigido por plantilla, tal como MS-SNuPE como se describe por Gonzalzo and Jones, Nucleic Acids Res. 25: 2529-2531, 1997.

15 En aún una realización adicional del método, El cuarto paso del método comprende la secuenciación y posterior análisis de la secuencia del amplificado generado en el tercer paso del método (Sanger F., et al, Proc Natl Acad Sci EE.UU. 74: 5463- 5467, 1977).

En la realización más preferida del método de los ácidos nucleicos genómicos se aíslan y se tratan de acuerdo con los tres primeros pasos del método delineados más arriba, a saber:

a) obtener, de un sujeto, una muestra biológica que tiene ADN genómico del sujeto;

b) extraer o de otra manera aislar el ADN genómico;

20 c) tratar el ADN genómico de b), o un fragmento del mismo, con uno o más reactivos para convertir las bases de citosina que están sin metilar en la posición 5 del mismo en uracilo o en otra base que sea detectablemente diferente a la citosina en términos de propiedades de hibridación; y en donde

d) la amplificación posterior al tratamiento en c) se lleva a cabo de una manera específica de metilación, es decir, mediante el uso de cebadores específicos de metilación o de oligonucleótidos bloqueadores, y además en donde

25 e) la detección de los amplificados se realiza por medio de una sonda de detección en tiempo real, como se describe más arriba.

Preferiblemente, cuando la amplificación posterior de d) se lleva a cabo por medio de cebadores específicos de metilación, como se describió anteriormente, dichos cebadores específicos de metilación comprenden una secuencia que tiene una longitud de al menos 9 nucleótidos que hibrida con una secuencia de ácido nucleico tratado de acuerdo con una de SEQ ID NO: 21-40 y 61-80 o regiones preferidas de las mismas de acuerdo con SEQ ID NO: 30 41-60 y 81-100 y las secuencias complementarias de las mismas, en donde la secuencia base de dichos oligómeros comprenden al menos un dinucleótido CpG.

Paso e) del método, a saber, la detección de los amplificados específicos indicativos del estatus de metilación de una o más posiciones de CpG de acuerdo con SEQ ID NO: 1-10, o regiones preferidas de las mismas de acuerdo con SEQ ID NO: 11- 20 se lleva por medio de los métodos de detección en tiempo real como se describió más arriba.

Análisis de enzimas de restricción sensibles a metilación

40 En una realización alternativa de la invención, el segundo paso descrito anteriormente puede llevarse a cabo por medio de análisis de enzimas de restricción sensibles a metilación o específicas de metilación. Se conocen métodos en la técnica en donde un reactivo de enzima de restricción sensible a la metilación, o una serie de reactivos de enzimas de restricción que comprende reactivos de la enzima de restricción sensible a la metilación que distingue entre dinucleótidos CpG metilados y no metilados dentro de una región objetivo se utilizan en la determinación de la metilación, por ejemplo, pero no limitado a DMH.

45 En una realización preferida, el ADN puede escindirse antes del tratamiento con enzimas de restricción sensibles a la metilación. Tales métodos son conocidos en la técnica y pueden incluir tanto medios físicos como enzimáticos. Particularmente preferido es el uso de uno o una pluralidad de enzimas de restricción que no son sensibles a la metilación, y cuyos sitios de reconocimiento son ricos en AT y no comprenden dinucleótidos CG. El uso de tales enzimas permite la conservación de las islas CpG y regiones ricas en CpG en el ADN fragmentado. Las enzimas de restricción no específicas de metilación se seleccionan preferiblemente del grupo que consiste de MseI, Bfal, Csp6I, 50 Tru1I, Tvu1I, Tru9I, Tvu9I, MaeI y XspI. Particularmente preferido es el uso de dos o tres de tales enzimas. Particularmente preferido es el uso de una combinación de MseI, Bfal y Csp6I.

El ADN fragmentado puede entonces ser ligado a los oligonucleótidos adaptadores con el fin de facilitar la amplificación enzimática subsiguiente. La ligación de oligonucleótidos a fragmentos de ADN de extremos despuntados y pegajosos se conoce en la técnica, y se lleva a cabo por medio de la desfosforilación de los extremos (por ejemplo, utilizando fosfatasa alcalina de ternera o de camarón) y la posterior ligación utilizando enzimas de ligasa (por ejemplo ligasa de ADN de T4) en la presencia de dATPs. Los oligonucleótidos adaptadores son típicamente de al menos 18 pares de bases de longitud.

En el tercer paso, el ADN (o fragmentos del mismo) se digiere entonces con una o más enzimas de restricción sensibles a la metilación. La digestión se lleva a cabo de tal manera que la hidrólisis del ADN en el sitio de restricción es informativo del estado de metilación de un dinucleótido CpG específico de al menos un gen seleccionado del grupo que consiste de CDO1; APC; BMPR1A; CTAGE5; CXCL12; NCR1; NFATC2; PAX9; POU4F3; y ZBTB16.

Preferiblemente, la enzima de restricción específica de metilación se selecciona del grupo que consiste de Bsi E1, Hga I, HinPI, Hpy99I, Ava I, Bce AI, Bsa HI, BsiI, BstUI, BshI236I, AclI, BstFNI, McrBC, Glai, Mvnl, HpaII (HapII), HhaI, AclI, SmaI, HinP1I, HpyCH4IV, y mezclas de dos o más de las enzimas anteriores. Se prefiere una mezcla que contenga las enzimas de restricción BstUI, HpaII, HpyCH4IV y HinP1I.

En el cuarto paso, que es opcional, pero una realización preferida, los fragmentos de restricción se amplifican. Esto se lleva a cabo preferiblemente usando una reacción en cadena de la polimerasa, dichos amplificadores pueden llevar marcadores detectables adecuados como se discutió anteriormente, a saber, los marcadores fluoróforo, radionucleidos y marcadores de masa. Particularmente preferida es la amplificación por medio de una enzima de amplificación y al menos dos cebadores que comprenden, en cada caso una secuencia contigua de al menos 16 nucleótidos de longitud que es complementaria a, o se hibrida bajo condiciones moderadamente rigurosas o rigurosas a una secuencia seleccionada del grupo que consiste de SEQ ID NO: 1-10, o regiones preferidas de las mismas de acuerdo con SEQ ID NO: 11-20, y complementos de las mismas. Preferiblemente, dicha secuencia contigua es al menos de 16, 20 o 25 nucleótidos de longitud. En una realización alternativa dichos cebadores pueden ser complementarios a los adaptadores enlazados a los fragmentos.

En el quinto paso se detectan los amplificadores. La detección puede ser por cualquier medio estándar en la técnica, por ejemplo, pero no limitado a, análisis de electroforesis en gel, análisis de hibridación, incorporación de etiquetas detectables dentro de los productos de PCR, análisis de arreglo de ADN, análisis MALDI o ESI. Preferiblemente, dicha detección se lleva a cabo por hibridación a al menos un ácido nucleico o ácido nucleico peptídico que comprende en cada caso una secuencia contigua de al menos 16 nucleótidos de longitud que es complementaria a, o se hibrida bajo condiciones moderadamente rigurosas o rigurosas con una secuencia seleccionada del grupo que consiste de SEQ ID NO: 1-10, o regiones preferidas de las mismas de acuerdo con SEQ ID NO: 11-20, y complementos de las mismas. Preferiblemente, dicha secuencia contigua es de al menos 16, 20 o 25 nucleótidos de longitud.

Subsecuente con la determinación del estado de metilación o el nivel de los ácidos nucleicos genómicos el pronóstico de un sujeto que tiene trastorno proliferativo celular, preferiblemente cáncer, se deduce con base al estado de metilación o nivel de al menos una secuencia de dinucleótido CpG de CDO1; APC; BMPR1A; CTAGE5; CXCL12; NCR1; NFATC2; PAX9; POU4F3; y ZBTB16, o un promedio, o un valor que refleja un estado promedio de metilación de una pluralidad de secuencias de dinucleótidos CpG de la SEQ ID NO: 1-10, o regiones preferidas de las mismas de acuerdo con SEQ ID NO: 11-20, en donde la metilación se asocia con la pronóstico de un sujeto que tiene trastorno proliferativo celular, preferiblemente cáncer. Dicha metilación está en particular asociada con el pronóstico del sujeto posterior a una terapia que comprende al menos una antraciclina. En donde dicha metilación se determina por medios cuantitativos al punto de corte para determinar que dicha presencia de metilación sea preferiblemente cero (es decir, en donde una muestra despliega cualquier grado de metilación se determina como que tiene un estatus metilado en la posición de CpG analizada). No obstante, se prevé que el experto en la técnica puede desear ajustar dicho valor de corte con el fin de proveer un ensayo de una sensibilidad o especificidad particularmente preferida. De acuerdo con lo anterior dicho valor de corte se puede aumentar (aumentando así la especificidad), dicho valor de corte puede estar dentro de un rango seleccionado del grupo que consiste de 0%-5%, 5%-10%, 10%-15%, 15%-20%, 20%-30% and 30%-50%. Particularmente preferidos son puntos de corte que son al menos 0.1 %, 1 %, 10%, 15%, 25%, y 30%.

Tras la determinación de la metilación y/o la expresión del al menos un gen seleccionado del grupo que consiste de CDO1; APC; BMPR1A; CTAGE5; CXCL12; NCR1; NFATC2; PAX9; POU4F3; y ZBTB16 se determina el pronóstico del sujeto. La metilación, hipermetilación y/o subexpresión de los genes APC; BMPR1A; CDO1; CTAGE5; CXCL12; PAX9; POU4F3; y ZBTB16 indica un pronóstico negativo de dicho sujeto en comparación con sujetos que presentan cero metilación, hipometilación y/o sobreexpresión. Por el contrario, la metilación, hipermetilación y/o subexpresión de los genes NCR1; NFATC2; indica un pronóstico positivo de dicho sujeto en comparación con sujetos que presentan cero metilación, hipometilación y/o sobreexpresión.

Tal como se utiliza aquí, el término "pronóstico" se tomará en el sentido de un indicador de la progresión predicha de la enfermedad (incluyendo pero no limitado a la agresividad y el potencial metastásico) y/o predecir el tiempo de supervivencia del paciente.

5 En el contexto de la presente invención se toma el término "agresividad" se toma para significar una o más de alta probabilidad de recaída después de la cirugía; por debajo del promedio o por debajo de la mediana de supervivencia del paciente; por debajo del promedio o por debajo de la media de supervivencia libre de enfermedad; por debajo del promedio o por debajo de la media de supervivencia libre de recaída; por encima del promedio de complicaciones relacionadas con el tumor; rápida progresión de tumor o metástasis.

10 A menos que se indique otra cosa, tal como se usa aquí, el término "supervivencia" se entiende que incluye todas las características siguientes: la supervivencia hasta la mortalidad, también conocida como la supervivencia global (en donde dicha mortalidad puede ser cualquiera, independientemente de la causa o relacionado con un tumor); "La supervivencia libre de recurrencia" (donde el término recurrencia incluirá tanto la recurrencia localizada como la distante); la supervivencia libre de metástasis; supervivencia libre de enfermedad (en donde el término enfermedad incluirá el cáncer y enfermedades asociadas con el mismo). La longitud de dicha supervivencia puede ser calculada
15 por referencia a un punto de inicio definido (por ejemplo, momento del diagnóstico o inicio del tratamiento) y el punto final (por ejemplo, la muerte, la recurrencia o metástasis).

Mejoras adicionales

20 La divulgación se refiere a los ácidos nucleicos tratados, derivados de SEQ ID NO: 1-10 genómicas, o regiones preferidas de las mismas de acuerdo con SEQ ID NO: 11- 20, en donde el tratamiento es adecuado para convertir al menos una base de citosina no metilada de la secuencia de ADN genómico a uracilo u otra base que sea detectable diferente a la citosina en términos de la hibridación. Las secuencias genómicas en cuestión pueden comprender una o más posiciones CpG metiladas consecutivas. Dicho tratamiento comprende preferiblemente el uso de un reactivo seleccionado del grupo que consiste de bisulfito, sulfito de hidrógeno, disulfito, y sus combinaciones. En una
25 realización preferida, la divulgación se relaciona con un ácido nucleico modificado de origen no natural que comprende una secuencia de al menos 16 bases de nucleótidos contiguos en longitud de una secuencia seleccionada del grupo que consiste de SEQ ID NO: 21-40 y 61-80 o regiones preferidas de las mismas de acuerdo con SEQ ID NO: 41-60 y 81-100. En realizaciones preferidas adicionales de la divulgación dicho ácido nucleico es al menos de 50, 100, 150, 200, 250 o 500 pares de bases de longitud de un segmento de la secuencia de ácido nucleico divulgada en la SEQ ID NO: 21-40 y 61-80 o regiones preferidas de las mismas de acuerdo con SEQ ID
30 NO: 41-60 y 81-100. Se prefiere particularmente una molécula de ácido nucleico que sea idéntica o complementaria a toda o una porción de las secuencias de SEQ ID NO: 21-40 y 61-80 o regiones preferidas de las mismas de acuerdo con SEQ ID NO: 41-60 y 81-100, pero no de SEQ ID NO: 1-10, o regiones preferidas de las mismas de acuerdo con SEQ ID NO: 11- 20 u otro ADN de origen natural.

35 Se prefiere que dicha secuencia comprenda al menos un dinucleótido CpG, TpA o CpA y secuencias complementarias a la misma. Las secuencias de SEQ ID NO: 21-40 y 61-80 o regiones preferidas de las mismas de acuerdo con SEQ ID NO: 41-60 y 81-100 proveen versiones modificadas de origen no natural del ácido nucleico de acuerdo con SEQ ID NO: 1- 10 o regiones preferidas de las mismas de acuerdo con SEQ ID NO: 11-20, en donde la modificación de cada secuencia genómica da como resultado la síntesis de un ácido nucleico que tiene una
40 secuencia que es única y distinta de dicha secuencia genómica de la siguiente manera. Para cada ADN genómico de cadena en sentido, por ejemplo, SEQ ID NO: 1-10, o regiones preferidas de las mismas de acuerdo con SEQ ID NO: 11-20, se divulgan cuatro versiones convertidas. Una primera versión en donde "C" se convierte en "T", pero "CpG" sigue siendo "CpG" (es decir, corresponde al caso en el que, para la secuencia genómica, todos los residuos de "C" de secuencias de dinucleótidos CpG están metilados y por lo tanto no son convertidos); una segunda versión divulga el complemento de la secuencia de ADN genómico divulgado (es decir, cadena antisentido), en donde "C" se
45 convierte en "T", pero "CpG" sigue siendo "CpG" (es decir, corresponde al caso donde, para todos los residuos de "C" de las secuencias de dinucleótidos CpG están metilados y por consiguiente no se convierten). Las secuencias convertidas submetiladas de SEQ ID NO: 1-10, o regiones preferidas de las mismas de acuerdo con SEQ ID NO: 11-20 corresponden a la SEQ ID NO: 21-40 o regiones preferidas de las mismas de acuerdo con SEQ ID NO: 41-60. Se provee una tercera versión químicamente convertida de cada una de las secuencias genómicas, en donde "C" se
50 convierte en "T" para todos los residuos de "C", incluyendo los de las secuencias de dinucleótidos "CpG" (es decir, corresponde al caso en el que, para las secuencias genómicas, todos los residuos de "C" de secuencias de dinucleótidos CpG son no metilados); una versión químicamente convertida final del cada secuencia, divulga el complemento de la secuencia de ADN genómico divulgado (es decir, cadena antisentido), en donde "C" se convierte
55 en "T" para todos los residuos de "C", incluyendo los de las secuencias de dinucleótidos "CpG" (es decir, corresponde al caso en que, por el complemento (cadena antisentido) de cada secuencia genómica, todos los residuos de "C" de secuencias de dinucleótidos CpG son no metilados). Las secuencias convertidas "submetiladas" de SEQ ID NO: 1-10, o regiones preferidas de las mismas de acuerdo con SEQ ID NO: 11- 20 corresponden con la SEQ ID NO: 61-80 o regiones preferidas de las mismas de acuerdo con SEQ ID NO: 81-100 .

De manera significativa, hasta ahora, las secuencias de ácidos nucleicos y moléculas de acuerdo con SEQ ID NO: 21-40 y 61-80 o regiones preferidas las mismas de acuerdo con SEQ ID NO: 41-60 y 81-100 no fueron implicadas en o conectados con el pronóstico de un sujeto que tiene trastorno proliferativo celular, preferiblemente cáncer.

5 En una realización preferida alternativa, la divulgación se refiere además a oligonucleótidos u oligómeros adecuados para uso en los métodos de la divulgación para la detección del estado de metilación de citosina dentro del ADN genómico o tratado (modificado químicamente), de acuerdo con SEQ ID NO: 1-100. Dichos ácidos nucleicos de oligonucleótidos u oligómeros proveen novedosos medios de pronóstico y/o predictivos. Dicho oligonucleótido u oligómero que comprende una secuencia de ácido nucleico que tiene una longitud de al menos nueve (9) nucleótidos que es idéntica a, se hibrida, bajo condiciones moderadamente rigurosas o rigurosas (como se define aquí anteriormente), a una secuencia de ácido nucleico tratado de acuerdo con SEQ ID NO: 21-40 y 61-80 o regiones preferidas de las mismas de acuerdo con SEQ ID NO: 41-60 y 81-100 y/o secuencias complementarias de las mismas, o a una secuencia genómica de acuerdo con SEQ ID NO: 1-10, o regiones preferidas de las mismas de acuerdo con SEQ ID NO: 11-20 y/o secuencias complementarias de las mismas.

15 Así, la presente divulgación incluye moléculas de ácido nucleico (por ejemplo, oligonucleótidos y moléculas de ácidos nucleicos peptídicos (PNA) (PNA-oligómeros) que se hibridan bajo condiciones de hibridación moderadamente rigurosas y/o rigurosas a toda o una porción de las secuencias de SEQ ID NO: 1-100 o a los complementos de las mismas. Se prefiere particularmente una molécula de ácido nucleico que hibrida bajo condiciones de hibridación moderadamente rigurosas y/o rigurosas a toda o una porción de las secuencias de SEQ ID NO: 21-40 y 61-80 o regiones preferidas de las mismas de acuerdo con SEQ ID NO: 41-60 y 81-100, pero no SEQ ID NO: 1-10, o regiones preferidas de las mismas de acuerdo con SEQ ID NO: 11- 20 u otro ADN genómico humano.

La porción idéntica o de hibridación de los ácidos nucleicos de hibridación es típicamente de al menos 9, 16, 20, 25, 30 o 35 nucleótidos de longitud. Sin embargo, las moléculas más largas tienen la utilidad, y por lo tanto están dentro del alcance de la presente divulgación.

25 Preferiblemente, la porción de hibridación de los ácidos nucleicos de hibridación divulgadas es al menos 95%, o al menos 98%, o 100% idéntica a la secuencia, o a una porción de la misma de la SEQ ID NO: 1-100, o a los complementos de las mismas.

30 La hibridación de ácidos nucleicos del tipo descrito aquí se pueden utilizar, por ejemplo, como un cebador (por ejemplo, un cebador de PCR), o una sonda o cebador de pronóstico y/o predictivo. Preferiblemente, la hibridación de la sonda de oligonucleótido a una muestra de ácido nucleico se realiza bajo condiciones rigurosas y la sonda es 100% idéntica a la secuencia objetivo. El dúplex de ácido nucleico o la estabilidad del híbrido se expresa como la temperatura de fusión o T_m , que es la temperatura a la que una sonda se disocia de un ADN objetivo. Esta temperatura de fusión se utiliza para definir las condiciones de rigurosidad requeridas.

35 Para secuencias objetivo que están relacionados y son sustancialmente idénticas a la secuencia correspondiente de la SEQ ID NO: 1-10, o regiones preferidas de las mismas de acuerdo con SEQ ID NO: 11- 20 (tal como variantes alélicas y SNP), en lugar de idénticas, es útil establecer primero la temperatura más baja a la que sólo se produce la hibridación homóloga con una concentración particular de sal (por ejemplo, SSC o SSPE). Luego, suponiendo que el 1% de resultados no coincidentes en un 1°C disminuye en la T_m , la temperatura del lavado final en la reacción de hibridación se reduce en consecuencia (por ejemplo, si las secuencias que tienen > 95% de identidad con la sonda son buscadas, la temperatura de lavado final se reduce en 5°C). En la práctica, el cambio en la T_m puede estar entre 0.5°C y 1.5°C por 1% no coincidente.

45 Ejemplos de oligonucleótidos divulgados de longitud X (en nucleótidos), según lo indicado por las posiciones de polinucleótido con referencia a, por ejemplo, SEQ ID NO: 1, incluyen los correspondientes a los conjuntos (conjuntos en sentido y antisentido) de oligonucleótidos consecutivamente superpuestos de longitud X, donde los oligonucleótidos dentro de cada conjunto e superposición consecutivamente (que corresponde a un valor dado X) se definen como el conjunto finito de oligonucleótidos Z de las posiciones de nucleótidos: n a (n + (X-1)); donde n = 1, 2, 3, ... (Y-(X-1)); donde Y es igual a la longitud (nucleótidos o pares de bases) de la SEQ ID NO: 1 (18012); donde X es igual a la longitud común (en nucleótidos) de cada oligonucleótido en el conjunto (por ejemplo, X = 20 para un conjunto de 20-meros superpuestos consecutivamente); y donde el número (Z) de oligómeros superpuestos consecutivamente de longitud X para una SEQ ID NO: 1 dada de longitud Y es igual a Y - (X-1). Por ejemplo Z = 18012-19 = 17993, ya sea para conjuntos en sentido o antisentido de SEQ ID NO: 1, donde X = 20.

Preferiblemente, el conjunto se limita a los oligómeros que comprenden al menos un dinucleótido CpG, TpG o CpA.

55 Ejemplos de oligonucleótidos divulgados de 20-meros incluyen el siguiente conjunto de 17993 oligómeros (y el conjunto antisentido complementaria del mismo), indicado por las posiciones de polinucleótido con referencia a SEQ ID NO: : 1: 1-20, 2-21, 3-22, 4-23, 5-24, y 17993 – 18012.

Preferiblemente, el conjunto se limita a los oligómeros que comprenden al menos un dinucleótido CpG, TpG o CpA.

Igualmente, ejemplos de oligonucleótidos divulgados de 25-meros incluyen el siguiente conjunto de 17988 oligómeros (y el conjunto antisentido complementario al mismo), indicado por las posiciones de polinucleótido con referencia a SEQ ID NO: 1: 1-25, 2-26, 3-27, 4- 28, 5-29, y 17988 - 18012. Preferiblemente, el conjunto se limita a aquellos oligómeros que comprenden al menos un dinucleótido CpG, TPG o CPA.

- 5 La presente divulgación abarca, para cada una de SEO ID NO: 1-100 (sentido y antisentido), múltiples conjuntos superpuestos consecutivamente de oligonucleótidos u oligonucleótidos modificados de longitud X, donde, por ejemplo, X = 9, 10, 17, 20, 22, 23, 25, 27, 30 o 35 nucleótidos.

10 Los oligonucleótidos u oligómeros de acuerdo con la presente divulgación constituyen herramientas efectivas útiles para comprobar los parámetros genéticos y epigenéticos de la secuencia genómica correspondiente a la SEQ ID NO: 1-10, o regiones preferidas de las mismas de acuerdo con SEQ ID NO: 11-20. Conjuntos preferidos de tales oligonucleótidos u oligonucleótidos modificados de longitud X son aquellos conjuntos superpuestos consecutivamente de oligómeros correspondientes a SEQ ID NO: 1-100 (y a los complementos de las mismas). Preferiblemente, dichos oligómeros comprenden al menos un dinucleótido CpG, TpG o CpA.

15 Oligonucleótidos u oligómeros particularmente preferidos de acuerdo con la presente divulgación son aquellos en los que la citosina de la secuencia del dinucleótido CpG (o del correspondiente dinucleótido TpG o CpA convertido) está dentro del tercer medio del oligonucleótido; es decir, donde el oligonucleótido es, por ejemplo, 13 bases de longitud, el dinucleótido CpG, TpG o CpA se posiciona dentro del quinto al noveno nucleótido desde el extremo 5'.

20 Los oligonucleótidos de la divulgación también pueden ser modificados por el enlazamiento de forma química del oligonucleótido a una o más unidades estructurales o conjugados para mejorar la actividad, estabilidad o detección del oligonucleótido. Tales unidades estructurales o conjugados incluyen cromóforos, fluoróforos, lípidos tales como colesterol, ácido cólico, tioéter, cadenas alifáticas, fosfolípidos, poliaminas, polietilenglicol (PEG), unidades estructurales de palmitilo, y otros como se divulga en, por ejemplo, las Patentes de Estados Unidos 5,514,758, 5,565,552, 5,567,810, 5,574,142, 5,585,481, 5,587,371, 5,597,696 y 5,958,773. Las sondas también pueden existir en la forma de un PNA (ácido nucleico peptídico) que tenga propiedades de apareamiento particularmente preferidas. Por lo tanto, el oligonucleótido puede incluir otros grupos adjuntos tales como péptidos, y puede incluir agentes de escisión desencadenados por hibridación (Krol et al, BioTechniques 6:958-976, 1988) o agentes intercalantes (Zon, Pharm Res 5: 539- 549, 1988). Con este fin, el oligonucleótido puede ser conjugado a otra molécula, por ejemplo, un cromóforo, fluoróforo, péptido, agente de entrecruzamiento desencadenado por hibridación, agente de transporte, agente de escisión desencadenado por hibridación, etc.

30 El oligonucleótido puede comprender también al menos un azúcar modificado y/o unidad estructural base reconocido en la técnica, o puede comprender un esqueleto modificado o enlazamiento internucleósidos de origen no natural. Los oligonucleótidos u oligómeros de acuerdo con realizaciones particulares de la presente divulgación se utilizan típicamente en "conjuntos", que contienen al menos un oligómero para el análisis de cada uno de los dinucleótidos CpG de una secuencia genómica seleccionado del grupo que consiste de SEQ ID NO: 1-10 , o regiones preferidas de las mismas de acuerdo con SEQ ID NO: 11- 20 y secuencias complementarias de las mismas, o a los correspondientes dinucleótido CpG, TpG o CpA dentro de una secuencia de los ácidos nucleicos tratados de acuerdo con SEQ ID NO: 21-40 y 61-80 o regiones preferidas de las mismas de acuerdo con SEQ ID NO: 41-60 y 81-100 y las secuencias complementarias de las mismas. Sin embargo, se anticipa que por factores económicos u otros factores puede ser preferible analizar una selección limitada de los dinucleótidos CpG dentro de dichas secuencias, y el contenido del conjunto de oligonucleótidos se altera en consecuencia.

45 Por lo tanto, en realizaciones particulares, la presente divulgación se relaciona con un conjunto de al menos dos (2) (oligonucleótidos y/o PNA-oligómeros) útiles para detectar el estado de metilación de citosina en el ADN genómico tratado (SEQ ID NO: 21-40 y 61-80 o regiones preferida de las mismas de acuerdo con SEQ ID NO: 41-60 y 81-100), o en el ADN genómico (SEQ ID NO: 1-10, o regiones preferida de las mismas de acuerdo con SEQ ID NO: 11-20 y secuencias complementarias de las mismas) . Estas sondas permiten la determinación del pronóstico de un sujeto que tiene trastorno proliferativo celular, preferiblemente cáncer. El conjunto de oligómeros también se puede utilizar para la detección de polimorfismos de nucleótido individual (SNP) en el ADN genómico tratado (SEQ ID NO: 21-40 y 61-80 o regiones preferidas de las mismas de acuerdo con SEQ ID NO: 41-60 y 81-100) o en el ADN genómico (SEQ ID NO: 1-10, o regiones preferidas de las mismas de acuerdo con SEQ ID NO: 11- 20 y secuencias complementarias de las mismas).

50 En realizaciones preferidas, al menos uno, y más preferiblemente todos los miembros de un conjunto de oligonucleótidos está unido a una fase sólida.

55 En realizaciones adicionales, la presente divulgación se relaciona con un conjunto de al menos dos (2) oligonucleótidos que se usan como oligonucleótidos "cebadores" para amplificar secuencias de ADN de una de las SEQ ID NO: 1-100 y las secuencias complementarias de las mismas, o segmentos de las mismas.

Se anticipa que los oligonucleótidos pueden constituir todo o parte de un "arreglo" o "chip de ADN" (es decir, una disposición de diferentes oligonucleótidos y/o PNA-oligómeros unidos a una fase sólida). Tal arreglo de diferentes

oligonucleótidos y/o secuencias de PNA-oligómeros puede ser caracterizado, por ejemplo, en que está dispuesto sobre la fase sólida en forma de un red rectangular o hexagonal. La superficie en fase sólida puede estar compuesta de silicio, vidrio, poliestireno, aluminio, acero, hierro, cobre, níquel, plata, u oro. También se pueden utilizar la nitrocelulosa así como plásticos tales como nailon, que pueden existir en la forma de pellas o también como matrices de resina. Una visión general de la Técnica Anterior en la fabricación de arreglos de oligómeros puede ser reunida de una edición especial de la revista Nature Genetics (Nature Genetics Supplement, Volumen 21, enero de 1999, y de la literatura allí citada). Sondas marcadas fluorescentemente se utilizan frecuentemente para la exploración de arreglos de ADN inmovilizados. La simple unión de colorantes Cy3 y Cy5 al extremo 5'-OH de la sonda específica es particularmente adecuada para marcadores de fluorescencia. La detección de la fluorescencia de las sondas hibridadas puede llevarse a cabo, por ejemplo, a través de un microscopio confocal. Los colorantes Cy3 y Cy5, además de muchos otros, están disponibles comercialmente.

También se anticipa que los oligonucleótidos, o secuencias particulares de los mismos, pueden constituir la totalidad o parte de un "arreglo virtual" en donde se utilizan los oligonucleótidos, o secuencias particulares de los mismos, por ejemplo, como "especificadores" como parte de, o en combinación con una población diversa de sondas marcadas únicas para analizar una mezcla compleja de analitos. Tal método, por ejemplo se describe en US 2003/0013091 (número de serie de Estados Unidos 09/898,743, publicada el 16 de enero de 2003). En tales métodos, se generan suficientes marcadores de tal manera que cada ácido nucleico en la mezcla compleja (es decir, cada analito) puede unirse de forma única por un marcador único y por lo tanto ser detectado (cada marcador se cuenta directamente, dando como resultado una lectura digital de cada especie molecular en la mezcla).

Se prefiere particularmente que los oligómeros de acuerdo con la invención se utilicen para determinar el pronóstico de un sujeto que tiene trastorno proliferativo celular, preferiblemente cáncer. Además, se prefiere particularmente que los oligómeros de acuerdo con la invención se utilicen para determinar el pronóstico de dicho sujeto posterior a una terapia que comprende al menos una antraciclina.

Kits

Por otra parte, un aspecto adicional de la presente divulgación es un kit que comprende: un medio para determinar la metilación de al menos un gen seleccionado del grupo que consiste de CDO1; APC; BMPR1A; CTAGE5; CXCL12; NCR1; NFATC2; PAX9; POU4F3; y ZBTB16. Los medios para determinar la metilación de al menos un gen seleccionado del grupo que consiste de CDO1; APC; BMPR1A; CTAGE5; CXCL12; NCR1; NFATC2; PAX9; POU4F3; y ZBTB16 comprenden preferiblemente un reactivo que contiene bisulfito; uno o una pluralidad de oligonucleótidos que consisten cuyas secuencias en cada caso son idénticas, son complementarias, o se hibridan bajo condiciones rigurosas o altamente rigurosas a un segmento de al menos 9 o más preferiblemente 18 bases de largo de una secuencia seleccionada de SEQ ID NO: 21-40 y 61-80 o regiones preferidas de las mismas de acuerdo con SEQ ID NO: 41-60 y 81-100; y opcionalmente instrucciones para llevar a cabo y evaluar el método descrito de análisis de metilación. En una realización, la secuencia base de dichos oligonucleótidos comprende al menos un dinucleótido CpG, TpG o CpA.

En una realización adicional, dicho kit puede comprender además reactivos estándar para realizar un análisis de metilación específica de la posición de CpG, en donde dicho análisis comprende una o más de las siguientes técnicas: MS-SNuPE, MSP, MethyLight™, HeavyMethyl, COBRA, y secuenciación de ácido nucleico. Sin embargo, un kit junto con las líneas de la presente divulgación también puede contener solamente parte de los componentes antes mencionados.

En una realización preferida, el kit puede comprender reactivos de conversión con bisulfito adicionales seleccionados del grupo que consiste de: regulador de desnaturalización de ADN; regulador de sulfonación; reactivos de recuperación de ADN o kits (por ejemplo, precipitación, ultrafiltración, columna de afinidad); regulador de desulfonación; y componentes de recuperación de ADN.

En una realización alternativa adicional, el kit puede contener, empacados en recipientes separados, una polimerasa y un regulador de reacción optimizado para la extensión del cebador mediada por la polimerasa, tal como PCR. En otra realización de la divulgación el kit comprende además medios para obtener y/o almacenar una muestra biológica del sujeto. Se prefiere un kit, que comprenda además un recipiente adecuado para contener los medios para determinar la metilación de al menos un gen seleccionado del grupo que consiste de CDO1; APC; BMPR1A; CTAGE5; CXCL12; NCR1; NFATC2; PAX9; POU4F3; y ZBTB16 en la muestra biológica del sujeto, y lo más preferiblemente comprende además instrucciones para el uso y la interpretación de los resultados del kit. En una realización preferida, el kit comprende: (a) un reactivo de bisulfito; (b) un recipiente adecuado para contener dicho reactivo de bisulfito y la muestra biológica del sujeto; (c) al menos un conjunto de oligonucleótidos cebadores que contienen dos oligonucleótidos cuyas secuencias en cada caso son idénticas, son complementarias, o hibridan bajo condiciones rigurosas o altamente rigurosas a un segmento al menos de 9 o más preferiblemente 18 bases de largo de una secuencia seleccionada de SEQ ID NO: 21-40 y 61-80 o regiones preferidas de las mismas de acuerdo con SEQ ID NO: 41-60 y 81-100; y opcionalmente (d) instrucciones para el uso y la interpretación de los resultados del kit. En una realización preferida alternativa, el kit comprende: (a) un reactivo de bisulfito; (b) un recipiente adecuado para contener dicho reactivo de bisulfito y la muestra biológica del sujeto; (c) al menos un oligonucleótidos y/o PNA-

oligómero que tiene una longitud de al menos 9 o 16 nucleótidos que es idéntica a o se hibrida a una secuencia de ácido nucleico pretratado de acuerdo con una de las SEQ ID NO: 21 a 40 y 61 -80 o regiones preferidas de las mismas de acuerdo con SEQ ID NO: 41-60 y 81-100 y las secuencias complementarias de las mismas; y opcionalmente (d) instrucciones para el uso y la interpretación de los resultados del kit.

- 5 En una realización alternativa, el kit comprende: (a) un reactivo de bisulfito; (b) un recipiente adecuado para contener el dicho reactivo de bisulfito y la muestra biológica del sujeto; (c) al menos un conjunto de oligonucleótidos de cebador que contienen dos oligonucleótidos cuyas secuencias en cada caso son idénticas, son complementarias, o hibridan bajo condiciones rigurosas o altamente rigurosas a un segmento de al menos 9 o más preferiblemente 18 base de largo de una secuencia seleccionada de SEQ ID NO: 21-40 y 61-80 o regiones preferidas de las mismas de acuerdo con SEQ ID NO: 41-60 y 81-100; (d) al menos un oligonucleótidos y/o PNA-oligómero que tiene una longitud de al menos 9 o 16 nucleótidos que es idéntica a o se hibrida a una secuencia de ácido nucleico pretratado de acuerdo con una de las SEQ ID NO: 21 a 40 y 61 -80 o regiones preferidas de las mismas de acuerdo con SEQ ID NO: 41-60 y 81-100 y las secuencias complementarias de las mismas; y opcionalmente (e) las instrucciones de uso y la interpretación de los resultados del kit.
- 10
- 15 El kit también puede contener otros componentes tales como reguladores y soluciones adecuadas para el bloqueo, lavado o recubrimiento, empacados en un recipiente separado.

Otro aspecto de la divulgación se relaciona con un kit para su uso en la determinación del pronóstico de un sujeto que tiene trastorno proliferativo celular, preferiblemente cáncer, posterior a una terapia, dicho kit comprende: un medio para medir el nivel de transcripción de al menos un gen seleccionado de grupo que consiste de CDO1; APC; BMPR1A; CTAGE5; CXCL12; NCR1; NFATC2; PAX9; POU4F3; y ZBTB16 y un medio para determinar la metilación de al menos un gen seleccionado del grupo que consiste de CDO1; APC; BMPR1A; CTAGE5; CXCL12; NCR1; NFATC2; PAX9; POU4F3; y ZBTB16. Dicho kit es particularmente adecuado para determinar el pronóstico de un sujeto con posterioridad a una terapia que comprende al menos una antraciclina.

20

Los reactivos típicos (por ejemplo, como se podrían encontrar en un kit típico basado en COBRA™) para el análisis COBRA™ pueden incluir, pero no se limitan a: cebadores de PCR para al menos un gen seleccionado del grupo que consiste de enzimas de restricción CDO1; APC; BMPR1A; CTAGE5; CXCL12; NCR1; NFATC2; PAX9; POU4F3; y ZBTB16 y reguladores apropiado; oligonucleótido de hibridación de genes; oligonucleótidos de hibridación de control; kit de marcaje de quinasa para sonda de oligonucleótido; y nucleótidos marcados. Los reactivos típicos (por ejemplo, como se podría encontrar en un típico kit basado en MethyLight™) para el análisis MethyLight™ puede incluir, pero no se limitan a: cebadores de PCR para la secuencia convertida con bisulfito de al menos un gen seleccionado del grupo que consiste de sondas específicas de bisulfito CDO1 ; APC; BMPR1A; CTAGE5; CXCL12; NCR1; NFATC2; PAX9; POU4F3; y ZBTB16 (por ejemplo, TaqMan™ o LightCycler™); reguladores y desoxinucleótidos de PCR optimizados; y Taq polimerasa.

25

30

Reactivos típicos (por ejemplo, como se podría encontrar en un típico kit basado en Ms-SNuPE™) para el análisis Ms-SNuPE™ puede incluir, pero no se limitan a: cebadores de PCR para el gen específico (o secuencia de ADN tratada con bisulfito o isla CpG) ; reguladores y desoxinucleótidos de PCR optimizados; kit de extracción en gel; cebadores de control positivo; cebadores Ms-SNuPE™ para la secuencia convertida con bisulfito de al menos un gen seleccionado del grupo que consiste de reguladores de reacción CDO1; APC; BMPR1A; CTAGE5; CXCL12; NCR1; NFATC2; PAX9; POU4F3; y ZBTB16 reacción (para la reacción Ms-SNuPE); y nucleótidos marcados.

35

Reactivos típicos (por ejemplo, como podría encontrarse en un kit típico basado en MSP) para el análisis de MSP pueden incluir, pero no se limitan a: cebadores de PCR metilados y no metilados para la secuencia convertida con bisulfito de al menos un gen seleccionado del grupo que consiste de CDO1; APC; BMPR1A; CTAGE5; CXCL12; NCR1; NFATC2; PAX9; POU4F3; y ZBTB16, reguladores y desoxinucleótidos de PCR optimizados y sondas específicas.

40

Por otra parte, un aspecto adicional de la presente divulgación es un kit alternativo que comprende un medio para la determinación de al menos un gen seleccionado del grupo que consiste de metilación de CDO1; APC; BMPR1A; CTAGE5; CXCL12; NCR1; NFATC2; PAX9; POU4F3; y ZBTB16, en donde dichos medios comprenden preferiblemente al menos una enzima de restricción específica de metilación; uno o una pluralidad de oligonucleótidos cebadores (preferiblemente uno o una pluralidad de pares de cebadores) adecuados para la amplificación de una secuencia que comprende al menos un dinucleótido CpG de una secuencia seleccionada de SEQ ID NO: 1-10, o regiones preferidas de las mismas de acuerdo con SEQ ID NO: 11-20; y opcionalmente instrucciones para llevar a cabo y evaluar el método descrito de análisis de metilación. En una realización, la secuencia base de dichos oligonucleótidos son idénticos, son complementarias, o se hibridan bajo condiciones rigurosas o altamente rigurosas a un segmento de al menos, 18 bases de longitud de una secuencia seleccionada de SEQ ID NO: 1-10, o regiones preferidas de las mismas de acuerdo con SEQ ID NO: 11-20.

45

50

55

En una realización adicional, dicho kit puede comprender uno o una pluralidad de sondas de oligonucleótidos para el análisis de los fragmentos de digestión, preferiblemente dichos oligonucleótidos son idénticos, son complementarias, o se hibridan bajo condiciones rigurosas o altamente rigurosas a un segmento de al menos, 16 bases de largo de

una secuencia seleccionada de SEQ ID NO: 1-10, o regiones preferidas de las mismas de acuerdo con SEQ ID NO: 11-20.

5 En una realización preferida, el kit puede comprender reactivos adicionales seleccionados del grupo que consiste de: regulador (por ejemplo, enzimas de restricción, PCR, reguladores de almacenamiento o de lavado); reactivos de recuperación de ADN o kits (por ejemplo, precipitación, ultrafiltración, columna de afinidad) y componentes de recuperación de ADN.

10 En una realización alternativa adicional, el kit puede contener, empacados en recipientes separados, una polimerasa y un regulador de reacción optimizado para la extensión del cebador mediada por la polimerasa, tal como PCR. En otra realización de la invención, el kit comprende además medios para obtener y/o almacenar una muestra biológica del sujeto. En una realización preferida, el kit comprende: (a) un reactivo de enzima de restricción sensible a la metilación; (b) un recipiente adecuado para contener dicho reactivo y la muestra biológica del sujeto; (c) al menos un conjunto de oligonucleótidos de una o una pluralidad de ácidos nucleicos o ácidos nucleicos peptídicos que son idénticos, son complementarios, o se hibridan bajo condiciones rigurosas o altamente rigurosas a un segmento de al menos 9 bases de longitud de una secuencia seleccionada de SEQ ID NO: 1-10, o regiones preferidas de las mismas de acuerdo con SEQ ID NO: 11-20; y opcionalmente (d) instrucciones para el uso y la interpretación de los resultados del kit.

20 En una realización preferida alternativa, el kit comprende: (a) un reactivo de enzima de restricción sensible a la metilación; (b) un recipiente adecuado para contener dicho reactivo y la muestra biológica del sujeto; (c) al menos un conjunto de oligonucleótidos cebadores adecuados para la amplificación de una secuencia que comprende al menos un dinucleótido CpG de una secuencia seleccionada de SEQ ID NO: 1-10, o regiones preferidas de las mismas de acuerdo con SEQ ID NO: 11-20; y opcionalmente (d) instrucciones para el uso y la interpretación de los resultados del kit.

25 En una realización alternativa, el kit comprende: (a) un reactivo de enzima de restricción sensible a la metilación; (b) un recipiente adecuado para contener dicho reactivo y la muestra biológica del sujeto; (c) al menos un conjunto de oligonucleótidos cebadores adecuados para la amplificación de una secuencia que comprende al menos un dinucleótido CpG de una secuencia seleccionada de SEQ ID NO: 1-10, o regiones preferidas de las mismas de acuerdo con SEQ ID NO: 11-20; (d) al menos un conjunto de oligonucleótidos de una o una pluralidad de ácidos nucleicos o ácidos nucleicos peptídicos que son idénticos, son complementarios, o hibridan bajo condiciones rigurosas o altamente rigurosas a un segmento de al menos, 9 de base de longitud de una secuencia seleccionada de SEQ ID NO: 1-10, o regiones preferidas de las mismas de acuerdo con SEQ ID NO: 11-20 y, opcionalmente, (e) instrucciones para el uso y la interpretación de los resultados del kit.

El kit también puede contener otros componentes tales como reguladores y soluciones adecuadas para el bloqueo, lavado o recubrimiento, empacados en un recipiente separado.

35 La divulgación se refiere además a un kit para uso en la determinación del pronóstico de un sujeto que tiene trastorno proliferativo celular, preferiblemente cáncer, en un sujeto por medio de análisis de enzima de restricción sensible a la metilación. Dicho kit comprende un recipiente y un componente de microarreglos de ADN. Dicho kit es particularmente adecuado para determinar el pronóstico del sujeto con posterioridad a una terapia que comprende al menos una antraciclina. Siendo dicho componente de microarreglos de ADN una superficie sobre la cual una pluralidad de oligonucleótidos se inmovilizan en las posiciones designadas y en donde el oligonucleótido comprende al menos un sitio de metilación CpG. Al menos uno de dichos oligonucleótidos es específico para al menos un gen seleccionado del grupo que consiste de CDO1; APC; BMPR1A; CTAGE5; CXCL12; NCR1; NFATC2; PAX9; POU4F3; y ZBTB16 y comprende una secuencia de al menos 15 pares de bases de longitud, pero no más de 200 pb de una secuencia de acuerdo con una de SEQ ID NO: 1-10, o regiones preferidas las mismas de acuerdo con SEQ ID NO: 11-20. Preferiblemente, dicha secuencia es de al menos 15 pares de bases de longitud, pero no más de 80 pb de una secuencia según una de las SEQ ID NO: 1-10, o regiones preferidas de las mismas de acuerdo con SEQ ID NO: 11-20. Se prefiere además que dicha secuencia sea de al menos 20 pares de bases de longitud, pero no más de 30 pb de una secuencia de acuerdo con una de SEQ ID NO: 1-10, o regiones preferidas de las mismas de acuerdo con SEQ ID NO: 11-20.

50 Dicho kit de prueba preferiblemente comprende además un componente de la enzima de restricción que comprende uno o una pluralidad de enzimas de restricción sensibles a la metilación.

En una realización adicional, dicho kit de prueba se caracteriza además porque comprende al menos una enzima de restricción específica de metilación, y en donde los oligonucleótidos comprenden un sitio de restricción de dicha al menos una enzima de restricción específicas de metilación.

55 El kit puede comprender además uno o varios de los siguientes componentes, que son conocidos en la técnica para el enriquecimiento de ADN: un componente de proteína, dicha proteína que enlaza selectivamente al ADN metilado; un componente de ácido nucleico formador de triplete, una o una pluralidad de enlazantes, opcionalmente en una solución adecuada; sustancias o soluciones para la realización de una ligadura, por ejemplo, ligasas, reguladores;

5 sustancias o soluciones para la realización de una cromatografía en columna; sustancias o soluciones para la realización de un enriquecimiento basado en la inmunología (por ejemplo, inmunoprecipitación); sustancias o soluciones para la realización de una amplificación de ácido nucleico, por ejemplo, PCR; un colorante o varios colorantes, si se aplica con un reactivo de acoplamiento, si es aplicable en una solución; sustancias o soluciones para la realización de una hibridación; y/o sustancias o soluciones para la realización de una etapa de lavado.

La divulgación se refiere además a una composición de materia útil para determinar el pronóstico de un sujeto que tiene trastorno proliferativo celular, preferiblemente cáncer. Dicha composición de materia es particularmente adecuada para determinar dicho pronóstico posterior a una terapia que comprende al menos una antraciclina.

10 Dicha composición comprende al menos un ácido nucleico de 18 pares de bases de longitud de un segmento de la secuencia de ácido nucleico divulgada en la SEQ ID NO: 21-40 y 61-80 o regiones preferidas de las mismas de acuerdo con SEQ ID NO: 41-60 y 81-100, y una o más sustancias tomadas del grupo que comprende: cloruro de magnesio 1-5 mM, dNTP 100 a 500 µM, 0.5-5 unidades de Taq polimerasa, albúmina de suero bovino, un oligómero, en particular, un oligonucleótido u oligómero de (PNA) de ácido nucleico peptídico, dicho oligómero que comprende
15 en cada caso al menos una secuencia base que tiene una longitud de al menos 9 nucleótidos que es complementaria a, o se hibrida bajo condiciones moderadamente rigurosas o rigurosas a un ADN genómico pretratado de acuerdo con una de las SEQ ID NO: 21-40 y 61-80 o regiones preferidas de las mismas de acuerdo con SEQ ID NO: 41-60 y 81-100 y secuencias complementarias a las mismas. Se prefiere que dicha composición de materia comprenda una solución reguladora apropiada para la estabilización de dicho ácido nucleico en una solución acuosa y que permita reacciones basadas en polimerasa dentro de dicha solución. Los reguladores adecuados son
20 conocidos en la técnica y están disponibles comercialmente.

En realización preferidas adicionales de la divulgación dicho al menos un ácido nucleico es al menos de 50, 100, 150, 200, 250 o 500 pares de bases de longitud de un segmento de la secuencia de ácido nucleico divulgada en la SEQ ID NO: 21-40 y 61-80 regiones o preferidas de las mismas de acuerdo con SEQ ID NO: 41-60 y 81-100.

Tabla 1: Secuencias genómicas y variantes tratadas de las mismas de acuerdo con la divulgación.

Gen	Accession No.	SEQ ID NO: genómico	Secuencia metilada pretratada (en sentido) SEQ ID NO:	Cadena metilada pretratada (antisentido) SEQ ID NO:	Secuencia no metilada pretratada (en sentido) SEQ ID NO:	Secuencia no metilada pretratada (antisentido) SEQ ID NO:
APC	1	21	22	61	62	APC
BMPR1A	2	23	24	63	64	BMPR1A
CDO1	3	25	26	65	66	CDO1
CTAGE5	4	27	28	67	68	CTAGE5
CXCL12	5	29	30	69	70	CXCL12
NCR1	6	31	32	71	72	NCR1
NFATC2	7	33	34	73	74	NFATC2
PAX9	8	35	36	75	76	PAX9
POU4F3	9	37	38	77	78	POU4F3
ZBTB16	10	39	40	79	80	ZBTB16

25

Tabla 2: Regiones particularmente preferidas de las secuencias de acuerdo con la tabla 1.

Gen	SEQ ID NO: genómico	Secuencia metilada pretratada (en sentido) SEQ ID NO:	Cadena metilada pretratada (antisentido) SEQ ID NO:	Secuencia no metilada pretratada (en sentido) SEQ ID NO:	Secuencia no metilada pretratada (antisentido) SEQ ID NO:
APC	11	41	42	81	82
BMPR1A	12	43	44	83	84

CDO1	13	45	46	85	86
CTAGE5	14	47	48	87	88
CXCL12	15	49	50	89	90
NCR1	16	51	52	91	92
NFATC2	17	53	54	93	94
PAX9	18	55	56	95	96
POU4F3	19	57	58	97	98
ZBTB16	20	59	60	99	100

Descripción de las figuras

La figura 1 muestra una visión general del procedimiento de selección de candidatos marcadores de acuerdo con el párrafo 3 del ejemplo.

- 5 La figura 2 muestra un análisis de Kaplan-Meier de acuerdo con el ejemplo 3. Se indica la supervivencia libre de metástasis en el conjunto de entrenamiento (84 pacientes) y el conjunto de validación (78 pacientes) de los pacientes con positivo para nodos linfáticos con tumores positivo del receptor de estrógeno, tratados como adyuvantes con antraciclina y estratificada por el estatus de metilación del ADN de CDO1. La mediana de metilación de CDO1 de la población respectiva se utilizó como punto de corte de acuerdo con el párrafo 3.6. del ejemplo.
- 10 Curvas marcadas con A representan los pacientes con CDO1 hipometilado, mientras que las curvas marcadas con B indican pacientes con CDO1 hipermetilado.

Ejemplo 1.

Resumen

15 Se han descrito diversos biomarcadores para la predicción de metástasis distante en cáncer de mama negativo para nodos linfáticos, sin embargo, todavía hay una gran demanda de biomarcadores predictivos para pacientes con enfermedad positiva para nodos linfáticos (LNP) en el contexto de las distintas terapias sistémicas. La metilación del ADN es aberrante en el cáncer de mama y es probable que desempeñe un papel importante en la progresión de la enfermedad. En este estudio, se seleccionó el estatus de metilación de ADN de 202 loci candidatos para identificar a los loci que pueden predecir el resultado en los pacientes de cáncer de mama positivo para LPN/receptor estrógeno (ER+) con quimioterapia basada en antraciclinas como adyuvante.

20 La secuenciación de bisulfito cuantitativa se utilizó para analizar los candidatos de biomarcadores de metilación del ADN en una cohorte retrospectiva de 162 pacientes con LNP/ER+ cáncer de mama, que recibieron quimioterapia adyuvante basada en antraciclinas. En primer lugar, se analizaron doce especímenes de cáncer de mama para los 202 loci candidatos para excluir genes no que mostraron metilación diferencial. Para identificar los genes que predicen la metástasis distante, los loci restantes se analizaron en 84 casos seleccionados, incluyendo los 12 iniciales. Los loci significativos se analizaron en los 78 casos restantes independientes. El análisis de supervivencia libre de metástasis se llevó a cabo mediante el uso de regresión de Cox, el análisis ROC dependiente del tiempo, y el método de Kaplan-Meier. El análisis de regresión multivariante por parejas se realizó mediante modelos lineales de riesgo proporcional de Cox, poniendo a prueba la asociación entre las puntuaciones de metilación y los parámetros clínicos con respecto a la supervivencia libre de metástasis.

25 De los 202 loci analizados, 37 mostraron alguna indicación de la metilación del ADN diferencial entre las muestras probadas de 12 pacientes iniciales. De ellos, 6 loci se asociaron con el resultado de la cohorte inicial (n = 84, prueba de rango logarítmico, p <0,05).

30 El promotor de la metilación del ADN de la cisteína dioxigenasa 1 (CDO1) se confirmó en el análisis univariante y en el multivariante de pares ajustando por edad en el momento de la cirugía, estadio T patológico, el estatus del receptor de progesterona, el grado y la terapia endocrina como biomarcador fuerte e independiente para la predicción de resultados en el conjunto de validación independiente (prueba de rango logarítmico p-valor = 0,0010).

35 La metilación de CDO1 demostró ser un fuerte predictor para metástasis distante en cohortes retrospectivas de pacientes con cáncer de mama LNP/ER +, que habían recibido quimioterapia adyuvante basada en antraciclinas.

40 2. Introducción

El cáncer de mama es el cáncer más frecuente en las mujeres (23% de todos los cánceres), ocupando el segundo lugar en general cuando ambos sexos se consideran en conjunto. La quimioterapia del cáncer de mama ha progresado sustancialmente en las últimas décadas. Las antraciclinas, introducidas en la década de 1980, se encuentran entre los agentes más potentes para el tratamiento del cáncer de mama y por lo tanto son componentes de muchos regímenes (neo)-adjuvantes y paliativos, más recientemente, frecuentemente en combinación con taxanos.

En cáncer de mama de nodos positivos, la quimioterapia adyuvante basada en antraciclinas se ha convertido en el estándar de atención desde la década de 1990; el 69% de los pacientes con cáncer de mama LNP permaneció libre de enfermedad después de cinco años después del tratamiento con quimioterapia basada en antraciclina. Se supone que aquellos pacientes libres de enfermedad durante largo plazo han sido tratados de manera efectiva y por lo tanto cualquier tratamiento más agresivo parece ser innecesario. Aún así, el tratamiento con antraciclinas está vinculado con ambos, los efectos colaterales agudos y de largo plazo, más notablemente la cardiotoxicidad. Por lo tanto, si un biomarcador estaba disponible para identificar de forma fiable los pacientes LNP con un bajo riesgo de recidiva después de la quimioterapia adyuvante basada en antraciclinas, el tratamiento de este grupo de pacientes con otros agentes de quimioterapia potencialmente con patrones diferenciales de toxicidad puede ser evitada. Los biomarcadores predictivos para respuesta a las antraciclinas son por lo tanto altamente esenciales y podrían ayudar a individualizar las decisiones con respecto a si se debe incorporar antraciclinas en los regímenes de terapia adyuvante para pacientes individuales.

La metilación del ADN juega un papel importante en procesos biológicos fundamentales como el desarrollo y la diferenciación celular. Lo mismo se aplica a la carcinogénesis y la progresión del cáncer, lo que sugiere que el análisis de la metilación del ADN puede ser una valiosa fuente de biomarcadores predictivos y/o de pronóstico. En este estudio, la secuenciación de bisulfito cuantitativa se utilizó para rastrear 202 biomarcadores candidatos por su impacto de pronóstico en pacientes con LNP/ER + cáncer de mama que habían recibido quimioterapia adyuvante basada en antraciclinas. Los candidatos marcadores fueron seleccionados de la literatura o identificados por la tecnología de hibridación de metilación diferencial (DMH), un método para el descubrimiento de todo el genoma de los biomarcadores de metilación. El promotor de la metilación del ADN de la cisteína dioxigenasa 1 (CDO1) fue identificado como un fuerte predictor de metástasis distante. Este hallazgo fue confirmado en un grupo de pacientes independiente de pacientes con LNP/ER + cáncer de mama avanzadas tratadas con quimioterapia adyuvante basada en antraciclinas.

3. Métodos

3.1 Los pacientes

La cohorte del estudio estuvo compuesta por 162 pacientes con cáncer de mama cuyas muestras de tumores se obtuvieron a partir de 4 centros clínicos: Erasmus Medical Center, Rotterdam, Países Bajos; Centre René Huguenin, St. Cloud, Francia; Stiftung Tumorbank Basel, Basel, Suiza; y Department of Obstetrics and Gynecology, Technical University of Munich, Alemania. El consentimiento adecuado, de acuerdo con los requerimientos institucionales, se obtuvo para todos los pacientes. El protocolo de estudio fue aprobado por los comités de ética locales. Las características de los pacientes se muestran en la tabla 3. Todos los pacientes con cáncer de mama fueron tratados con antraciclinas con tumores positivos en receptor de estrógeno, positivos en nodos linfáticos.

3.2 Preparación de ADN

Tejidos tumorales congelados al instante o células tumorales núcleos a 100,000 g se utilizaron para obtener el ADN genómico como se describió anteriormente. El ADN genómico fue extraído utilizando el Mini Kit de ADN QIAamp (Qiagen, Hilden, Alemania), siguiendo las instrucciones del fabricante (Protocolo de tejido). La concentración de ADN se cuantificó por espectrofotometría UV utilizando un fotómetro espectral Nanodrop® ND-1000 (NanoDrop Technologies, DE, EE.UU.). Se utilizó el ADN metilado artificialmente (CpGenome™ Universal Methylated DNA, Millipore, MA, EE.UU.) como referencia de ADN completamente metilado.

3.3 Conversión con bisulfito

Dos µg de ADN extraído se convirtieron con bisulfito utilizando el Kit EpiTect® (Qiagen, Hilden, Alemania) de acuerdo con las recomendaciones del fabricante con la excepción de que no se utilizó ARN transportador. La concentración de ADN se cuantificó mediante espectrofotometría de UV como se describió más arriba.

3.4 Amplificación por PCR

La amplificación por PCR se realizó en un volumen de 25 µl (1 U HotStar Taq polimerasa [Qiagen, Hilden, Alemania], 1 x regulador de PCR [Qiagen, Hilden, Alemania], 0.2 mM de cada dNTP [Fermentas, Burlington, Canadá], 0.5 µM tanto cebadores [MWG-Biotech, Ebersberg, Alemania], como 20 ng de ADN de plantilla). La incubación se realizó utilizando el siguiente perfil de temperatura: 15 min/95°C y 45 ciclos con 20 s/95°C, 45 s/58°C y

30 s/72°C. Las secuencias de los cebadores y las secuencias de los respectivos loci objetivo (antes de la conversión con bisulfito) se listan en la Tabla 6. Cada cebador reverso contenía la secuencia CGTCGTCG en su extremo 5'.

3.5. Secuenciación y procesamiento de datos sin procesar

5 La secuenciación de bisulfito cuantitativa se llevó a cabo como se describe anteriormente. Los electroferogramas de secuenciación de ABI se convirtieron en archivos de texto utilizando el software 6.0.7 BioEdit e importados en Microsoft Excel. La traza que contiene la información de metilación se visualizó y se identificó la señal de normalización. Los electroferogramas se desplazaron hasta que la señal de normalización de cada muestra se encontró en la misma posición. La señal de normalización se integró y cada punto de datos del electroferograma dividido por este valor de normalización. Los fragmentos de PCR analizados contenían varios sitios CpG. Las
10 señales de los sitios CpG individuales de ADN completamente metilado se utilizaron para identificar las posiciones de CpG en la electroferograma de las muestras de pacientes. La intensidad máxima de un sitio CpG específico se definió como el máximo en los ± 30 puntos de datos de la región referida al pico respectivo en la traza de referencia del ADN completamente metilado. Las intensidades promediadas de todos los sitios CpG de un fragmento de PCR se utilizaron como medición (puntuación de metilación) para el análisis estadístico.

15 3.6. Análisis estadístico

Las curvas ROC que dependen del tiempo para los datos de supervivencia censados y las AUC resultantes se de acuerdo con Heagerty et al. Se utilizó WinStat para Microsoft Excel (www.winstat.com) para el análisis de supervivencia de Kaplan-Meier y la prueba de rangos logarítmicos. El valor de la mediana de metilación en el grupo de paciente respectivo se utilizó como punto de corte para la dicotomización.

20 La relación entre el tiempo a metástasis distante y la puntuación de la metilación del ADN se analizó mediante un modelo lineal univariante de Riesgo Proporcional de Cox. Se llevaron a cabo pruebas de relación de probabilidad para la prueba de un impacto significativo de la puntuación de metilación del ADN para la CDO1 amplificada en los puntos finales clínicos. Se calcularon las Relaciones de Riesgo para las variables continuas. El análisis de regresión multivariante por parejas, poniendo a prueba la asociación entre el punto final y la puntuación de metilación del ADN y/o parámetros clínicos, se llevó a cabo mediante el empleo de modelos lineales de Riesgo Proporcional de Cox.
25

4. Resultados

Un novedoso método recientemente publicado para secuenciación de bisulfito cuantitativo [12] se utilizó para analizar el estatus de metilación de 202 potenciales biomarcadores de metilación del ADN en los tumores de 162
30 pacientes con cáncer de mama positivo en nodo linfático, positivos en receptor de estrógeno, tratados con antracilina, con el fin de evaluar su potencial para predecir metástasis a distancia. Los candidatos marcadores se tomaron de la literatura o se han identificado previamente usando hibridación de metilación diferencial (DMH), un método de descubrimiento de todo el genoma (datos no mostrados). Un procedimiento consecutivo de selección de marcadores como se representa en la figura 1 se desarrolló con el fin de identificar de manera eficiente los biomarcadores de metilación del ADN para la predicción de resultados. En una primera etapa de selección, los 202
35 loci fueron analizados utilizando ADN tratado con bisulfito a partir de 12 tumores individuales seleccionados al azar para excluir a aquellos que no mostraron evidencia de la metilación diferencial entre las muestras. Los candidatos restantes se pusieron además a prueba por su capacidad potencial para predecir metástasis distante en un conjunto de 72 especímenes de pacientes adicionales, dando como resultado un grupo de entrenamiento de 84 pacientes en total. En la etapa final del análisis, los biomarcadores significativos de metilación del ADN en evolución del conjunto de entrenamiento fueron además analizados en un conjunto de validación independiente de muestras de ADN de 78
40 pacientes, con el fin de confirmar y validar su verdadero potencial clínico. Las características de los pacientes pertenecientes a los conjuntos de entrenamiento y validación se muestran en la tabla 3.

De los 202 loci analizados inicialmente, 165 no mostraron un patrón de metilación del ADN diferencial evidente entre las 12 muestras iniciales probadas, y por lo tanto estos loci fueron excluidos de los nuevos análisis. De los 37
45 candidatos restantes, seis loci se asociaron con la ocurrencia de metástasis distante en esta población de entrenamiento. Se realizó el análisis ROC dependiente del tiempo y el análisis de Kaplan-Meier. Con el fin de evitar un resultado demasiado optimista, se utilizó la puntuación media de la metilación del ADN del conjunto de entrenamiento como punto de corte. Los resultados de los biomarcadores de metilación del ADN que muestran el impacto potencial en el conjunto de entrenamiento se muestran en la tabla 4. Surgieron seis genes (CDO1, APC, ZBTB16, NCR1, POU4F3, y CXCL12) como biomarcadores potenciales en el conjunto de entrenamiento indicado por $p < 0.05$ y $AUC > 0.6$. El análisis de los seis genes en el conjunto de validación (tabla 4), confirmó la capacidad del gen CDO1 para predecir el resultado ($p = 0.0010$, $AUC = 0.69$), mientras que la capacidad predictiva de la metilación del ADN de los otros cinco genes no se pudo confirmar en el conjunto de validación. Las representaciones gráficas de supervivencia de Kaplan-Meier estratificadas por el estatus de metilación del ADN de CDO1 tanto en el conjunto de entrenamiento como en el de validación se representan en la figura 2. Evidentemente,
55 la metilación del ADN de CDO1 un fuerte biomarcador para predecir metástasis distante en pacientes LNP con tumores ER+ tratados con terapia que contiene antracilina de adyuvante. La Tabla 5 muestra los resultados de los modelos univariados y los multivariados en pares de Riesgo Proporcional de Cox de la población de validación ($n =$

78). En el análisis univariante, la puntuación de la metilación del ADN para CDO1 se asocia con un alto riesgo de recurrencia distante en este grupo de pacientes ($p = 0.0098$, HR = 3.7, 95% CI 1.4 a 9.8). Además, el estatus del receptor de progesterona ($p = 0.0190$, HR = 2.7, 95% CI 1.2 - 6.0) se asoció significativamente con metástasis distante en el tiempo en este grupo, mientras que el estadio del tumor, el tratamiento endocrino, el grado del tumor, y la edad en la cirugía no lo fueron. La metilación del ADN de CDO1 fue un marcador significativo en el análisis multivariado por parejas incluyendo la edad en la cirugía, estadio T patológico, el estatus del receptor de progesterona, el grado del tumor o la terapia endocrina. Los pacientes que sufrieron recidiva de la enfermedad mostraron una mayor metilación del ADN del locus CDO1 que los sobrevivientes libres de metástasis.

5. Conclusión

La metilación del ADN de 202 loci se analizó en los tumores de pacientes con cáncer de mama que eran positivos para el receptor de estrógeno, positivos para ganglios linfáticos, y tratados con quimioterapia basada en antraciclina adyuvante, con el fin de identificar biomarcadores para predecir el resultado del paciente. Se desarrolló una estrategia de selección de biomarcador paso a paso lo que permitió la optimización de los esfuerzos experimentales y los costes para análisis a gran escala de genes. En una primera etapa de selección, se analizó un número pequeño seleccionado de muestras de ADN con el fin de separar los loci que no mostraron evidencia de la metilación del ADN diferencial. Los 37 loci restantes fueron además analizados en un conjunto de entrenamiento con el fin de identificar loci con un potencial para predecir el resultado del paciente. Posteriormente, el rendimiento de biomarcador de los loci más prometedores se puso a prueba en otro conjunto de ADNs derivados de tejidos tumorales de un grupo independiente de pacientes. Este procedimiento condujo a la identificación de dioxigenasa cisteína 1 (CDO1) como un fuerte biomarcador de metilación del ADN para la predicción de resultados en el grupo de pacientes analizado.

La CDO1 fue identificada como un biomarcador candidato utilizando el método de DMH mediante la determinación de su estatus de metilación del ADN en los tumores de pacientes con cáncer de mama metastásico que fueron tratados por el régimen FAC (5-fluorouracilo, adriamicina y ciclofosfamida) como terapia de primera línea. El gen CDO1 codifica para una enzima que convierte la cisteína en ácido sulfínico de cisteína y es el paso limitante de la tasa en la producción de sulfato. La CDO1 se entiende que es una de las enzimas clave en la ruta biosintética de la taurina. La taurina inhibe la apoptosis. El gen CDO1 humano está localizado en el cromosoma 5q23.2 y es homólogo a la dioxigenasa cisteína de murinos y rata. Cdo1 murínico puede estar implicada en la regulación de la función de las proteínas y los mecanismos de defensa antioxidantes a través de su capacidad de oxidar los residuos de cisteína. Como se ha supuesto anteriormente, la eliminación o silenciamiento epigenético de la región cromosómica donde se encuentra CDO1 es un mecanismo frecuente que contribuye a la tumorigénesis colorrectal. Recientemente, se ha descrito la sobreexpresión de CDO1 para el síndrome de Sézary, un linfoma cutáneo de células T agresivas.

No obstante, a partir de hoy, la metilación del ADN no aberrante del gen CDO1 se ha descrito en el contexto del cáncer de mama. La expresión de dioxigenasa cisteína se encontró en las células ductales de ratas embarazadas, pero no en otras células epiteliales mamarias o en células ductales de ratas no embarazadas. Curiosamente, se identificó que la represión de la expresión Cdo1 está asociada con la transición maligna de la neoplasia intraepitelial mamaria a los tumores en un modelo basado en ratón modificado genéticamente de carcinoma ductal in situ.

Sin embargo, en el presente estudio, se encontró que la metilación del ADN de CDO1 era un fuerte biomarcador para predecir la recurrencia a distancia en pacientes positivos a nódos linfáticos con tumores positivos a receptores de estrógenos tratados con terapia que contiene antraciclina como adyuvante.

6. Abreviaturas

ROC Características de Funcionamiento del Receptor

45 AUC Área bajo la Curva

DMH Hibridación de Metilación Diferencial

CI Intervalo de Confianza

HR Relación de Riesgo

CDO1 Cisteína Dioxigenasa 1

50 APC Adenomatosis Polyposis Coli

MDA Amplificación de Desplazamiento Múltiple

NCR1 Receptor 1 de activación de Citotoxicidad Natural

POU4F3 POU Clase 4 Homeobox 3

CXCL12 Quimioquina (motivos C-X-C) Ligando 12

ZBTB16 Dedo de Zinc y Dominio BTB que Contiene 16

- 5 Tabla 3: Características de los 162 pacientes con cáncer de mama positivos en receptores de estrógenos y positivos en nodos linfáticos tratados con antraciclinas.

	Conjunto de entrenamiento †		Conjunto de validación	
	Todos	Metástasis Distante	Todos	Metástasis Distante
Número total de Pacientes	84(100%)	39	78(100%)	25
Seguimiento				
Seguimiento medio [Meses]	80		53.5	
Rango [Meses]	6-144		5-166	
Edad al Diagnóstico				
≤ 50 Años	38(45%)	20	41 (53%)	16
> 50 Años	46(55%)	19	37(47%)	19
Edad mediana (Años)	49		49	
Rango (Años)	29-71		33-81	
Estadio T				
≤ 2cm (T1)	19(23%)	4	24(31%)	5
> 2 cm (T2+T3)	63(75%)	35	53 (68%)	19
Desconocido	2(2%)	0	1(1%)	1
Grado del Tumor				
G1	2(2%)	0	3(4%)	1
G2	24(29%)	11	30(38%)	7
G3	47(56%)	21	28(36%)	11
Desconocido	11(13%)	7	17(22%)	6
Estatus del Receptor de Estrógeno				
Negativo	0	0	0	0
Positivo	84(100%)	39	78(100%)	25
Estatus del Receptor de Progesterona				
Negativo	12(14%)	4	18(23%)	9
Positivo	72(66%)	35	60(77%)	16
Tratamiento Endocrino				
Sí	22(26%)	8	37(47%)	9
No	61(73%)	30	40(51%)	15
Desconocido	1(1%)	1	1(1%)	1

† El conjunto de entrenamiento se enriqueció para especímenes que carecen de la metilación del PITX2.

Tabla 4: Análisis ROC dependiente del tiempo de los genes candidatos en el conjunto de entrenamiento y validación de los pacientes LNP con tumores ER+ tratados con terapia que contiene antraciclina como adyuvante.

ES 2 606 703 T3

Gen	Conjunto de entrenamiento (n=84)		Conjunto de validación (n=78)	
	AUC†	Valor p ‡	AUC†	Valor p ‡
CDO1	0.70	0.0034	0.69	0.0010
APC	0.68	0.0204	0.55	0.5306
ZBTB16	0.67	0.0224	0.63	0.0582
NCR1	0.63	0.0239	0.56	0.9048
POU4F3	0.69	0.0248	0.69	0.0754
CXCL12	0.67	0.0282	0.49	0.4854

† Se muestra el AUC de las ROC a los 48 meses después de la cirugía

‡ Los valores de p son los obtenidos por la prueba de rango logarítmico en el análisis de supervivencia de Kaplan-Meier y los genes se clasifican de acuerdo con estos valores de p. La mediana de la metilación del ADN se utilizó como punto de corte.

TABLA 5 Análisis de univariante y multivariante por pares de Riesgos Proporcionales de Cox para la metástasis de tiempo a distante.

	Número de muestras	Relación de riesgo (95% CI)	Valor de p‡
Análisis univariado			
Metilación del ADN de CDO1	78	3.7(1.4-9.8)	0.0098
Edad en la cirugía	78	1.3(0.6-2.8)	0.5545
Estadio del Tumor (T2,T3 vs. T1)	78	2.0(0.7-5.2)	0.1799
Estatus del Receptor de Progesterona (Positivo vs. Negativo)	77	2.7(1.2-6.0)	0.0190
Tratamiento Endocrino (No vs. Sí)	77	2.0(0.9-4.5)	0.1115
Análisis univariado †			
Grado del Tumor (1,2 vs.3)	61	2.0(0.8-4.9)	0.1397
Análisis Multivariado por Parejas †			
Metilación del ADN de CDO1	78	3.9(1.5-10.5)	0.0072
Edad en la cirugía	78	1.5(0.7-3.4)	0.3160
Metilación del ADN de CDO1	77	3.5(1.3-9.5)	0.0128
Estadio T (T2,T3 vs T1)	77	2.0(0.7-5.3)	0.1790
Metilación del ADN de CDO1	78	3.5(1.3-9.4)	0.0123
Estatus de Receptor de Progesterona (Positivo vs. Negativo)	78	2.5(1.1-5.7)	0.0275
Metilación del ADN de CDO1	77	4.6(1.6-13.5)	0.0055
Tratamiento Endocrino (No vs. Sí)	77	2.0(0.9-4.7)	0.0938
Metilación del ADN de CDO1	61	3.1(1.1-8.7)	0.0318
Grado del Tumor (1,2 vs 3)	61	1.7(0.7-4.3)	0.2506

† La metilación del ADN de CDO1 y la edad en la cirugía se analizaron como variables continuas. La etapa T, el tratamiento endocrino y el estatus del receptor de progesterona se analizaron como variables binarias. Los valores ‡p se refieren a la prueba de relación de probabilidad

Tabla 6: Números de secuencia de cebadores y los números de secuencia de los respectivos loci objetivo (antes de la conversión con bisulfito)

Gen	Cebador		
	De avance	De retroceso	Producto PCR
APC	SEQ ID NO: 101	SEQ ID NO: 102	SEQ ID NO: 103
CDO1	SEQ ID NO: 104	SEQ ID NO: 105	SEQ ID NO: 106
CXCL12	SEQ ID NO: 107	SEQ ID NO: 108	SEQ ID NO: 109
NCR1	SEQ ID NO: 110	SEQ ID NO: 111	SEQ ID NO: 112
POU4F3	SEQ ID NO: 113	SEQ ID NO: 114	SEQ ID NO: 115
ZBTB16	SEQ ID NO: 116	SEQ ID NO: 117	SEQ ID NO: 118

Reivindicaciones

1. Un método para determinar el pronóstico de un sujeto que tiene cáncer de mama y para predecir el resultado del tratamiento de dicho cáncer de mama posterior a una terapia, en donde el procedimiento comprende la determinación de los niveles de metilación del gen CDO1 como se establece en SEQ NO: 13 en una muestra biológica aislada de dicho sujeto, en donde el estatus de metilación es indicativo de pronóstico.
2. El método de acuerdo con la reivindicación 1, mientras que dicho pronóstico y predicción de los resultados de dicho tratamiento es posterior a una terapia que comprende el uso de al menos una antraciclina.
3. El método de acuerdo con cualquiera de las reivindicaciones 1 o 2 en donde dicho pronóstico se determina detectando la presencia, ausencia o cantidad de metilación de CpG dentro de dicho gen.
4. Un método de acuerdo con la reivindicación 1 o 2, que comprende poner en contacto el ADN genómico aislado de una muestra biológica obtenida de dicho sujeto con al menos un reactivo, o serie de reactivos que distinguen entre dinucleótidos CpG metilados y no metilados dentro de al menos una región objetivo del ADN genómico, en donde la región objetivo comprende, o se hibrida bajo condiciones rigurosas con una secuencia de al menos 16 nucleótidos contiguos de la SEQ NO: 13, respectivamente, en donde dichos nucleótidos contiguos comprenden al menos una secuencia de dinucleótido CpG, y con lo cual se aporta el determinar el pronóstico de dicho sujeto.
5. Un método de acuerdo con cualquiera de las reivindicaciones 1, 2 o 3, que comprende:
 - a) extraer o de otra manera aislar ADN genómico de una muestra biológica obtenida del sujeto;
 - b) tratar el ADN genómico de a), o un fragmento del mismo, con uno o más reactivos, tales como, por ejemplo un reactivo seleccionado del grupo que comprende de bisulfito, sulfito de hidrógeno, disulfito, y combinaciones de los mismos, para convertir las bases de citosina que son no metiladas en la posición 5 del mismo en uracilo o en otra base que sea detectablemente diferente a la citosina en términos de propiedades de hibridación;
 - c) poner en contacto el ADN genómico tratado, o el fragmento tratado del mismo, con una enzima de amplificación y al menos un cebador que comprende, una secuencia contigua de al menos 9 nucleótidos que es complementaria a, o se hibrida bajo condiciones moderadamente rigurosas o rigurosas a una secuencia seleccionada del grupo que consiste de SEQ ID NO: 25, 26, 65, 66 o regiones preferidas de las mismas de acuerdo con SEQ ID NO: 45, 46, 85 o 86, y complementos de las mismas, en donde el ADN genómico tratado, o el fragmento del mismo, o bien es amplificado para producir al menos un amplificado, o no se amplifica; y
 - d) determinar, basado en una presencia, ausencia o cantidad de, o en una propiedad de dicho amplificado, el estado de metilación o nivel de al menos un dinucleótido CpG de la SEQ ID NO: 13, o un promedio, o un valor que refleja un estado de metilación promedio o el nivel de una pluralidad de dinucleótidos CpG de la SEQ ID NO: 13, en donde se aporta determinar el pronóstico de dicho sujeto.
6. El método de la reivindicación 5, en donde el tratamiento del ADN genómico, o el fragmento del mismo en b), comprende el uso de un reactivo seleccionado del grupo que comprende de bisulfito, sulfito de hidrógeno, disulfito, y combinaciones de los mismos.
7. El método de acuerdo con cualquiera de las reivindicaciones 1 a 6, en donde la muestra biológica obtenida del sujeto se selecciona del grupo que comprende líneas celulares, cortes histológicos, tejidos embebidos en parafina, biopsias, tejido embebido en parafina, fluidos corporales, tales como, por ejemplo, aspirado de pezón y sangre, y combinaciones de los mismos
8. El método de acuerdo con la reivindicación 1 o 2, que comprende:
 - a) extraer o de otra manera aislar el ADN genómico de una muestra biológica obtenida del sujeto;
 - b) digerir el ADN genómico de a), o un fragmento del mismo, con una o más enzimas de restricción sensibles a metilación; poner en contacto la digestión de la enzima de restricción del ADN de b), con una enzima de amplificación y al menos dos cebadores adecuados para la amplificación de una secuencia que comprende al menos un dinucleótido CpG de la SEQ ID NO: 3, o regiones preferidas de la misma de acuerdo con SEQ ID NO: 13 ; y
 - c) determinar, con base en una presencia, ausencia o clase de un amplificado el estado de metilación o nivel de al menos un dinucleótido CpG de la SEQ ID NO: 13, y de la misma determinar el pronóstico del sujeto.
9. El uso de un ácido nucleico en la determinación del pronóstico de un sujeto que tiene cáncer de mama y en la predicción del resultado del tratamiento de dicho cáncer de mama, comprendiendo el ácido nucleico al menos 16, preferiblemente 50, nucleótidos contiguos de una secuencia seleccionada del grupo que consiste de SEQ ID NO: 25,

26, 65 y 66 o regiones preferidas de las mismas de acuerdo con SEQ ID NO: 45, 46, 85 y 86, y secuencias complementarias de las mismas, en donde preferiblemente la secuencia bases contigua comprende al menos una secuencia de dinucleótido CpG, TpG o CpA.

- 5 10. El uso de un kit para realizar el método de acuerdo con la reivindicación 5 que comprende (a) un reactivo de bisulfito; (b) un recipiente adecuado para contener dicho reactivo de bisulfito y la muestra biológica del sujeto; (c) al menos un conjunto de oligonucleótidos que contienen dos oligonucleótidos cuyas secuencias en cada caso son idénticas, son complementarias, o se hibridan bajo condiciones rigurosas o altamente rigurosas a un segmento de 9 o más, preferiblemente 18 bases de largo de una secuencia seleccionada de SEQ ID NO: 25, 26, 65 y 66 o regiones preferidas de las mismas de acuerdo con SEQ ID NO: 45, 46, 85 y 86.
- 10 11. El uso de un kit para realizar el método de acuerdo con la reivindicación 8 que comprende (a) un reactivo de enzima de restricción sensible a la metilación; (b) un recipiente adecuado para contener dicho reactivo y la muestra biológica del sujeto; (c) al menos un conjunto de oligonucleótidos de uno o una pluralidad de ácidos nucleicos o ácidos nucleicos peptídicos que son idénticos, complementarios, o se hibridan bajo condiciones rigurosas o altamente rigurosas a un segmento de al menos 9 bases de longitud de SEQ ID NO: 13; y opcionalmente (d)
- 15 instrucciones para el uso y la interpretación de los resultados del kit.
12. El uso de un kit para realizar el método de acuerdo con la reivindicación 5 que comprende (a) un reactivo de bisulfito; (b) un recipiente adecuado para contener dicho reactivo de bisulfito y la muestra biológica del sujeto; (c) al menos un conjunto de oligonucleótidos, en donde dicho conjunto contiene SEQ ID NOs: 104 y 105.

Figura 1

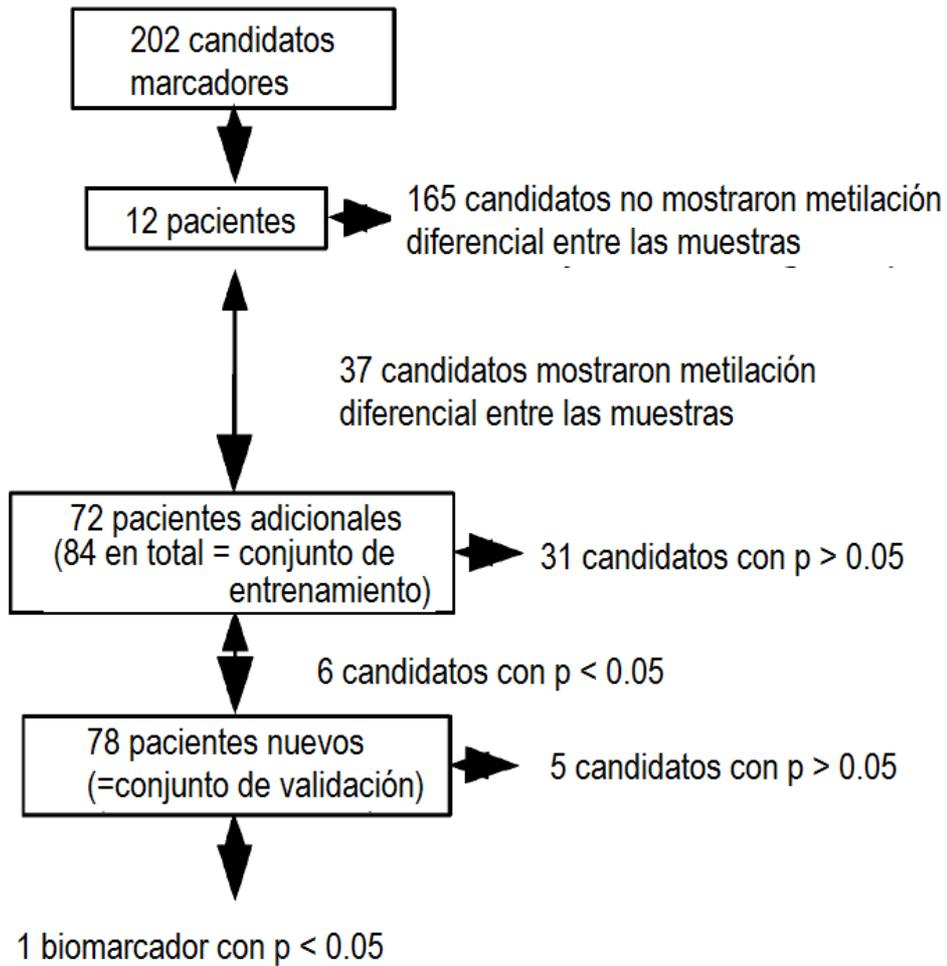


Figura 2

