

19



OFICINA ESPAÑOLA DE  
PATENTES Y MARCAS

ESPAÑA



11 Número de publicación: **2 640 221**

51 Int. Cl.:

**C12Q 1/68**

(2006.01)

12

TRADUCCIÓN DE PATENTE EUROPEA

T3

86 Fecha de presentación y número de la solicitud internacional: **02.11.2011 PCT/US2011/058997**

87 Fecha y número de publicación internacional: **24.05.2012 WO12067830**

96 Fecha de presentación y número de la solicitud europea: **02.11.2011 E 11842202 (1)**

97 Fecha y número de publicación de la concesión europea: **21.06.2017 EP 2640858**

54 Título: **Ensayo de metilación**

30 Prioridad:

**15.11.2010 US 946745**

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

**02.11.2017**

73 Titular/es:

**EXACT SCIENCES CORPORATION (100.0%)  
441 Charmany Drive  
Madison, Wisconsin 53719, US**

72 Inventor/es:

**ZOU, HONGZHI;  
LIDGARD, GRAHAM, P.;  
DOMANICO, MICHAEL, J. y  
ALLAWI, HATIM**

74 Agente/Representante:

**ELZABURU, S.L.P**

**ES 2 640 221 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

## Ensayo de metilación

La metilación de restos citosina en el ADN es una importante alteración epigenética en eucariotas. En los seres humanos y otros mamíferos, la metilcitosina se encuentra casi exclusivamente en los dinucleótidos de citosina-guanina (CpG). La metilación del ADN desempeña un papel importante en la regulación de genes, y los cambios en los patrones de metilación están implicados en cánceres humanos y ciertas enfermedades humanas. Entre las alteraciones genéticas más tempranas y habituales observadas en malignidades humanas se encuentra la metilación aberrante de islas de CpG, en particular las islas de CpG localizadas dentro de las regiones reguladoras 5' de genes, lo cual provoca alteraciones en la expresión de dichos genes. Por consiguiente, existe un gran interés en la utilización de marcadores de la metilación del ADN como indicadores de diagnóstico para la detección temprana, la evaluación del riesgo, la evaluación terapéutica, el control de la recurrencia y similares. También existe un gran interés científico en la metilación del ADN para estudiar la embriogénesis, la diferenciación celular, la expresión de transgenes, la regulación transcripcional y la metilación de mantenimiento, entre otras cuestiones.

Zou *et al.* (AAAC Annual Meeting 2010, resumen n.º D-144, p. A199) describen una cuantificación sensible de la metilación de vimentina combinando una PCR con la tecnología Invader.

Esta descripción se refiere a la detección de ADN metilado en una muestra.

Según un aspecto de la presente invención, se proporciona un método para detectar un locus genómico metilado, según se especifica en la reivindicación 1.

Según otro aspecto de la presente invención, se proporciona una mezcla de reacción, según se especifica en la reivindicación 12.

Según otro aspecto de la presente invención, se proporciona un kit para detectar un locus genómico metilado, según se especifica en la reivindicación 15.

La figura 1 ilustra esquemáticamente algunos de los principios generales de un ensayo de flap (flap: proyección nucleotídica).

La figura 2 ilustra esquemáticamente algunos de los principios del método descrito.

La figura 3 muestra las secuencias de nucleótidos de copias metiladas y no metiladas de un fragmento del gen de vimentina humano (VIM), antes y después de un tratamiento con bisulfito.

La figura 4 muestra las secuencias de nucleótidos de un ejemplo de cebador directo, un ejemplo de cebador inverso y un ejemplo de oligonucleótido flap, alineadas con los fragmentos mostrados en la figura 3. Las secuencias de nucleótidos que aparecen en la figura 4 se indican en el listado de secuencias como VIM no metilado (SEQ ID NO:18), VIM metilado (SEQ ID NO:19), SEQ ID NO:13 (cebador directo), SEQ ID NO:15 (sonda flap), y SEQ ID NO:14 (cebador inverso).

Las figuras 5 a 7 proporcionan cada una datos que se describen con más detalle en la sección de ejemplos de esta solicitud.

El término "muestra", tal como se emplea en la presente, se refiere a un material o a una mezcla de materiales, general, aunque no necesariamente en forma líquida, que contienen uno o más analitos de interés.

El término "nucleótido" pretende incluir los restos que contienen no solo las conocidas bases de purina y pirimidina, sino también otras bases heterocíclicas que han sido modificadas. Estas modificaciones incluyen purinas o pirimidinas metiladas, purinas o pirimidinas aciladas, ribosas alquiladas u otros heterociclos. Además, el término "nucleótido" incluye los restos que contienen haptenos o marcadores fluorescentes y pueden contener no solo los azúcares convencionales ribosa y desoxirribosa, sino también otros azúcares. Los nucleósidos o nucleótidos modificados también incluyen modificaciones en el resto azúcar, por ejemplo, cuando uno o más de los grupos hidroxilo son reemplazados por átomos de halógeno o grupos alifáticos, cuando están funcionalizados como éteres, aminas o similares.

La expresión "ácido nucleico" y el término "polinucleótido" se emplean de modo intercambiable en la presente para describir un polímero de cualquier longitud, por ejemplo, más de aproximadamente 2 bases, más de aproximadamente 10 bases, más de aproximadamente 100 bases, más de aproximadamente 500 bases, más de aproximadamente 1000 bases, hasta aproximadamente 10.000 o más bases compuestas de nucleótidos, por ejemplo, desoxirribonucleótidos o ribonucleótidos, y puede ser producido de modo enzimático o sintético (por ejemplo, ANP, según se describe en la patente de EE. UU. n.º 5.948.902 y las referencias citadas en dicho documento) que puede hibridarse con ácidos nucleicos naturales de una manera específica de secuencia de modo análogo al modo en que dos ácidos nucleicos naturales, por ejemplo, pueden participar en interacciones de apareamiento de bases de Watson-Crick. Los nucleótidos naturales incluyen guanina, citosina, adenina y timina (G, C, A y T, respectivamente).

La expresión "muestra de ácido nucleico", tal como se emplea en la presente, indica una muestra que contiene un ácido nucleico.

La expresión "polinucleótido diana", tal como se emplea en la presente, se refiere a un polinucleótido de interés bajo estudio. En ciertas realizaciones, un polinucleótido diana contiene uno o más sitios diana que son de interés en el estudio.

El término "oligonucleótido", tal como se emplea en la presente, indica un multímero monocatenario de nucleótidos de aproximadamente 2 a 200 nucleótidos. Los oligonucleótidos pueden ser sintéticos o pueden haber sido fabricados de modo enzimático y, en algunas realizaciones, tienen una longitud de 10 a 50 nucleótidos. Los oligonucleótidos pueden contener monómeros de ribonucleótidos (es decir, pueden ser oligorribonucleótidos) o monómeros de desoxirribonucleótidos. Un oligonucleótido puede tener una longitud de 10 a 20, de 11 a 30, de 31 a 40, de 41 a 50, de 51 a 60, de 61 a 70, de 71 a 80, de 80 a 100, de 100 a 150 o de 150 a 200 nucleótidos, por ejemplo.

El término "dúplex" o "duplexado", tal como se emplea en la presente, describe dos polinucleótidos complementarios que tienen las bases apareadas, es decir, están hibridados.

El término "cebador", tal como se emplea en la presente, se refiere a un oligonucleótido que tiene una secuencia de nucleótidos que es complementaria con una región de un polinucleótido diana. Un cebador se une con la región complementaria y es extendido, empleando el ácido nucleico diana como molde, en condiciones de extensión de cebadores. Un cebador puede tener de aproximadamente 15 a aproximadamente 50 nucleótidos, aunque pueden utilizarse cebadores fuera de esta longitud. Un cebador puede ser extendido desde su extremo 3' por la acción de una polimerasa. Un oligonucleótido que no puede ser extendido desde su extremo 3' por la acción de una polimerasa no es un cebador.

El término "extender", tal como se emplea en la presente, se refiere a cualquier adición de uno o más nucleótido al extremo 3' de un ácido nucleico, por ejemplo, mediante acoplamiento de un oligonucleótido o empleando una polimerasa.

El término "amplificar", tal como se emplea en la presente, se refiere a generar una o más copias de un ácido nucleico diana, empleando el ácido nucleico diana como molde.

El término "desnaturalizar", tal como se emplea en la presente, se refiere a la separación de un dúplex de ácido nucleico en dos hebras monocatenarias.

Los términos "determinar", "medir", "evaluar", "ensayar," "detectar" y "analizar" se emplean de modo intercambiable en la presente para indicar cualquier forma de medición e incluyen determinar si un elemento está o no presente. Estos términos incluyen las determinaciones cuantitativas y/o cualitativas. La evaluación puede ser relativa o absoluta. La "evaluación de la presencia de" incluye determinar la cantidad de algo presente, así como determinar si está presente o ausente.

El término "utilizar" tiene su significado convencional y, así, significa emplear, por ejemplo, poner en servicio, un método o una composición para lograr un fin.

Tal como se emplea en la presente, el término " $T_m$ " se refiere a la temperatura de fusión de un dúplex oligonucleotídico en la que la mitad de los dúplex permanecen hibridados y la mitad de los dúplex se disocian en hebras monocatenarias. La  $T_m$  de un dúplex oligonucleotídico puede determinarse de modo experimental o predecirse empleando la siguiente fórmula:  $T_m = 81,5 + 16,6(\log_{10}[\text{Na}^+]) + 0,41(\text{fracción G+C}) - (60/N)$ , en la que N es la longitud de la cadena y  $[\text{Na}^+]$  es menor que 1 M. Véase Sambrook y Russell (2001, Molecular Cloning: A Laboratory Manual, 3ª ed., Cold Spring Harbor Press, Cold Spring Harbor N.Y., cap. 10). Existen otras fórmulas para predecir la  $T_m$  de dúplex oligonucleotídicos y una fórmula puede ser más o menos apropiada para una condición o un conjunto de condiciones concretos.

Tal como se emplea en la presente, la expresión " $T_m$  emparentadas" se refiere a una pluralidad de dúplex de ácidos nucleicos que tienen unas  $T_m$  que están dentro de un intervalo definido, por ejemplo, dentro de 5 °C o 10 °C entre sí.

Tal como se emplea en la presente, la expresión "mezcla de reacción" se refiere a una mezcla de reactivos que son capaces de reaccionar juntos para producir un producto en condiciones externas apropiadas a lo largo de un periodo de tiempo. Una mezcla de reacción puede contener reactivos de PCR y reactivo de escisión del flap (proyección nucleotídica), por ejemplo, cuyas recetas son conocidas independientemente en la técnica.

El término "mezcla", tal como se emplea en la presente, se refiere a una combinación de elementos que están dispersados y no siguen un orden concreto. Una mezcla es heterogénea y no puede separarse espacialmente en sus diferentes constituyentes. Los ejemplos de mezclas de elementos incluyen una serie de elementos diferentes que están disueltos en la misma disolución acuosa, o una serie de elementos diferentes unidos a un soporte sólido al azar o en ningún orden concreto, en los que los elementos diferentes no son diferenciables espacialmente. Una mezcla no es direccionable. Como ejemplo ilustrativo, una matriz de polinucleótidos unidos a una superficie

espacialmente separados, tal como se conoce en la técnica, no es una mezcla de polinucleótidos unidos a una superficie, porque las especies de polinucleótidos unidos a la superficie son diferenciables espacialmente y la matriz es direccionable.

5 Tal como se emplea en la presente, la expresión "reactivos de PCR" se refiere a todos los reactivos necesarios para realizar una reacción en cadena con polimerasa ("polymerase chain reaction", PCR) con un molde. Tal como se conoce en la técnica, los reactivos de PCR fundamentalmente incluyen un primer cebador, un segundo cebador, una polimerasa termoestable y nucleótidos. Dependiendo de la polimerasa utilizada también pueden estar presentes iones (por ejemplo,  $Mg^{2+}$ ). Los reactivos de PCR pueden contener opcionalmente un molde a partir del cual puede amplificarse una secuencia diana.

10 Tal como se emplea en la presente, la expresión "ensayo de flap" se refiere a un ensayo en el que un oligonucleótido flap (que consiste en una proyección oligonucleotídica) es escindido de una manera dependiente del solapamiento por una flap endonucleasa para liberar un flap (proyección oligonucleotídica) que después es detectado. Los principios de los ensayos de flap son muy conocidos y se describen, por ejemplo, en Lyamichev *et al.* (Nat. Biotechnol., 1999, 17:292-296), Ryan *et al.* (Mol. Diagn., 1999, 4:135-144), y Allawi *et al.* (J. Clin. Microbiol., 2006, 44:3443-3447). Para contribuir a la claridad, a continuación se describen ciertos reactivos que se emplean en un ensayo de flap. Los principios del ensayo de flap se ilustran en la figura 1. En el ensayo de flap mostrado en la figura 1, un oligonucleótido invasivo **2** y un oligonucleótido flap **4** se hibridan con la diana **6** para producir un primer complejo **8** que contiene un solapamiento de nucleótidos en la posición **10**. El primer complejo **8** es un sustrato para la flap endonucleasa. La flap endonucleasa **12** escinde el oligonucleótido flap **4** para liberar un flap **14** que se hibrida con un módulo FRET **16** que contiene un extintor "Q" y un fluoróforo cercano extinguido "R" que es extinguido por el extintor Q. La hibridación del flap **14** al módulo FRET **16** produce un segundo complejo **18** que contiene un solapamiento de nucleótidos en la posición **20**. El segundo complejo también es un sustrato para la flap endonucleasa. La escisión del módulo FRET **16** por la flap endonucleasa **12** provoca la liberación del fluoróforo **22**, que produce una señal fluorescente. Estos componentes se describen con más detalle a continuación.

25 Tal como se emplea en la presente, la expresión "oligonucleótido invasivo" se refiere a un oligonucleótido que es complementario con una región en un ácido nucleico diana. El nucleótido 3' terminal del oligonucleótido invasivo puede o no aparear su base con un nucleótido en la diana (por ejemplo, que puede ser 5-metilcitosina o uracilo).

30 Tal como se emplea en la presente, la expresión "oligonucleótido flap" se refiere a un oligonucleótido que contiene una región de flap y una región que es complementaria con una región en el ácido nucleico diana. Las regiones complementarias con la diana sobre el oligonucleótido invasivo y el oligonucleótido flap se solapan en un único nucleótido de modo que, cuando se asocian con el ácido nucleico diana, las secuencias complementarias se solapan. Tal como se sabe, si: a) el nucleótido 3' terminal del oligonucleótido invasivo, y b) el nucleótido que se solapa con ese nucleótido en el oligonucleótido flap pueden aparear ambos sus bases con un nucleótido en el ácido nucleico diana, entonces se forma una estructura concreta. Esta estructura es un sustrato para una enzima, definida a continuación como flap endonucleasa, que escinde el flap de la región complementaria con la diana del oligonucleótido flap. Si el nucleótido 3' terminal del oligonucleótido invasivo no puede aparear su base con un nucleótido en el ácido nucleico diana, o si el nucleótido de solapamiento en el oligonucleótido flap no puede aparear su base con un nucleótido en el ácido nucleico diana, entonces el complejo no es un sustrato para la enzima.

40 La expresión "flap endonucleasa" o, de forma abreviada, "FEN", tal como se emplean en la presente, se refiere a una clase de enzimas nucleolíticas que actúan como endonucleasas específicas de estructura sobre estructuras de ADN con un dúplex que contiene una proyección 5' monocatenaria, o flap, en una de las hebras que está desplazado por otra hebra de ácido nucleico, es decir, de modo que existen nucleótidos solapantes en la zona de unión entre el ADN monocatenario y bicatenario. Las FEN catalizan la ruptura hidrolítica del enlace fosfodiéster en la zona de unión del ADN monocatenario y bicatenario, liberando la proyección oligonucleotídica, o flap. Las flap endonucleasas son analizadas por Ceska y Savers (Trends Biochem. Sci., 1998, 23:331-336), y Liu *et al.* (Annu. Rev. Biochem., 2004, 73:589-615). Las FEN pueden ser enzimas individuales, enzimas de múltiples subunidades, o pueden existir como una actividad de otra enzima o complejo de proteínas, por ejemplo, una ADN polimerasa. Una flap endonucleasa puede ser termoestable.

50 Tal como se emplea en la presente, la expresión "flap escindido" se refiere a un oligonucleótido monocatenario que es un producto de escisión de un ensayo flap.

Tal como se emplea en la presente, la expresión "módulo FRET" se refiere a un oligonucleótido con forma de horquilla que contiene un resto de fluoróforo y un resto extintor cercano que extingue el fluoróforo. La hibridación de un flap escindido con un módulo FRET produce un sustrato secundario para la flap endonucleasa. Tras formarse este sustrato, la base que contiene el fluoróforo 5' se escinde del módulo, generando, con ello, una señal de fluorescencia.

55 Tal como se emplea en la presente, la expresión "reactivos del ensayo flap" se refiere a todos los reactivos necesarios para realizar un ensayo de flap sobre un sustrato. Tal como se conoce en la técnica, los ensayos de flap incluyen un oligonucleótido invasivo, un oligonucleótido flap, una flap endonucleasa y un módulo FRET, tal como se describió anteriormente. Los reactivos del ensayo de flap pueden contener opcionalmente una diana con la cual se

unen el oligonucleótido invasivo y el oligonucleótido flap.

Tal como se emplea en la presente, la expresión "locus genómico" se refiere a una región definida en un genoma. Un locus genómico existe en la misma localización en los genomas de diferentes células del mismo individuo, o en diferentes individuos. Un locus genómico en una célula o individuo tiene una secuencia de nucleótidos que es idéntica o muy similar (concretamente, más del 99% idéntica) al mismo locus genómico en una célula o individuo diferente. La diferencia en la secuencia de nucleótidos entre el mismo locus en células o individuos diferentes puede ser debida a una o más sustituciones de nucleótidos. Un locus genómico puede definirse por medio de coordenadas genómicas, por su nombre o empleando un símbolo. Un locus genómico en una muestra de ácido nucleico que ha sido tratada con un agente que modifica la citosina no metilada para producir uracilo tiene la misma secuencia que el locus genómico en una muestra no metilada, excepto porque las citosinas no metiladas en la secuencia (pero no las citosinas metiladas) se han modificado para convertirse en uracilos. En las copias amplificadas de un locus genómico en una muestra de ácido nucleico que ha sido tratada con dicho agente, el uracilo se convierte en timina.

Tal como se emplea en la presente, la expresión "estado de metilación" se refiere a la presencia o la ausencia de un grupo metilo en un resto citosina en un sitio de metilación. Para contribuir a la claridad, una citosina que no esté metilada se denominará "citosina no metilada" o "C no metilada", y una citosina que está metilada (concretamente, 5-metilcitosina) se denominará "citosina metilada", "C metilada," o "metil-C."

Tal como se emplea en la presente, un "sitio de metilación" se refiere a la posición de un nucleótido de citosina que se sabe que, al menos a veces, está metilada en un locus genómico. La citosina en un sitio de metilación puede ser una citosina no metilada o una citosina metilada. En otras palabras, la expresión "sitio de metilación" se refiere a una citosina específica en un locus genómico, cuyo estado de metilación se busca determinar. El sitio de metilación puede definirse por medio de coordenadas genómicas, o coordenadas relativas al codón de inicio de un gen, por ejemplo.

Tal como se describirá con más detalle a continuación, ciertas realizaciones del presente método implican tratar una muestra de ácido nucleico con un agente que convierte específicamente una citosina no metilada en uracilo mediante desaminación. Por tanto, en una muestra no tratada, el sitio de metilación estará ocupado por una citosina no metilada o una citosina metilada, dependiendo del estado de metilación de ese sitio. De modo similar, el sitio de metilación en una muestra tratada estará ocupado por una citosina metilada o un uracilo, dependiendo del estado de metilación de ese sitio en la muestra antes del tratamiento.

La expresión "se corresponde con" y los equivalentes gramaticales, por ejemplo, "correspondiente", tal como se emplea en la presente, se refiere a una relación específica entre los elementos a los cuales se refiere el término. Por ejemplo, un oligonucleótido que se corresponde con una secuencia en un ácido nucleico más largo contiene la misma secuencia de nucleótidos que una secuencia de nucleótidos en el ácido nucleico, o es complementaria con esta.

En el contexto de un nucleótido en un oligonucleótido que se corresponde con un sitio de metilación o un nucleótido en un oligonucleótido que se corresponde con una citosina metilada, la expresión "se corresponde con" y sus equivalentes gramaticales pretenden identificar el nucleótido que está colocado en correspondencia a un sitio de metilación (es decir, está colocado al otro lado) cuando los dos ácidos nucleicos (por ejemplo, un oligonucleótido y un ADN genómico que contiene una citosina metilada) se alinean o se aparean sus bases. De nuevo, a menos que se indique lo contrario (por ejemplo, en el caso de un nucleótido "que no aparea su base" o "que aparea su base" con un resto particular), un nucleótido que "se corresponde con" un sitio de metilación aparea su base con un sitio metilado o con un sitio no metilado. Para contribuir a la claridad, en un oligonucleótido, un nucleótido G o C en una posición que se corresponde con una citosina metilada en una secuencia, por ejemplo, un locus genómico, puede: a) aparearse su base con una citosina metilada en la secuencia, b) aparearse su base con una citosina que se corresponde, según la posición, a la citosina metilada en una versión amplificada de la secuencia, o c) aparearse su base con un resto G que es complementario con dicha citosina en una secuencia amplificada.

Tal como se describirá con más detalle a continuación, el presente método también puede implicar amplificar un muestra de producto de ácido nucleico que ha sido tratada con un agente que convierte específicamente una citosina no metilada en uracilo (véase, por ejemplo, Frommer *et al.*, Proc. Natl. Acad. Sci., 1992, 89:1827-1831). Como resultado de la etapa de amplificación, las citosinas metiladas se convierten en citosinas, y los uracilos se convierten en timinas. Por tanto, el estado de metilación de un nucleótido de citosina en la muestra inicial puede evaluarse determinando si un par de bases en el producto de la amplificación, que está en la misma posición que la citosina en cuestión, es un par de bases C/G (lo cual indica que la citosina en cuestión está metilada) o un par de bases A/T (lo cual indica que el resto citosina no está metilado). Por tanto, el estado de metilación de una citosina en una muestra inicial puede determinarse amplificando un producto bicatenario de una muestra que ha sido tratada con un agente que convierte específicamente la citosina no metilada en uracilo, y después estudiando la posición que se corresponde con la citosina diana en cualquiera de las hebras (es decir, la hebra superior o la hebra inferior) del producto de la amplificación para determinar si está presente una A o una T (lo cual indica que la citosina en cuestión está metilada), o si está presente una G o una C (lo cual indica que la citosina en cuestión está metilada). Así, en el contexto de un oligonucleótido que se hibrida con un producto de la amplificación bicatenario producido mediante la amplificación de un locus genómico a partir de una muestra que ha sido tratada con un agente que

convierte específicamente una citosina no metilada en uracilo, un nucleótido que "se corresponde con" un sitio de metilación es un nucleótido que aparea su base con la hebra superior o la hebra inferior en el sitio de metilación.

5 Tal como se emplea en la presente, una "secuencia que está metilada" es una secuencia de nucleótidos que contiene un sitio de metilación, concretamente, un nucleótido de citosina que se sabe que, al menos algunas veces, está metilado.

Tal como se emplea en la presente, la expresión "no metilado", con relación a una secuencia de nucleótidos, se refiere a las copias de una secuencia que no están metiladas.

10 Tal como se emplea en la presente, el término "metilado", con relación a una secuencia de nucleótidos, se refiere a las copias de una secuencia que contienen 5-metilcitosina. La metilación de un locus genómico puede, por ejemplo, alterar la expresión de una proteína, que provoca un cambio fenotípico (por ejemplo, un fenotipo relacionado con el cáncer) en las células que poseen dicho locus metilado. Como alternativa, la metilación de un locus genómico puede ser silenciosa.

15 Una muestra que comprende "copias no metiladas y metiladas de un locus genómico" y sus equivalentes gramaticales, se refiere a una muestra que contiene múltiples moléculas de ADN del mismo locus genómico, en la que la muestra contiene copias no metiladas del locus genómico y copias metiladas del mismo locus. En este contexto, el término "copias" no pretende significar que las secuencias se copiaron entre sí. Por el contrario, el término "copias" pretende indicar que las secuencias son del mismo locus en células o individuos diferentes. En otras palabras, una muestra contiene una mezcla de moléculas de ácidos nucleicos que tienen la misma secuencia de nucleótidos, excepto que algunas de las moléculas contienen restos citosina metilados.

20 Tal como se emplea en la presente, la expresión "grado de metilación" se refiere al número relativo, porcentaje o fracción de miembros de una especie de nucleótido diana concreto dentro de una muestra que están metilados, comparado con los miembros de esa especie de nucleótido diana concreto que no están metilados.

25 Tal como se emplea en la presente, la expresión "un agente que modifica una citosina no metilada para producir uracilo" se refiere a cualquier agente que específicamente desamina la citosina no metilada para producir uracilo. Estos agentes son específicos porque no desaminan la 5-metilcitosina para producir uracilo. El bisulfito es un ejemplo de dicho agente.

Tal como se emplea en la presente, la expresión "una muestra de ácido nucleico tratada" es una muestra de ácido nucleico que ha sido tratada con un agente que modifica la citosina no metilada para producir uracilo.

30 Tal como se emplea en la presente, la expresión "muestra inicial" se refiere a una muestra que no ha sido tratada con un agente que modifica la citosina no metilada para producir uracilo.

35 Tal como se emplea en la presente, la expresión "secuencia de nucleótidos" se refiere a una secuencia de nucleótidos contigua en un ácido nucleico. Tal como será evidente, el número de nucleótidos en una secuencia de nucleótidos puede variar en gran medida. En realizaciones concretas, una secuencia de nucleótidos (por ejemplo, de un oligonucleótido) puede tener una longitud suficiente para la hibridación con una secuencia de nucleótidos complementaria en otro ácido nucleico. En estas realizaciones, una secuencia de nucleótidos puede tener una longitud en el intervalo de al menos 10 a 50 nucleótidos, por ejemplo, de 12 a 20 nucleótidos, aunque en muchas circunstancias pueden emplearse longitudes fuera de estos intervalos.

40 Tal como se emplea en la presente, la expresión "totalmente complementario con", en el contexto de un primer ácido nucleico que es totalmente complementario con un segundo ácido nucleico, se refiere al caso en que cada nucleótido de una secuencia de nucleótidos contigua en un primer ácido nucleico aparea su base con un nucleótido complementario en un segundo ácido nucleico.

45 Tal como se emplea en la presente, la expresión "pareja de cebadores" se emplea para indicar dos cebadores que pueden emplearse en una reacción en cadena con polimerasa para amplificar un locus genómico. Puede indicarse que una pareja de cebadores, en ciertas circunstancias, contiene "un primer cebador" y "un segundo cebador" o "un cebador directo" y "un cebador inverso". El uso de cualquiera de estos términos es arbitrario y no pretende indicar si un cebador se hibrida con una hebra superior o una hebra inferior de un ácido nucleico bicatenario.

50 Una isla de "CpG" se define como una región de ADN mayor que 500 pb con un contenido en G/C de al menos 55% y una proporción de CpG/CpG esperada observada de al menos 0,65, según se define en Takai *et al.*, Proc. Natl. Acad. Sci., 2002, 99:3740-3745). El uso de esta fórmula para identificar islas de CpG excluye otras secuencias genómicas ricas en GC, tales como las repeticiones *Alu*.

#### Descripción de ejemplos de realizaciones

Antes de describir con más detalle la presente invención, debe entenderse que esta invención no se limita a las realizaciones concretas descritas, puesto que estas, por supuesto, pueden variar. Se entenderá que la terminología empleada en la presente se utiliza solo con el fin de describir realizaciones concretas y no pretende ser limitante,

puesto que el alcance de la presente invención solo se verá limitado por las reivindicaciones adjuntas.

5 Cuando se proporciona un intervalo de valores, se entiende que cada valor intermedio, hasta la décima parte de la unidad del límite inferior, a menos que el contexto indique claramente lo contrario, entre el límite superior e inferior de ese intervalo y cualquier otro valor indicado o intermedio en este intervalo mencionado, está incluido dentro de la invención. Los límites superior e inferior de estos intervalos más pequeños pueden incluirse independientemente en los intervalos más pequeños y también se incluyen dentro de la invención, sometidos a cualquier límite específicamente excluido en el intervalo mencionado. Cuando el intervalo mencionado incluye uno o ambos límites, los intervalos que excluyen cualquiera o ambos de estos límites incluidos también se incluyen en la invención.

10 A menos que se indique lo contrario, todos los términos y expresiones técnicos y científicos empleados en la presente tienen el mismo significado que el que entienden habitualmente los expertos en la técnica a la cual pertenece esta invención. Aunque también pueda emplearse cualquier método y material similar o equivalente los descritos en la presente en la práctica o el ensayo de la presente invención, a continuación se describirán los métodos y materiales preferidos.

15 Debe advertirse que, tal como se emplean en la presente y en las reivindicaciones adjuntas, las formas en singular "un/una" y "el/la" incluyen los referentes en plural, a menos que el contexto indique claramente lo contrario. También se hace notar que las reivindicaciones pueden redactarse para excluir cualquier elemento opcional. Así, esta afirmación pretende servir como base antecedente para el uso de una terminología exclusiva, tal como "solamente," "solo" y similares, en conexión con la relación de los elementos de la reivindicación, o el uso de una limitación "negativa".

20 Tal como será evidente para los expertos en la técnica tras leer esta descripción, cada una de las realizaciones individuales descritas e ilustradas en la presente tiene características y componentes discretos que pueden separarse con facilidad o combinarse con las características de cualquiera de las otras varias realizaciones sin apartarse del alcance de las reivindicaciones. Cualquier método mencionado puede realizarse en el orden de acontecimientos mencionado o en cualquier otro orden que sea lógicamente posible.

25 En la siguiente descripción, los expertos en la técnica entenderán que puede utilizarse cualquiera de una serie de polimerasas y flap endonucleasas en los métodos, que incluyen, sin limitación, aquellas aisladas a partir de procariotas, eucariotas o arqueobacterias termoestables o hipertermoestables. Los expertos en la técnica también entenderán que las enzimas que se emplean en el método, por ejemplo, polimerasa y flap endonucleasa, incluyen no solo las enzimas naturales, sino también las enzimas recombinantes, que incluyen los fragmentos enzimáticamente activos, los productos del corte y empalme, los mutantes y las variantes de las enzimas de tipo salvaje.

30 Para describir más a fondo el método, en primer lugar se describirá la mezcla de reactivos empleada en el método, seguido de una descripción del método por el cual una muestra puede ser tratada y las condiciones de reacción que pueden emplearse en el método.

### 35 *Mezcla de reacción*

La mezcla de reacción puede variar dependiendo del modo en que se realice la reacción, por ejemplo, si uno o ambos del primer y segundo cebador se hibridan con secuencias metiladas, o si el primer cebador (que se emplea para la amplificación de un locus genómico) también se emplea como oligonucleótido invasivo en el ensayo de flap, en cuyo caso no es necesario incluir un oligonucleótido invasivo diferenciado en la mezcla de ensayo.

40 En términos generales, la mezcla de reacción empleada en el método puede contener, en general: a) reactivos de amplificación que comprenden una polimerasa termoestable, nucleótidos, un primer cebador y un segundo cebador para amplificar un locus genómico diana a partir de una muestra de ácido nucleico tratada; en la que: i. el primer cebador se hibrida con una secuencia metilada en el locus genómico y contiene un nucleótido G o C 3' terminal que se corresponde con una citosina metilada en el locus genómico; y ii. los reactivos preferentemente amplifican las copias metiladas del locus genómico para producir una muestra amplificada; b) reactivos del ensayo de flap que comprenden una flap endonucleasa, un módulo FRET, y un oligonucleótido flap; y c) la muestra de ácido nucleico tratada, en la que la muestra de ácido nucleico tratada se prepara tratando una muestra de ácido nucleico inicial, que comprende copias metiladas y copias no metiladas del locus genómico, con un agente que modifica la citosina no metilada para producir uracilo. El oligonucleótido flap contiene un nucleótido G o C en una posición que se corresponde con la citosina metilada. La mezcla de reacción se caracteriza porque puede amplificar y detectar la presencia de copias metiladas del locus genómico en la muestra.

55 Tal como se indicó anteriormente, la amplificación en general emplea un primer cebador que se hibrida con una secuencia metilada en un locus genómico y amplifica preferentemente las copias metiladas del locus genómico. El primer cebador contiene uno o más nucleótidos (por ejemplo, restos G) que aparean sus bases con los correspondientes nucleótidos de citosina metilada en la secuencia metilada (que se habrían convertido en un uracilo si no estuvieran metiladas). En realizaciones concretas, el primer cebador puede contener hasta 3 o 4 nucleótidos que aparean sus bases con las correspondientes citosinas metiladas en una secuencia metilada, en particular hacia el extremo 3' del cebador, convirtiendo así el cebador en un cebador específico de la metilación, ya que amplifica

preferentemente las copias metiladas del locus genómico. En una realización, el cebador puede contener un nucleótido 3' terminal que aparea su base con una citosina metilada en la secuencia metilada, o aparea su base con un resto G en un amplicón complementario con una citosina metilada, así como 1, 2 o 3 nucleótidos más que aparean sus bases con otras citosinas metiladas o sus complementos en la secuencia. Así, el primer cebador puede contener uno o más nucleótidos G o C internos en posiciones que se corresponden con un correspondiente número de una segunda o más citosinas metiladas en el locus genómico.

Aunque la amplificación preferente de las copias metiladas de un locus genómico puede realizarse empleando una pareja de cebadores, en la que solo uno de los cebadores es específico de la metilación, en realizaciones concretas, tanto el primer como el segundo cebador pueden ser específicos de la metilación, porque ambos se hibridan con secuencias metiladas en el locus genómico.

El diseño de cebadores específicos de la metilación que pueden estar presentes en la mezcla de reacción puede adaptarse, por ejemplo, a partir de los métodos de diseño de cebadores descritos, por ejemplo, por Herman *et al.* (Methylation-specific PCR: a novel PCR assay for methylation status of CpG islands, Proc. Natl. Acad. Sci., 1996, 93:9821-9826), y Ehrich *et al.* (Quantitative high-throughput analysis of DNA methylation patterns by base-specific cleavage and mass spectrometry, Proc. Natl. Acad. Sci., 2005, 102:15785-90), así como los analizados en Li (Designing PCR primer for DNA methylation mapping, Methods Mol Biol., 2007, 402:371-84), Derks *et al.* (Methylation-specific PCR unraveled, Cell Oncol., 2004, 26:291-299), y Cottrell *et al.* (Sensitive detection of DNA methylation, Ann. N. Y. Acad. Sci., 2003, 983:120-130). Puesto que se conocen las identidades de muchas, sino todas, las islas de CpG en el genoma humano y otros genomas (véase, por ejemplo, Lauss *et al.*, Br. J. Cancer, MethCancerDB - aberrant DNA methylation in human cancer, 2008, 98:816-817; Wang *et al.*, Bioinformatics, An evaluation of new criteria for CpG islands in the human genome as gene markers, 2003, 20:1170-1177), el diseño de cebadores específicos de la metilación para el análisis de una serie de diferentes loci genómicos puede realizarse sin esfuerzo.

El primer cebador contiene un nucleótido 3' terminal que aparea su base con una citosina metilada en la secuencia a la cual se une el cebador. Por tanto, el primer cebador se emplea como oligonucleótido invasivo en el ensayo de flap y, así, no es necesario que la mezcla de reacción contenga un oligonucleótido invasivo además del primer cebador. En la presente también se describen métodos en los que el primer cebador no contiene un nucleótido 3' terminal que aparea su base con una citosina metilada en la secuencia metilada. En estas realizaciones, la mezcla de reacción puede contener un oligonucleótido invasivo diferenciado que contiene un nucleótido G o C 3' terminal que se corresponde con el sitio de metilación. En estas realizaciones, el nucleótido 3' terminal del oligonucleótido invasivo puede aparearse su base con un sitio de metilación que está en posición interna en la secuencias de los cebadores en el producto de la amplificación.

En realizaciones alternativas descritas en la presente, la mezcla de reacción puede comprender un primer cebador que contiene un nucleótido 3' terminal que aparea su base con una citosina metilada o su complemento en el locus genómico, así como un oligonucleótido invasivo que contiene un nucleótido G o C 3' terminal que se corresponde con el sitio de metilación. En estas realizaciones, el nucleótido 3' del primer cebador y el nucleótido 3' terminal del oligonucleótido invasivo aparean sus bases con nucleótidos en diferentes sitios de metilación en el locus genómico. En una realización, el nucleótido 3' terminal del oligonucleótido invasivo aparea su base con un sitio de metilación que está en posición interna en la secuencias de los cebadores en el producto de la amplificación.

En realizaciones concretas descritas en la presente, un oligonucleótido invasivo distinto puede contener otros nucleótidos (por ejemplo, nucleótidos G o C) además del nucleótido 3' terminal que aparea su base con nucleótidos en otros sitios de metilación. En otras palabras, un oligonucleótido invasivo distinto puede contener uno o más (por ejemplo, 1, 2, 3 o 4 o más) nucleótidos G o C internos que se corresponden con las citosinas metiladas. Estos nucleótidos internos aumentan la especificidad de unión del oligonucleótido invasivo al ácido nucleico que ha sido amplificado a partir de las copias metiladas del locus genómico, aumentando con ello la fidelidad de detección. De una manera similar, la porción del oligonucleótido flap que se hibrida con el producto de la amplificación puede contener uno o más (por ejemplo, 1, 2, 3 o 4 o más) nucleótidos G o C internos que se corresponden con las citosinas metiladas, que actúan para aumentar la especificidad de unión del oligonucleótido flap al ácido nucleico que ha sido amplificado a partir de las copias metiladas del locus genómico, aumentando con ello la fidelidad de detección. Así, en algunas realizaciones, el oligonucleótido flap puede contener una o más posiciones de nucleótidos G o C internos que se corresponden con un correspondiente número de una segunda o más citosinas metiladas en el locus genómico.

Las identidades y concentraciones de reactivos exactas presentes en la mezcla pueden ser similares o iguales a las que se emplean independientemente en los ensayos de PCR y de escisión del flap, con la excepción de que la mezcla de reacción contiene  $Mg^{2+}$  a una concentración que es mayor que la empleada en mezclas de reacción de PCR convencionales (que contienen  $Mg^{2+}$  a una concentración de entre aproximadamente 1,8 mM y 3 mM). En ciertas realizaciones, la mezcla de reacción descrita en la presente contiene  $Mg^{2+}$  a una concentración de 4 mM a 10 mM, por ejemplo, de 6 mM a 9 mM. Los ejemplos de tampones de reacción y ADN polimerasas que pueden emplearse en la presente mezcla de reacción incluyen los descritos en diversas publicaciones (por ejemplo, Ausubel, *et al.*, Short Protocols in Molecular Biology, 3ª ed., Wiley & Sons, 1995; y Sambrook *et al.*, Molecular Cloning: A Laboratory Manual, 3ª edición, 2001 Cold Spring Harbor, N.Y.). Los tampones de reacción y ADN



polimerasas adecuados para la PCR pueden adquirirse en una diversidad de suministradores, por ejemplo, Invitrogen (Carlsbad, CA), Qiagen (Valencia, CA) y Stratagene (La Jolla, CA). Los ejemplos de polimerasas incluyen *Taq*, *Pfu*, *Pwo*, *UITma* y *Vent*, aunque en ciertas realizaciones pueden emplearse otras muchas polimerasas. Las indicaciones para los componentes de reacción adecuados para su uso con una polimerasa, así como las condiciones adecuadas para el uso, se encuentran en la información suministrada con la polimerasa. El diseño de cebadores se describe en una diversidad de publicaciones, por ejemplo, Diffenbach y Dveksler (PCR Primer, A Laboratory Manual, Cold Spring Harbor Press, 1995); R. Rapley, (The Nucleic Acid Protocols Handbook (2000), Humana Press, Totowa, N.J.); Schena y Kwok *et al.*, Nucl. Acid Res., 1990, 18:999-1005). También están disponibles en el mercado programas informáticos de diseño de cebadores y sondas que incluyen, sin limitación, Primer Detective (ClonTech, Palo Alto, Calif.), Lasergene, (DNASTAR, Inc., Madison, Wis.), Oligo Software (National Biosciences, Inc., Plymouth, Minn), e iOligo (Caesar Software, Portsmouth, N.H).

Los ejemplos de reactivos de ensayo de escisión de flap se encuentran en Lyamichev *et al.* (Nat. Biotechnol., 1999, 17:292-296), Ryan *et al.* (Mol. Diagn., 1999, 4:135-144), y Allawi *et al.* (J. Clin. Microbiol., 2006, 44:3443-3447). Las condiciones apropiadas para las reacciones de flap endonucleasa son conocidas o pueden determinarse con facilidad empleando métodos conocidos en la técnica (véase, por ejemplo, Kaiser *et al.*, J. Biol. Chem., 274:21387-21394, 1999). Los ejemplos de flap endonucleasas que pueden utilizarse en el método incluyen, sin limitación, ADN polimerasa I de *Thermus aquaticus*, ADN polimerasa I de *Thermus thermophilus*, FEN-1 de mamífero, FEN-1 de *Archaeoglobus fulgidus*, FEN-1 de *Methanococcus jannaschii*, FEN-1 de *Pyrococcus furiosus*, FEN-1 de *Methanobacterium thermoautotrophicum*, FEN-1 de *Thermus thermophilus*, CLEAVASE™ (Third Wave, Inc., Madison, Wis.), RTH1 de *S. cerevisiae*, RAD27 de *S. cerevisiae*, rad2 de *Schizosaccharomyces pombe*, 5'-3' exonucleasa del bacteriófago T5, FEN-1 de *Pyrococcus horikoshii*, exonucleasa 1 humana, 5'-3' exonucleasa de timo de ternera, que incluye sus homólogos en eubacterias, eucariotas y arqueobacterias, tales como los miembros de la clase II de la familia de enzimas específicas de estructura, así como sus variantes o mutantes enzimáticamente activos. Pueden encontrarse descripciones de enzimas de ruptura y escisión, entre otros lugares, en Lyamichev *et al.*, Science, 260:778-783, 1993; Eis *et al.*, Nat. Biotechnol., 19:673-676, 2001; Shen *et al.*, Trends in Bio. Sci., 23:171-173, 1998; Kaiser *et al.*, J. Biol. Chem., 274:21387-21394, 1999; Ma *et al.*, J. Biol. Chem., 275:24693-24700, 2000; Allawi *et al.*, J. Mol. Biol., 328:537-554, 2003; Sharma *et al.*, J. Biol. Chem., 278:23487-23496, 2003; y Feng *et al.*, Nat. Struct. Mol. Biol., 11:450-456, 2004.

En realizaciones concretas, la mezcla de reacción puede contener reactivos para ensayar múltiples (por ejemplo, al menos 2, 3, 4 o más) secuencias diana diferentes en paralelo. En estos casos, la mezcla de reacción puede contener múltiples parejas de cebadores de PCR, múltiples oligonucleótidos flap diferentes que contienen diferentes flaps, y múltiples módulos FRET diferentes para detectar diferentes flaps, tras haber sido escindidos. En una realización, los oligonucleótidos en una mezcla pueden tener flaps comunes pero diferentes secuencias de unión para permitir, por ejemplo, que cualquiera de una serie de citosinas metiladas pueda escindir un módulo FRET común y producir una señal, en la que un único fluoróforo es indicativo de la presencia de una citosina metilada. En esta realización, la determinación del sitio que está metilado en la muestra se realiza después de haber identificado la presencia de una citosina metilada. Opcionalmente, la reacción puede contener múltiples oligonucleótidos invasivos si uno de los cebadores de la PCR no se emplea como oligonucleótido invasivo. Tras la escisión de los módulos FRET pueden observarse múltiples señales fluorescentes distinguibles. El fluoróforo puede seleccionarse, por ejemplo, de 6-carboxifluoresceína (FAM), que tiene unas longitudes de onda de excitación y emisión de 485 nm y 520 nm, respectivamente, rojo de Redmond, que tiene unas longitudes de onda de excitación y emisión de 578 nm y 650 nm, respectivamente, y amarillo de Yakima, que tiene unas longitudes de onda de excitación y emisión de 532 nm y 569 nm, respectivamente, y Quasor670, que tiene unas longitudes de onda de excitación y emisión de 644 nm y 670 nm, respectivamente, aunque pueden emplearse muchos otros. En ciertos casos, al menos uno de entre las parejas de cebadores de PCR, oligonucleótidos flap y módulos FRET puede ser para la detección de un control interno. En este ensayo, los reactivos de control pueden ser, por ejemplo, para la amplificación y la detección de un locus que no está metilado o, por ejemplo, para la amplificación y la detección de copias del mismo locus. En estas realizaciones, una mezcla de reacción puede contener, además de otros reactivos necesarios, al menos un oligonucleótido que contiene un nucleótido 3' terminal que aparea su base con un resto A o T en un sitio de metilación, proporcionando con ello la detección de las copias no metiladas del locus genómico. Estas realizaciones también pueden emplear cebadores que amplifican las copias no metiladas del locus genómico.

Tal como será evidente, los diversos oligonucleótidos empleados en el método se diseñan para que no interfieran entre sí. Por ejemplo, en realizaciones concretas, el oligonucleótido flap puede estar bloqueado en su extremo 3', evitando con ello su extensión. De forma similar, en ciertas realizaciones, el oligonucleótido invasivo también puede estar bloqueado en su extremo 3' si no se emplea como uno de los cebadores de la PCR. En una realización concreta, si el oligonucleótido invasivo no se emplea como uno de los cebadores de la PCR, entonces el oligonucleótido invasivo puede estar presente a una concentración que está en el intervalo del 5% al 50%, por ejemplo, del 10% al 40% de la concentración de los cebadores de la PCR. Además, en ciertos casos, las  $T_m$  de la porción de flap y las regiones complementarias diana del oligonucleótido flap pueden ser independientemente al menos 10 °C menores (por ejemplo 10-20 °C menores) que las  $T_m$  de los cebadores de la PCR, lo que da como resultado: a) una menor hibridación del oligonucleótido flap con el ácido nucleico diana a temperaturas más altas (de 65 °C a 75 °C), y b) una menor hibridación de cualquier flap escindido con el módulo FRET a temperaturas más altas (de 65 °C a 75 °C), permitiendo con ello que el locus genómico se amplifique mediante PCR a una temperatura en la

que el flap no se hibrida de modo eficaz.

En una reacción múltiple, los cebadores pueden diseñarse para que tengan propiedades termodinámicas similares, por ejemplo,  $T_m$ , contenido en G/C y estabilidad de la horquilla similares y, en ciertas realizaciones, todos pueden tener una longitud similar, por ejemplo, de 18 a 30 nt, por ejemplo, de 20 a 25 nt de longitud. Los otros reactivos empleados en la mezcla de reacción también pueden tener  $T_m$  emparentadas.

La mezcla de ensayo puede estar presente en un recipiente que incluye, sin limitación, un tubo; una placa de múltiples pocillos, tal como una placa de 96 pocillos, de 384 pocillos, de 1536 pocillos; y un dispositivo de microfluidos. En ciertas realizaciones, se realizan múltiples reacciones de múltiple en el mismo recipiente de reacción. Dependiendo del modo en que se realice la reacción, la mezcla de reacción puede tener un volumen de 5  $\mu$ l a 200  $\mu$ l, por ejemplo, de 10  $\mu$ l a 100  $\mu$ l, aunque se contemplan volúmenes fuera de este intervalo.

En ciertas realizaciones, una mezcla de reacción pertinente puede contener además una muestra de ácido nucleico. En realizaciones concretas, la muestra puede contener ADN genómico o una de sus versiones amplificadas (por ejemplo, ADN genómico amplificado empleando los métodos de Lage *et al.*, *Genome Res.*, 2003, 13:294-307, o la solicitud de patente publicada US20040241658, por ejemplo). En ejemplos de realizaciones, la muestra genómica puede contener un ADN genómico de una célula de mamífero, tal como una célula humana, de ratón, de rata o de mono. La muestra puede proceder de células cultivadas o de células de una muestra clínica, por ejemplo, una biopsia de tejido, un raspado o lavado de células de una muestra forense (es decir, células de una muestra recogida en la escena de un crimen). En realizaciones concretas, la muestra genómica puede proceder de una muestra sumergida en parafina fijada con formol (FFPE).

#### Método para el análisis de las muestras

En realizaciones concretas, la muestra de ácido nucleico puede obtenerse de una muestra biológica, tal como células, tejidos, fluidos corporales y heces. Los fluidos corporales de interés incluyen, pero no se limitan a sangre, suero, plasma, saliva, moco, flegma, fluido cerebroespinal, fluido pleural, lágrimas, fluido del conducto lactal, linfa, esputo, fluido cerebroespinal, fluido sinovial, orina, fluido amniótico, y semen. En realizaciones concretas, una muestra puede obtenerse de un sujeto, por ejemplo, un ser humano, y puede procesarse antes de emplearse en el presente ensayo. Por ejemplo, el ácido nucleico puede extraerse de la muestra antes del uso, conociéndose métodos para ello.

Por ejemplo, el ADN puede extraerse de las heces con cualquiera de una serie de métodos diferentes, que incluyen los descritos, por ejemplo, en Coll *et al.* (*J. of Clinical Microbiology*, 1989 27:2245-2248), Sidransky *et al.* (*Science*, 1992, 256:102-105), Villa (*Gastroenterology*, 1996, 110:1346-1353) y Nollau (*BioTechniques*, 1996, 20:784-788), y las patentes de EE. UU. 5463782, 7005266, 6303304 y 5741650. Los kits de extracción de ADN del mercado para la extracción de ADN de heces incluyen el kit QIAamp Stool Mini Kit (QIAGEN, Hilden, Alemania), Instagene Matrix (Bio-Rad, Hercules, Calif.), y el kit de aislamiento de ADN genómico RapidPrep Micro Genomic DNA Isolation Kit (Pharmacia Biotech Inc., Piscataway, N.J.), entre otros.

El tratamiento de una muestra de ácido nucleico inicial para producir una muestra de ácido nucleico tratada implica poner en contacto la muestra de ácido nucleico inicial con un agente que modifica la citosina no metilada para producir uracilo bajo unas condiciones (por ejemplo, una longitud de tiempo y temperatura, etc.) que provocan que las citosinas no metiladas en el ácido nucleico se desaminen, convirtiéndose, con ello, en uracilos. Estos métodos se conocen y se describen, por ejemplo, en Clark *et al.* (*Nucleic Acids Res.*, 1994, 22:2990-2997), McDonald *et al.* (*BioTechniques*, 1997, 22:272-274), Herman *et al.* (*Proc. Natl. Acad. Sci.*, 1996, 93:9821-9826) y Paul *et al.* (*BioTechniques*, 1996, 21:126-133), así como en una diversidad de otras referencias.

Después del tratamiento, la muestra, denominada en la presente la "muestra tratada", se combina con otros reactivos para producir la mezcla de reacción descrita anteriormente, y después se somete a una o más series de condiciones de termociclado.

Los ejemplos de condiciones incluyen, por ejemplo, las descritas en Allawi *et al.* (*J. Clin. Microbiol.*, 2006, 44:3443-3447). En una realización, la mezcla de reacción puede someterse a un termociclado de PCR convencional (es decir, múltiples rondas de desnaturalización a una temperatura mayor que 90 °C, por ejemplo, a aproximadamente 95 °C, asociado a una temperatura de 65 °C a 75 °C, y extensión a una temperatura de 65 °C a 75 °C), seguido de un periodo a alta temperatura para desnaturalizar la polimerasa termoestable (por ejemplo, a aproximadamente 99 °C), y después a un periodo a una temperatura que es aproximadamente 10 °C más baja que la temperatura de extensión durante la cual se detecta la fluorescencia.

En otras realizaciones, la mezcla de reacción puede someterse a condiciones de ciclado en la que puede medirse a tiempo real un aumento en la cantidad del producto amplificado (indicado por la cantidad de fluorescencia), y la expresión "a tiempo real" pretende indicar una medición que se toma a medida que la reacción avanza y los productos se acumulan. La medición puede expresarse en número absoluto de copias o como una cantidad relativa cuando se normaliza a un ácido nucleico control en la muestra. En una realización a tiempo real, la reacción puede someterse a las condiciones de termociclado descritas, por ejemplo, en Tadokoro (*J. Vir. Methods*, 2009, 155:182-186). En esta realización, la mezcla de reacción puede someterse a múltiples ciclos de cuatro etapas, que incluyen

una etapa de desnaturalización a una temperatura mayor que 90 °C, por ejemplo, a aproximadamente 95 °C, asociado a una temperatura en el intervalo de 61 °C a 69 °C, escisión del flap a una temperatura de 50 °C, y extensión a una temperatura de 72 °C. En esta realización, la fluorescencia puede controlarse en cada ciclo para proporcionar una medición a tiempo real de la cantidad de producto que se está acumulando en la mezcla de reacción.

En una realización alternativa, la mezcla de puede someterse a las siguientes condiciones de termociclado: una primera serie de 5 a 15 (por ejemplo, de 8 a 12) ciclos de: i. una primera temperatura de al menos 90 °C; ii. una segunda temperatura en el intervalo de 60 °C a 75 °C (por ejemplo, de 65 °C a 75 °C); iii. una tercera temperatura en el intervalo de 65 °C a 75 °C; seguido de: una segunda serie de 20-50 ciclos de: i. una cuarta temperatura de al menos 90 °C; ii. una quinta temperatura que es al menos 10 °C más baja que la segunda temperatura (por ejemplo, en el intervalo de 50 °C a 55 °C); y iii. una sexta temperatura en el intervalo de 65 °C a 75 °C. No es necesario añadir más reactivos a la mezcla de reacción durante el termociclado, por ejemplo, entre la primera y la segunda serie de ciclos. En realizaciones concretas, la polimerasa termoestable no se inactiva entre la primera y la segunda serie de condiciones, lo cual permite que la diana se amplifique durante cada ciclo de la segunda serie de ciclos. En realizaciones concretas, la segunda y la tercera temperatura son la misma temperatura, de modo que se ejecutan las condiciones de termociclado de "dos etapas". Cada uno de los ciclos puede tener independientemente una duración en el intervalo de 10 segundos a 3 minutos, aunque pueden emplearse unas duraciones fuera de este intervalo. En cada ciclo de la segunda serie de ciclos (por ejemplo, cuando la reacción se encuentra en la quinta temperatura), puede medirse una señal generada por la escisión de la sonda de flap para proporcionar una medición a tiempo real de la cantidad de producto en la muestra.

Algunos de los principios del método descrito en la presente se ilustran esquemáticamente en la figura 2. Sin embargo, tal como se indicó anteriormente, el método puede realizarse de muchas maneras diferentes, por ejemplo, empleando el primer cebador como oligonucleótido invasivo según la invención o empleando un único cebador específico de la metilación.

Con respecto a la figura 2, el método incluye tratar una muestra inicial **30** que comprende copias metiladas de un locus genómico **32** y copias no metiladas del locus genómico **34** con un agente que modifica la citosina no metilada a uracilo para producir una muestra tratada **36**. Este tratamiento convierte las citosinas no metiladas, por ejemplo, **38**, en uracilos, por ejemplo, **40**. Las citosinas metiladas, por ejemplo, **42**, siguen siendo citosinas metiladas durante el tratamiento. La muestra tratada **36** después se combina con los otros reactivos.

El producto **44** después se amplifica a partir de la muestra tratada **36** empleando el primer cebador **46** y el segundo cebador **48**, en el que el primer cebador se hibrida con una secuencia metilada en el locus y la amplificación preferentemente amplifica las copias metiladas del locus genómico, para producir una muestra amplificada **50**. Tal como se ilustra, tanto el primer cebador **46** como el segundo cebador **48** se hibridan con las secuencias metiladas. Sin embargo, en la práctica, solo es necesario que uno de los cebadores se hibride con una secuencia metilada. En realizaciones concretas y tal como se indicó anteriormente, el primer cebador puede contener un nucleótido 3' terminal que aparea su base con una citosina metilada, aunque esto no es necesario si la reacción emplea un oligonucleótido invasivo que sea diferente del primer cebador. Estos cebadores, en general, contienen nucleótidos G en sitios de metilación, lo cual permite a los cebadores hibridarse y extenderse con más eficacia a partir de secuencias que contienen citosina metilada (que no se ve afectada por el tratamiento), en oposición a secuencias que contienen citosina no metilada (que se convierte en U por medio del tratamiento). Tal como se ilustra en la figura 2, la presencia del producto **44** en la muestra amplificada **50** puede detectarse usando un ensayo de flap que emplea un oligonucleótido invasivo **52** que tiene un nucleótido 3' terminal que aparea su base con un resto G o C que se corresponde con un sitio de metilación. La elección del resto G o C depende de que el nucleótido que se corresponde con el sitio de metilación que va a ser detectado está en la hebra superior o inferior del producto de la amplificación. Tal como se muestra, el oligonucleótido invasivo **52** tiene un nucleótido G terminal porque aparea su base con una C que se corresponde con un sitio de metilación en la muestra inicial **30**. De nuevo, tal como se indicó anteriormente, las realizaciones ilustradas en la figura 2 emplean un oligonucleótido invasivo diferente. Según la invención, el primer cebador se emplea como oligonucleótido invasivo en el método y, así, no es necesario emplear un oligonucleótido invasivo diferente en el ensayo. Tal como se muestra en la figura 2, el nucleótido 3' terminal del oligonucleótido invasivo aparea su base con un sitio de metilación "interno", en el sentido de que el sitio está dentro de la región amplificada y no es parte del primer ni del segundo cebador.

Tal como se muestra, el ensayo de flap se basa en la escisión del complejo **53** que contiene un oligonucleótido invasivo **52**, un oligonucleótido flap **56**, y la hebra inferior del producto **44** por una flap endonucleasa (no se muestra) para liberar el flap **60**. El flap liberado **60** después se hibrida con el módulo FRET **62** para formar un segundo complejo **63** que es escindido por la flap endonucleasa para escindir el fluoróforo del complejo y generar una señal fluorescente **64** que puede medirse para indicar la cantidad de producto **44** en la muestra amplificada.

Ciertos aspectos del método descrito anteriormente se ilustran por medio de los ejemplos en las figuras 3 y 4. La figura 3 muestra las secuencias de nucleótidos de copias metiladas y no metiladas de un fragmento del gen de vimentina humano (VIM), antes (SEQ ID NO:1 y 2) y después de un tratamiento con bisulfito (SEQ ID NO:3 y 4). La figura 4 muestra las secuencias de nucleótidos de un ejemplo de cebador directo, un ejemplo de cebador inverso y un ejemplo de oligonucleótido flap, alineadas con los fragmentos mostrados en la figura 3.

La cantidad de producto en la muestra puede normalizarse con relación a la cantidad de un ácido nucleico control presente en la muestra, con lo que se determina una cantidad relativa de las copias metiladas del locus genómico en la muestra. En algunas realizaciones, el ácido nucleico control puede ser un locus diferente del locus genómico y, en ciertos casos, puede detectarse empleando un ensayo de flap que emplee un oligonucleótido invasivo que contiene un nucleótido 3' terminal que aparea su base con un resto A o T en el mismo sitio de metilación, proporcionando con ello la detección de la presencia de copias no metiladas del locus genómico. El control puede medirse en paralelo con la medición del producto en la misma mezcla de reacción o en una mezcla de reacción diferente. Si el control se mide en la misma mezcla de reacción, el ensayo de flap puede incluir otros reactivos, en particular un segundo oligonucleótido invasivo, una segunda sonda de flap que contiene un segundo flap y un segundo módulo FRET que produce una señal que es distinguible del módulo FRET empleado para detectar el producto. En realizaciones concretas, la mezcla de reacción puede contener además reactivos de PCR y reactivos de flap para amplificar y determinar el estado de metilación de otro locus genómico que se sabe que está metilado en algunas muestras.

En ciertos casos, puede detectarse una fluorescencia que indica la cantidad de flap escindido por medio de un fluorómetro automático diseñado para realizar una PCR a tiempo real, que tiene las siguientes características: una fuente de luz para excitar el fluoróforo del módulo FRET, un sistema para calentar y enfriar las mezclas de reacción y un fluorómetro para medir la fluorescencia del módulo FRET. Esta combinación de características permite la medición a tiempo real del flap escindido, permitiendo con ello cuantificar la cantidad de ácido nucleico diana en la muestra. Los fluorómetros automáticos para realizar reacciones de PCR a tiempo real son conocidos en la técnica y pueden adaptarse para su uso en este ensayo específico, por ejemplo, el ICYCLER™ de Bio-Rad Laboratories (Hercules, Calif.), el Mx3000P™, el MX3005P™ y el MX4000™ de Stratagene (La Jolla, Calif.), el ABI PRISM™ 7300, 7500, 7700, y 7900 Taq Man (Applied Biosystems, Foster City, Calif.), el SMARTCYCLER™, ROTORGENE 2000™ (Corbett Research, Sydney, Australia) y el sistema GENE XPERT™ (Cepheid, Sunnyvale, Calif.) y el LIGHTCYCLER™ (Roche Diagnostics Corp., Indianapolis, Ind.). La velocidad de pendiente entre las diferentes temperaturas de reacción no es crítica y, en ciertas realizaciones, pueden emplearse las velocidades de pendiente por defecto que están preajustadas en los termocicladores.

En ciertos casos, el método puede implicar también representar gráficamente la cantidad de escisión que se produce en varios ciclos, proporcionando con ello un cálculo a tiempo real de la abundancia del ácido nucleico diana. El cálculo puede realizarse determinando el ciclo umbral (es decir, el ciclo en el que esta fluorescencia aumenta por encima de un umbral predeterminado; el valor "Ct" o el valor "Cp"). Este cálculo puede compararse con un control (dicho control puede ensayarse en la misma mezcla de reacción que el locus genómico de interés) para proporcionar un cálculo normalizado. El termociclador también puede contener una aplicación de software para determinar el ciclo umbral para cada una de las muestras. Un ejemplo de método para determinar el ciclo umbral se indica, por ejemplo, en Luu-The *et al.* (Biotechniques, 2005, 38:287-293).

En la presente también se describe un dispositivo para realizar el análisis de muestras. En ciertas realizaciones, el dispositivo comprende: a) un termociclador programado para realizar el método descrito anteriormente, y b) un recipiente que comprende la mezcla de reacción descrita anteriormente.

#### Utilidad

El método descrito puede utilizarse en una diversidad de aplicaciones, y estas aplicaciones en general incluyen aplicaciones de análisis de muestras en las que se detecta la presencia de una secuencia metilada en una muestra dada.

En algunas realizaciones, puede obtenerse una muestra biológica de un paciente y la muestra puede analizarse empleando el método. En realizaciones concretas, el método puede emplearse para identificar y/o calcular la cantidad de copias metiladas de un locus genómico que están en la muestra biológica que contiene copias no metiladas de un locus genómico y copias metiladas del locus genómico. En este ejemplo, la muestra puede contener al menos 100 veces (por ejemplo, al menos 1.000 veces, al menos 5.000 veces, al menos 10.000 veces, al menos 50.000 veces o al menos 100.000 veces) más copias de tipo salvaje que copias mutantes del locus genómico.

En particular, los métodos descritos anteriormente pueden emplearse para diagnosticar, para predecir la respuesta a un tratamiento o para investigar un trastorno canceroso u otra enfermedad de mamífero que esté asociada con una metilación aberrante que incluye, pero no se limita a: a) trastornos de impronta, que incluyen el síndrome de Beckwith-Wiedemann (asociado con el locus BWS en 11p15.5), el síndrome de Prader-Willi (asociado con una región de impronta en 15p11-q13), el síndrome de Angelman (también asociado con una región de impronta en 15p11-q13), la osteodistrofia hereditaria de Albright (asociado con una impronta en GNAS), pseudohipoparatiroidismo de tipo 1a y 1b (asociado con la impronta en HYMAI, PLAG1 y ZAC-AS), diabetes mellitus neonatal transitoria y ciertos cánceres (asociados con el locus IGF2/H1, el gen CDKN1, el gen DIRAS3 y el gen MEST); b) enfermedades de inestabilidad repetida, que incluyen el síndrome del cromosoma X frágil (asociado con la metilación en FRAXA) y la distrofia muscular facioescapulohumeral (asociada con la metilación en el locus FSHD); c) enfermedades provocadas por un defecto en las vías de metilación, tales como el lupus eritematoso sistémico, la inmunodeficiencia (SLE, que es el resultado de una hipometilación global de las células T) y el síndrome de inestabilidad centromérica y anomalías faciales (ICF); y d) otras enfermedades, tales como alfa-talasemia/síndrome de retraso mental, asociado al cromosoma X (asociado con la metilación anómala de ATRX). Estas enfermedades

son analizadas en Robertson (DNA methylation and human disease, Nat. Reviews, 2005, 6:597-610). El método descrito anteriormente puede utilizarse, por ejemplo, para identificar una metilación aberrante en un niño nonato.

5 La hipermetilación de las islas de CpG en diversos loci está asociada con diversos cánceres. Aunque no se pretenda limitación alguna por la teoría, se cree que la metilación inactiva la expresión de genes, que incluyen genes supresores de tumores, genes relacionados con el ciclo celular, genes de reparación de apareamientos erróneos del ADN, receptores de hormonas y moléculas de adhesión de tejidos o de células. Por ejemplo, la deficiencia específica de tumor de la expresión de los genes de reparación del ADN MLH1 y MGMT y los supresores de tumores p16, CDKN2 y MTS1, se han correlacionado directamente con la hipermetilación. Se cree que un aumento en la metilación de las islas de CpG produce la inactivación de estos genes que provoca aumentos en los niveles de daños genéticos, predisponiendo a las células a una posterior inestabilidad genética que contribuye al avance del tumor.

10 La hipermetilación se ha asociado con varios cánceres, tal como se ilustra en la tabla 1 (adaptada de Das *et al.*, J. Clin. Oncol., 2004, 22:4632-4642). Así, el método puede emplearse como diagnóstico de estos cánceres.

Tabla 1

Gen metilado	Papel putativo en el desarrollo del tumor	Sitio del tumor
<i>APC</i>	Regulación perturbada de la proliferación celular, la migración celular, la adhesión celular, la reorganización del citoesqueleto y la estabilidad cromosómica	Mama, pulmón, esófago
<i>BRCA1</i>	Implicado en la reparación del ADN y la activación de la transcripción	Mama, ovario
<i>CDKN2A/p16</i>	Inhibidor de quinasa dependiente de ciclina	GIT, cabeza y cuello, NHL, pulmón
<i>DAPK1</i>	Enzima dependiente de calcio/calmodulina que fosforila restos serina/treonina en las proteínas; supresión de la apoptosis	Pulmón
<i>E-cadherina</i>	Aumenta la proliferación, la invasión y/o la metástasis	Mama, tiroides, gástrico
<i>ER</i>	Resistencia a hormonas	Mama, próstata
<i>GSTP1</i>	Pérdida de desintoxicación de los metabolitos activos de varios carcinógenos	Próstata, mama, renal
<i>hMLH1</i>	Reparación defectuosa de los apareamientos incorrectos del ADN y mutaciones génicas	Colon, gástrico, endometrio, ovario
<i>MGMT</i>	Gen relacionado con <i>p53</i> implicado en la reparación del ADN y la resistencia a fármacos	Pulmón, cerebro
<i>p15</i>	Entrada no restringida de células en la activación y la proliferación	Leucemia, linfoma, carcinoma de células escamosas, pulmón
<i>RASSF1A</i>	Pérdida del control regulador negativo de la proliferación celular por medio de la inhibición del avance de la fase G <sub>1</sub> /S	Pulmón, mama, ovario, riñón, nasofaringeo
<i>Rb</i>	Incapacidad para reprimir la transcripción de los genes celulares requeridos para la replicación del ADN y la división celular	Retinoblastoma, oligodendroglioma
<i>VHL</i>	Estabilidad del ARN alterada y degradación errónea de proteínas unidas al ARN	Cáncer de células renales

15 Abreviaturas: APC, poliposis adenomatosa familiar; BRCA1, cáncer de mama 1; CDKN2A/p16, quinasa dependiente de ciclina 2A; DAPK1, proteína quinasa asociada a muerte 1; ER, receptor de estrógeno; GSTP1, glutatión S-transferasa Pi 1; hMLH1, homólogo de Mut L 1; MGMT, O-6 metilguanina-ADN metiltransferasa; RASSF1A, miembro 1 de la familia del dominio de asociación de Ras; Rb, retinoblastoma; VHL, von Hippel-Lindau; GIT, tracto gastrointestinal; NHL, linfoma no hodgkiniano.

20 La hipermetilación de los siguientes genes también está asociada con el cáncer: PYCARD, CDH13, COX2, DAPK1,

ESR1, GATA4, SYK, MLH1, TP73, PRDM2, PGR, SFRP1, SOCS1, SOCS3, STK11, TMEFF2, THBS1, RASSF5, PRKCDP, MGMT, CDKN2A, SFRP1, TMEFF2, HS3ST2 (3OST2), RASSF1A, GATA4 y RARB.

En estas realizaciones, el método puede emplearse para detectar una metilación aberrante (por ejemplo, hipermetilación o hipometilación) en un gen, y esta metilación aberrante puede asociarse, por ejemplo, con cáncer de mama, melanoma, cáncer renal, cáncer endometrial, cáncer de ovario, cáncer pancreático, leucemia, cáncer colorrectal, cáncer de próstata, mesotelioma, glioma, meduloblastoma, policitemia, linfoma, sarcoma o mieloma múltiple, etc.

El uso de marcadores de la metilación del ADN para diagnosticar cánceres se ha analizado en una diversidad de publicaciones, tales como: Qureshi *et al.* (Int. J. Surg., 2010, Utility of DNA methylation markers for diagnosing cancer, 8:194-198), Muraki *et al.* (Oncol. Rep., 2009, Epigenetic DNA hypermethylation: clinical applications in endometrial cancer, 22:967-972), Balch *et al.* (Endocrinology, 2009, Minireview: epigenetic changes in ovarian cancer, 150:4003-4011), Pfeifer (Semin. Cancer Biol., 2009, DNA methylation patterns in lung carcinomas, 19:181-187), Szalmás *et al.* (Semin. Cancer Biol., 2009, Epigenetic alterations in cervical carcinogenesis, 19:144-152), Hoque (Expert Rev. Mol. Diagn., 2009, DNA methylation changes in prostate cancer: current developments and future clinical implementation, 9:243-257), y Campan *et al.* (Curr. Top. Microbiol. Immunol., 2006, DNA methylation profiles of female steroid hormone-driven human malignancies, 310:141-178).

En una realización, el método puede emplearse para detectar la metilación en ADN fecal, proporcionando con ello un diagnóstico para el cáncer colorrectal. En estas realizaciones, el método puede emplearse para investigar la metilación de BMP3, EYA2, ALX4, o vimentina, por ejemplo. Estos genes y su metilación se describen, por ejemplo, en Chen *et al.* (J. Natl. Cancer. Inst., 2005, Detection in fecal DNA of colon cancer-specific methylation of the nonexpressed vimentin gene, 97:1124-1132), Zou *et al.* (Cancer Epidemiol. Biomarkers Prev., 2007, Highly methylated genes in colorectal), y Li (Nat. Biotechnol., 2009, Sensitive digital quantification of DNA methylation in clinical samples, 27:858-863).

El presente método puede emplearse para diagnosticar pacientes con cáncer o con un trastorno precanceroso (por ejemplo, adenoma, etc.), solo o en combinación con otras técnicas clínicas (por ejemplo, un examen físico, tal como una colonoscopia) o técnicas moleculares (por ejemplo, análisis inmunohistoquímico). Por ejemplo, los resultados obtenidos del presente ensayo pueden combinarse con otra información, por ejemplo, información acerca del estado de metilación de otros loci, información acerca de las mutaciones en otros loci, información acerca de redistribuciones o sustituciones en el mismo locus o en un locus diferente, información citogenética, información acerca de redistribuciones, información de la expresión génica o información acerca de la longitud de los telómeros, para proporcionar un diagnóstico global del cáncer u otras enfermedades.

En una realización, una muestra puede recogerse de un paciente en una primera localización, por ejemplo, en un entorno clínico, tal como en un hospital o en la consulta de un médico, y la muestra puede enviarse a una segunda localización, por ejemplo, un laboratorio, en donde se procesa y se realiza el método anteriormente descrito para generar un informe. Un "informe", tal como se describe en la presente, es un documento electrónico o tangible que incluye elementos de informe que proporcionan resultados de ensayo que pueden incluir un valor Ct, o un valor Cp o similares, que indican la presencia de copias mutantes del locus genómico en la muestra. Tras haber sido generado, el informe puede enviarse a otra localización (que puede ser la misma localización que la primera localización), en donde puede ser interpretado por un profesional sanitario (por ejemplo, un médico clínico, un técnico de laboratorio o un médico, tal como un oncólogo, un cirujano, un patólogo) como parte de un diagnóstico clínico.

#### Kits

También se describen kits para practicar el método, tal como se describió anteriormente. Los componentes del kit pueden presentarse en recipientes distintos, o múltiples componentes pueden presentarse en un único recipiente. Los componentes del kit pueden incluir: a) un primer cebador y un segundo cebador, en el que el primer cebador se corresponde con una secuencia metilada en el locus genómico y opcionalmente contiene un nucleótido 3' terminal que aparea su base con una citosina metilada o su complemento en la secuencia metilada; y b) reactivos del ensayo de flap que comprenden una flap endonucleasa, un módulo FRET y, si el primer cebador no contiene un nucleótido 3' terminal que aparea su base con una citosina metilada en la secuencia metilada, un oligonucleótido invasivo que contiene un nucleótido 3' terminal que aparea su base con una resto G o C que se corresponde con un sitio de metilación en el locus genómico. Los detalles de estos reactivos se describieron anteriormente. El kit puede contener además un agente que modifica la citosina no metilada para producir uracilo. El kit comprende además reactivos de PCR y de flap para la amplificación y la detección de un ácido nucleico control.

Además de los componentes mencionados anteriormente, el kit puede incluir además instrucciones para emplear los componentes del kit para llevar a cabo los presentes métodos. Las instrucciones para llevar a cabo los presentes métodos en general están registradas en un medio de registro adecuado. Por ejemplo, las instrucciones pueden estar impresas sobre un sustrato, tal como papel o plástico, etc. Así, las instrucciones pueden estar presentes en los kits como un inserto en el envase, en la etiqueta del recipiente del kit o sus componentes (es decir, asociadas con el envase o subenvases), etc. En otras realizaciones, las instrucciones están presentes como un archivo de datos de almacenamiento electrónico presente en un medio de almacenamiento de lectura por ordenador adecuado, por

ejemplo, CD-ROM, disquete, etc. En otras realizaciones, las instrucciones reales no están presentes en el kit, pero se proporcionan medios para obtener las instrucciones de una fuente remota, por ejemplo, a través de internet. Un ejemplo de esta realización es un kit que incluye una dirección web en la que las instrucciones pueden visualizarse y/o de la cual pueden descargarse las instrucciones. Al igual que con las instrucciones, estos medios para obtener las instrucciones están registrados sobre un sustrato adecuado. Además de las instrucciones, los kits también pueden incluir una o más muestras control, por ejemplo, analitos de control positivo o negativo para su uso en el ensayo del kit.

Aunque la invención se ha descrito con bastante detalle como ilustración y ejemplo para aclarar su comprensión, será evidente para los expertos en la técnica a la luz de las indicaciones de esta invención que en ella pueden realizarse ciertos cambios y modificaciones sin apartarse del alcance de las reivindicaciones adjuntas.

#### **Ejemplo 1: Detección de secuencias C6ORF150 metiladas en presencia de C6ORF150 no metilada**

El ensayo se diseñó para detectar y cuantificar las secuencias de CpG metiladas en presencia de secuencias no metiladas. Para simular el ADN genómico metilado y no metilado, se prepararon plásmidos y se clonaron para que se correspondiesen con la secuencia que surge después de una conversión mediante reacción con bisulfito de C no metilada a U, que se comporta como si fuera T en el proceso de PCR, tal como se ejemplifica para la secuencia de vimentina en la figura 3. Para cada ejemplo, la versión metilada de la secuencia emplea un plásmido con el motivo CG intacto, y el plásmido representativo no metilado lo sustituye por un motivo TG.

En este ejemplo, se diseñaron dos CG sobre cada cebador y no se encontraban en los extremos 3' de los cebadores. Después el ensayo se empleó para detectar copias metiladas sembradas en copias no metiladas a 4 niveles diferentes, que incluyen  $10^4$  copias metiladas en  $10^5$  copias no metiladas (1:10),  $10^3$  copias metiladas en  $10^5$  copias no metiladas (1:100),  $10^2$  copias metiladas en  $10^5$  copias no metiladas (1:1000), y 10 copias metiladas en  $10^5$  copias no metiladas (1:10000).

La secuencia diana del plásmido que representa la secuencia metilada es la siguiente, y cada base C se corresponde con una metil-C para un ADN genómico análogo:

ATGGAATGTTAGGGGCGTTTCGATGGATTTTATCGAGTTTTCGGTTGT  
 TTTCGAGGTCGTTTTGTTTAAGGCCGGGAAAGTTCGGTTTCGTTAGGAAGTCG  
 GGATTTTCGGTAGAAAAAGAGCGTTTCGGATATTTAGGAGAGGTCGTTTCGTT  
 CGCGTAATTGGGGTTCGCGTTAAAAAGGTTTTTTAGCGCGTTTAGGATACGT  
 AGTC (SEQ ID NO:1)

El ensayo emplea un cebador directo 5'-GGGATTTTCGGTAGAAAAAGAGCGT-3' (SEQ ID NO:2), un cebador inverso 5'-ACCTTTTAAACGCGAACCCCA-3' (SEQ ID NO:3), un oligonucleótido invasivo, que no es el cebador directo de PCR 5'-TCGGATTTAGGAGAGGTg-3' (SEQ ID NO:4), y una sonda de flap 5'-GACGCGGAGCGTTTCGTTTCGCG-3'/3C6/ (SEQ ID NO:5) en la que el área que se corresponde con las bases metiladas se muestra subrayada y el extremo 3' está bloqueado con un grupo hexandiol para inhibir la extensión del cebador. Las primeras nuevas bases de la sonda de flap son la región escindida por la flap endonucleasa y que después se une al módulo FRET. Nótese que la base del extremo 3' de la sonda invasiva, mostrada como g minúscula, está diseñada para que no se aparee con la diana para disuadir la extensión del cebador por la Taq polimerasa. Los cebadores, los oligos invasivos y las sondas de flap fueron suministrados como artículos no catalogados por Integrated DNA Technologies (IDT, Coralville, Iowa).

Las regiones de unión para los cebadores y la sonda invasiva se muestran subrayados en la secuencia diana, y la región de unión a la diana de la sonda de flap se muestra en cursiva:

ATGGAATGTTAGGGGCGTTTCGATGGATTTTATCGAGTTTTCGGTTGT  
 TTTCGAGGTCGTTTTGTTTAAGGCCGGGAAAGTTCGGTTTCGTTAGGAAGTCG  
GGATTTTCGGTAGAAAAAGAGCGTTTCGGATATTTAGGAGAGGT*CGTTTCGTT*  
CGCGTAATTGGGGTTCGCGTTAAAAAGGTTTTTTAGCGCGTTTAGGATACGT  
 AGTC (SEQ ID NO:1).

El módulo FRET empleado fue 5'-FAM/TCT/extintor/AGCCGGTTTTCCGGCTGAGACTCCGCGTCCGT-3'/3C6 (SEQ ID NO:6), en la que FAM es fluoresceína, el extintor es Eclipse® Dark Quencher, y el extremo 3' está bloqueado con

un grupo hexandiol para inhibir la extensión del cebador. El módulo FRET fue suministrado por Hologic (Madison, Wisconsin).

5 Las condiciones de ciclado fueron de 95 °C durante 3 min; 50 ciclos a 95 °C durante 20 sg, 50 °C durante 1 min, y 70 °C durante 30 sg, con un mantenimiento final a 40 °C. La adquisición de la señal fluorescente se realizó en el momento de 50 °C en el ciclo. Las reacciones de PCR se realizaron en placas LightCycler® 480 Multiwell 96 Plates (Roche, Indianapolis) en MOPS 10 mM, pH 7,5, con MgCl<sub>2</sub> 7,5 mM, y dNTP 250 μM (Promega, Madison, Wisconsin). La Taq polimerasa fue la enzima iTaq (BioRad, Hercules, California) y la enzima de escisión fue Cleavase 2.0 (Hologic, Madison, Wisconsin). La concentración del cebador directo fue de 500 nM, la concentración del cebador inverso fue de 500 nM, la sonda de flap se encontraba a 500 nM, la sonda de oligo invasivo se encontraba a 70 nM, y el módulo FRET se empleó a una concentración final de 200 nM. Todas las amplificaciones y las detecciones se realizaron en el termociclador óptico LightCycler 480 (Roche, Indianapolis, Indiana).

Los datos que muestran las curvas de amplificación cinéticas y el punto de cruce, Cp, de las diferentes proporciones de mutantes a tipo salvaje en las muestras de amplificación se indican en la figura 5. En estos ensayos, el Cp se calcula como el punto en que la fluorescencia aumenta hasta 18% de la fluorescencia máxima.

15 El diseño de los cebadores, la sonda invasiva y la sonda de flap empleados en este ejemplo no pudo detectar 10<sup>2</sup> copias metiladas en 10<sup>5</sup> copias no metiladas (1:1000; figura 5). Las reacciones para detectar 10<sup>3</sup> copias metiladas en 10<sup>5</sup> copias no metiladas (1:100) y 10<sup>4</sup> copias metiladas en 10<sup>5</sup> copias no metiladas (1:10) también fueron suprimidas por las cantidades excesivas de copias del gen no metiladas (figura 5).

#### **Ejemplo 2: Detección de secuencias ZNF804B metiladas en presencia de ZNF804B no metilada**

20 El ensayo se diseñó para detectar y cuantificar las secuencias de CpG metiladas de ZNF804B en presencia de secuencias ZNF804B no metiladas. Para simular el ADN genómico metilado y no metilado, se prepararon plásmidos y se clonaron para que se correspondiesen con la secuencia que surge después de una conversión mediante reacción con bisulfito de C no metilada a U, que se comporta como si fuera T en el proceso de PCR, tal como se ejemplifica para la secuencia de vimentina en la figura 3. Para cada ejemplo, la versión metilada de la secuencia emplea un plásmido con el motivo CG intacto, y el plásmido representativo no metilado lo sustituye por un motivo TG.

30 En este ejemplo, se diseñó un CG sobre cada cebador y no se encontraba en el extremo 3' de los cebadores. Después el ensayo se empleó para detectar copias metiladas sembradas en copias no metiladas a 4 niveles diferentes, como en el ejemplo 1, que incluyen 10<sup>4</sup> copias metiladas en 10<sup>5</sup> copias no metiladas (1:10), 10<sup>3</sup> copias metiladas en 10<sup>5</sup> copias no metiladas (1:100), 10<sup>2</sup> copias metiladas en 10<sup>5</sup> copias no metiladas (1:1000), y 10 copias metiladas en 10<sup>5</sup> copias no metiladas (1:10000).

La secuencia diana del plásmido que representa la secuencia metilada es la siguiente, y cada base C se corresponde con una metil-C para un ADN genómico análogo:

TTAATTTGTTTGTTTTATTTGTGGTTGTATAGTTTATTTTGTAAATCGG  
 TTGGGGAGTTGTTGTTTTTGTAAACGTCGTCGTTAGTTAGAGCGTTGAAGAA  
 AAGTTGAAGGTTAGTAGGTAACGAAAGAGTAAAGA (SEQ ID NO:7)

35 El ensayo emplea un cebador directo 5'-GTGGTTGTATAGTTTATTTTGTAAATCGGT-3' (SEQ ID NO:8), un cebador inverso 5'-ACCTTCAACTTTTCTTCAACGCTC-3' (SEQ ID NO:9), un oligonucleótido invasivo, que no es el cebador directo de PCR 5'-GGGAGTTGTTGTTTTGTAAg-3' (SEQ ID NO:10), y una sonda de flap 5'-GACGCGGAGCGTCGCTTAG -3'/3C6/ (SEQ ID NO:11) en la que el área que se corresponde con las bases metiladas se muestra subrayada y el extremo 3' está bloqueado con un grupo hexandiol para inhibir la extensión del cebador. Las primeras nuevas bases de la sonda de flap son la región escindida por la flap endonucleasa y que después se une al módulo FRET. Nótese que la base del extremo 3' de la sonda invasiva, mostrada como g minúscula, está diseñada para que no se aparee con la diana para disuadir la extensión del cebador por la Taq polimerasa. Los cebadores, los oligos invasivos y las sondas de flap fueron suministrados como artículos no catalogados por Integrated DNA Technologies (IDT, Coralville, Iowa).



Las regiones de unión para los cebadores y la sonda invasiva se muestran subrayados en la secuencia diana, y la región de unión a la diana de la sonda de flap se muestra en cursiva:

TTAATTTGTTTGTTTTTATTTGTGGTTGTATAGTTTATTTTTGTAATCGG  
TTGGGGAGTTGTTGTTTTGTTAACGTCGTCGTTAGTTAGAGCGTTGAAGAA  
AAGTTGAAGGTTAGTAGGTAACGAAAGAGTAAAGA (SEQ ID NO:7).

5 El módulo FRET empleado fue 5'-FAM/TCT/extintor/AGCCGGTTTTCCGGCTGAGACTCCGCGTCCGT-3'/3C6 (SEQ ID NO:6), en la que FAM es fluoresceína, el extintor es Eclipse® Dark Quencher, y el extremo 3' está bloqueado con un grupo hexandiol para inhibir la extensión del cebador. El módulo FRET fue suministrado por Hologic (Madison, Wisconsin).

10 Las condiciones de ciclado fueron de 95 °C durante 3 min; 50 ciclos a 95 °C durante 20 sg, 50 °C durante 1 min, y 70 °C durante 30 sg, con un mantenimiento final a 40 °C. La adquisición de la señal fluorescente se realizó en el momento de 50 °C en el ciclo. Las reacciones de PCR se realizaron en placas LightCycler® 480 Multiwell 96 Plates (Roche, Indianapolis) en MOPS 10 mM, pH 7,5, con MgCl<sub>2</sub> 7,5 mM, y dNTP 250 μM (Promega, Madison, Wisconsin). La Taq polimerasa fue la enzima iTaq (BioRad, Hercules, California) y la enzima de escisión fue Cleavase 2.0 (Hologic, Madison, Wisconsin). La concentración del cebador directo fue de 500 nM, la concentración del cebador inverso fue de 500 nM, la sonda de flap se encontraba a 500 nM, la sonda de oligo invasivo se encontraba a 70 nM, y el módulo FRET se empleó a una concentración final de 200 nM. Todas las amplificaciones y las detecciones se  
 15 realizaron en el termociclador óptico LightCycler 480 (Roche, Indianapolis, Indiana).

Los datos que muestran las curvas de amplificación cinéticas y el punto de cruce, Cp, de las diferentes proporciones de mutantes a tipo salvaje en las muestras de amplificación se indican en la figura 6. En estos ensayos, el Cp se calcula como el punto en que la fluorescencia aumenta hasta 18% de la fluorescencia máxima.

20 El diseño de los cebadores, la sonda invasiva y la sonda de flap empleados en este ejemplo no pudo detectar 10 copias metiladas en 10<sup>5</sup> copias no metiladas (1:10000; figura 6). Las reacciones para detectar 10<sup>2</sup> copias metiladas en 10<sup>5</sup> copias no metiladas (1:1000), 10<sup>3</sup> copias metiladas en 10<sup>5</sup> copias no metiladas (1:100), y 10<sup>4</sup> copias metiladas en 10<sup>5</sup> copias no metiladas (1:10) también fueron suprimidas por las cantidades excesivas de copias del gen no metiladas (figura 6).

**Ejemplo 3: Detección de secuencias de vimentina metiladas en presencia de vimentina no metilada**

25 El ensayo se diseñó para detectar y cuantificar las secuencias de CpG metiladas de vimentina (VIM) en presencia de secuencias VIM no metiladas. Para simular el ADN genómico metilado y no metilado, se prepararon plásmidos y se clonaron para que se correspondiesen con la secuencia que surge después de una conversión mediante reacción con bisulfito de C no metilada a U, que se comporta como si fuera T en el proceso de PCR, tal como se muestra para la secuencia de vimentina en la figura 3. La versión metilada de la secuencia emplea un plásmido con el motivo  
 30 CG intacto, y el plásmido representativo no metilado lo sustituye por un motivo TG.

35 En este ejemplo, se diseñaron tres CG sobre cada cebador del ensayo de detección de metilación de vimentina, estando uno en el extremo 3' del cebador directo. En este ensayo, el cebador directo también es el oligonucleótido invasivo. También existen motivos CG localizados en el punto de escisión de la sonda de flap, en ambos sentidos. Después el ensayo se empleó para detectar copias metiladas sembradas en copias no metiladas a 4 niveles diferentes, como en el ejemplo 1 y 2, que incluyen 10<sup>4</sup> copias metiladas en 10<sup>5</sup> copias no metiladas (1:10), 10<sup>3</sup> copias metiladas en 10<sup>5</sup> copias no metiladas (1:100), 10<sup>2</sup> copias metiladas en 10<sup>5</sup> copias no metiladas (1:1000), y 10 copias metiladas en 10<sup>5</sup> copias no metiladas (1:10000).

La secuencia diana del plásmido que representa la secuencia metilada es la siguiente, y cada base C se

TCGTGTTTTCGTTTTTTATCGTAGGATGTTTCGGCGGTTTCGGGTATCG  
 CGAGTCGGTCGAGTTTTAGTCGGAGTTACGTGATTACGTTTATTCGTATTTA  
 TAGTTTGGGCGACG (SEQ ID NO:12)

corresponde con una metil-C para un ADN genómico análogo:

40 El ensayo emplea un cebador directo 5'-GGCGGTTTCGGGTATCG-3' (SEQ ID NO:13), un cebador inverso 5'-CGTAATCACGTAACCTCCGACT-3' (SEQ ID NO:14) y una sonda de flap 5'-GACGCGGAGGCGAGTCGGTTCG - 3'/3C6/ (SEQ ID NO:15) en la que el área que se corresponde con las bases metiladas se muestra subrayada y el extremo 3' está bloqueado con un grupo hexandiol para inhibir la extensión del cebador. Las primeras nuevas bases

de la sonda de flap son la región escindida por la flap endonucleasa y que después se une al módulo FRET. Los cebadores y las sondas de flap fueron suministrados como artículos no catalogados por Integrated DNA Technologies (IDT, Coralville, Iowa).

5 Las regiones de unión para los cebadores y la sonda invasiva se muestran subrayados en la secuencia diana, y la región de unión a la diana de la sonda de flap se muestra en cursiva:

TCGTGTTTTCGTTTTTTTATCGTAGGATGTTCGGCCGGTTCGGGTATCG  
CGAGTCGGTCGAGTTTTAGTCGGAGTTACGTGATTACGTTTATTCGTATTTAT  
 AGTTTGGGCGACG (SEQ ID NO:12).

El módulo FRET empleado fue 5'-FAM/TCT/extintor/AGCCGGTTTTCCGGCTGAGACTCCGCGTCCGT-3'/3C6 (SEQ ID NO:6), en la que FAM es fluoresceína, el extintor es Eclipse® Dark Quencher, y el extremo 3' está bloqueado con un grupo hexandiol para inhibir la extensión del cebador. El módulo FRET fue suministrado por Hologic (Madison, Wisconsin).

10 Las condiciones de ciclado fueron de 95 °C durante 2 min; 45 ciclos a 95 °C durante 20 sg, 53 °C durante 1 min; y un mantenimiento a 40 °C. La adquisición de la señal fluorescente se realizó en el momento de 53 °C en el ciclo. Las reacciones de PCR se realizaron en placas LightCycler® 480 Multiwell 96 Plates (Roche, Indianapolis) en MOPS 10 mM, pH 7,5, con MgCl<sub>2</sub> 7,5 mM, y dNTP 250 µM (Promega, Madison, Wisconsin). La Taq polimerasa fue la enzima HotStart GoTaq (Promega, Madison, Wisconsin) y la enzima de escisión fue Cleavase 2.0 (Hologic, Madison, Wisconsin). La concentración del cebador directo fue de 500 nM, la concentración del cebador inverso fue de 500 nM, la sonda de flap se encontraba a 500 nM, y el módulo FRET se empleó a una concentración final de 200 nM. Todas las amplificaciones y las detecciones se realizaron en el termociclador óptico LightCycler 480 (Roche, Indianapolis, Indiana).

20 Los datos que muestran las curvas de amplificación cinéticas y el punto de cruce, Cp, de las diferentes proporciones de mutantes a tipo salvaje en las muestras de amplificación se indican en la figura 7. En estos ensayos, el Cp se calcula como el punto en que la fluorescencia aumenta hasta 18% de la fluorescencia máxima.

El diseño de los cebadores, la sonda invasiva y la sonda de flap empleados en este ejemplo pudo detectar linealmente hasta 10 copias metiladas en 10<sup>5</sup> copias no metiladas (1:10000) y es claramente superior (figura 7) a la actuación de los ejemplos 1 y 2 (figuras 5 y 6).

25 **Listado de secuencias**

<110> Exact Sciences Corporation Zou, Hongzhi Lidgard, Graham P. Domanico, Michael J. Allawi, Hatim

<120> Ensayo de Metilación

30 <130> EXAS-002WO

<140> US 12/946,745

<141> 15-11-2010

35 <160> 19

<170> FastSEQ for Windows Version 4.0

<210> 1

40 <211> 207

<212> ADN

<213> Secuencia Artificial

<220>

45 <223> C6ORF150 metilado diana

<220>

<221> diferencia\_misc

<222> 16, 21, 34, 42, 52, 58, 72, 82, 88, 99, 107, 121, 126, 144, 148, 152, 154, 167, 169, 188, 190, 201, 207

50 <223> restos de citosina metilada

<400> 1

ES 2 640 221 T3

atggaatggt aggggcggtt cgatggattt tatcgagttt tcggttggtt tcgaggtcgt 60  
 ttgtttaag gcgggaaagt tcggttctgt taggaagtcg ggatttcggt agaaaaagag 120  
 cgtttcggat atttaggaga ggtcgttcgt tcgcgtaatt ggggttcgcg ttaaaaaggt 180  
 ttttagcgc gtttaggata cgtagtc 207

- <210> 2
- <211> 24
- 5 <212> DNA
- <213> Secuencia Artificial
  
- <220>
- <223> Cebador sintético
- 10 <400> 2
  
- gggatttcg tagaaaaaga gcgt 24
- 15 <210> 3
- <211> 21
- <212> DNA
- <213> Secuencia Artificial
- 20 <220>
- <223> Cebador sintético
- <400> 3
- 25 accttttaa cggaacccc a 21
- <210> 4
- <211> 20
- <212> DNA
- 30 <213> Secuencia Artificial
- <220>
- <223> Oligonucleótido invasivo sintético
- 35 <400> 4
  
- tcggatattt aggagagtg 20
- 40 <210> 5
- <211> 21
- <212> ADN
- <213> Secuencia Artificial
- <220>
- 45 <223> Sonda de flap sintética
- <220>
- <221> diferencia\_misc
- <222> 10, 14, 18, 20
- 50 <223> Citosina metilada
- <220>
- <221> diferencia\_misc
- <222> 21
- 55 <223> hexanodiol 3'-C6 modificado
- <400> 5
  
- gacgcggagc gttcgttcgc g 21
- 60 <210> 6
- <211> 35
- <212> ADN

<213> Secuencia Artificial  
 <220>  
 <223> Cassette FRET sintético  
 5  
 <220>  
 <221> diferencia\_misc  
 <222> 1  
 <223> 5'-FAM modificado  
 10  
 <220>  
 <221> diferencia\_misc  
 <222> 3  
 <223> Nucleótico modificado con extintor  
 15  
 <220>  
 <221> diferencia\_misc  
 <222> 35  
 <223> hexanodiol 3'-C6 modificado  
 20  
 <400> 6  
 tctagccggt ttccggctg agactccgcg tccgt 35  
 25  
 <210> 7  
 <211> 136  
 <212> ADN  
 <213> Secuencia Artificial  
 30  
 <220>  
 <223> Secuencia ZNF804B diana  
 <220>  
 <221> diferencia\_misc  
 35  
 <222> 47, 74, 77, 80, 92, 123  
 <223> Citosina metilada  
 <400> 7  
 ttaatttggt tgttttattt gtggttgat agtttatttt tgtaatcggg tggggagttg 60  
 ttgtttttgt taacgtcgtc gttagttaga gcggtgaaga aaagttgaag gttagtaggt 120  
 40  
 aacgaaagag taaaga 136  
 <210> 8  
 <211> 30  
 <212> ADN  
 45  
 <213> Secuencia Artificial  
 <220>  
 <223> Cebador sintético  
 50  
 <400> 8  
 gtggttgat agtttatttt tgtaatcggg 30  
 <210> 9  
 55  
 <211> 24  
 <212> ADN  
 <213> Secuencia Artificial  
 <220>  
 60  
 <223> Cebador sintético  
 <400> 9  
 acctcaact ttcttcaac gctc 24

<210> 10  
 <211> 22  
 <212> ADN  
 5 <213> Secuencia Artificial  
  
 <220>  
 <223> Oligonucleótido sintético invasivo  
  
 10 <400> 10  
  
 gggagtgtt gttttgtta ag 22  
  
 <210> 11  
 <211> 21  
 <212> ADN  
 <213> Secuencia Artificial  
  
 <220>  
 20 <223> Sonda de flap sintética  
  
 <220>  
 <221> diferencia\_misc  
 <222> 21  
 25 <223> hexanodiol 3'-C6 modificado  
  
 <220>  
 <221> diferencia\_misc  
 <222> 10, 13, 16  
 30 <223> Citosina metilada  
  
 <400> 11  
  
 gacgcggagc gtcgtcgta g 21  
 35  
 <210> 12  
 <211> 114  
 <212> ADN  
 <213> Secuencia Artificial  
 40  
 <220>  
 <223> Secuencia de vimentina diana  
  
 <220>  
 <221> diferencia\_misc  
 <222> 2, 10, 21, 32, 35, 40, 47, 49, 54, 58, 69, 77, 85, 93, 110, 113  
 <223> Citosina metilada  
  
 <400> 12  
 50  
 tcgtgttttc gtttttttat cgtaggatgt tcggcggttc gggtatcgcg agtcggtcga 60  
 gtttttagtcg gagttacgtg attacgttta ttcgtattta tagtttgggc gacg 114  
  
 <210> 13  
 <211> 16  
 <212> ADN  
 <213> Secuencia Artificial  
  
 <220>  
 <223> Cebador sintético  
 60  
 <400> 13  
  
 ggcggttcg gtatcg 16  
  
 <210> 14  
 65

ES 2 640 221 T3

<211> 21  
 <212> ADN  
 <213> Secuencia Artificial

5 <220>  
 <223> Cebador sintético

<400> 14

10 cgtaatcacg taactccgac t 21

<210> 15  
 <211> 21  
 <212> ADN  
 <213> Secuencia Artificial

15 <220>  
 <223> Sonda de flap sintética

20 <220>  
 <221> diferencia\_misc  
 <222> 11, 16, 20  
 <223> Citosina metilada

25 <220>  
 <221> diferencia\_misc  
 <222> 21  
 <223> Hexanodiol 3'-C6 modificado

30 <400> 15

gacgcggagg cgagtcggtc g 21

<210> 16  
 <211> 100  
 <212> ADN  
 <213> Secuencia Artificial

35 <220>  
 <223> fragmento de vimentina sin metilar

<400> 16

ccgtgtcctc gtcctcctac cgcaggatgt tcggcggccc gggcaccgcg agccggccga 60  
 gctccagccg gagctacgtg actacgtcca cccgcaccta 100

45 <210> 17  
 <211> 100  
 <212> ADN  
 <213> Secuencia Artificial

50 <220>  
 <223> Fragmento de vimentina metilada

<220>  
 <221> diferencia\_misc  
 <222> 2, 10, 21, 32, 35, 40, 47, 49, 54, 58, 69, 77, 85, 93  
 <223> Citosina metilada

<400> 17

60 ccgtgtcctc gtcctcctac cgcaggatgt tcggcggccc gggcaccgcg agccggccga 60  
 gctccagccg gagctacgtg actacgtcca cccgcaccta 100

<210> 18  
 <211> 100

ES 2 640 221 T3

<212> ADN  
<213> Secuencia Artificial

<220>  
5 <223> Fragmento de vimentina sin metilar después de reacción de bisulfito

<400> 18

10 uugtgtuutu gtuutuutau uguaggatgt tuggugguuu ggguaugug aguugguuga 60  
gutuuaguug gagutaugt autaugtuua uuuguauuta 100

<210> 19  
<211> 100  
<212> ADN  
<213> Secuencia Artificial

15 <220>  
<223> Fragmento de vimentina sin metilar después de reacción de bisulfito

20 <220>  
<221> diferencia\_misc  
<222> 2, 10, 21, 32, 35, 40, 47, 49, 54, 58, 69, 77, 85, 93  
<223> Citosina metilada

25 <400> 19  
ucgtgtuutc gtuutuutau cguaggatgt tcggcggguuc ggguaucgug agucggucga 60  
gutuuagucg gagutacgtg autacgtuua uucguauuta 100

**REIVINDICACIONES**

- 1.- Un método para detectar un locus genómico metilado, que comprende:
- a) tratar una muestra de ácido nucleico que contiene copias no metiladas y metiladas de un locus genómico con un agente que modifica la citosina no metilada para producir uracilo para obtener un ácido nucleico tratado;
- 5 b) amplificar un producto a partir de dicho ácido nucleico tratado empleando un primer cebador y un segundo cebador, en el que dicho primer cebador contiene un nucleótido G o C 3' terminal que se corresponde con una citosina metilada en dicho locus genómico y que se hibrida con una secuencia metilada en dicho locus, y en el que dicha amplificación preferentemente amplifica dichas copias metiladas de dicho locus genómico para producir una muestra amplificada; y
- 10 c) detectar la presencia de las copias metiladas amplificadas de dicho locus genómico en dicha muestra amplificada utilizando un ensayo de flap que emplea: i. el primer cebador, y ii. un oligonucleótido flap que comprende un nucleótido G o C en una posición que se corresponde con dicha citosina metilada en dicho locus genómico.
- 2.- Un método según la reivindicación 1, en el que dichos primer y segundo cebadores se unen ambos a sitios que contienen metilcitosinas en dicho locus genómico.
- 15 3.- Un método según la reivindicación 1 o 2, que comprende además normalizar la cantidad de dichas copias metiladas amplificadas de dicho locus genómico en dicha muestra amplificada con relación a la cantidad de un ácido nucleico control presente en dicha muestra de ácido nucleico, determinando con ello la cantidad de copias metiladas de dicho locus genómico en dicha muestra de ácido nucleico.
- 20 4.- Un método según la reivindicación 3, en el que dicho ácido nucleico control es un locus diferente de dicho locus genómico.
- 5.- Un método según la reivindicación 3 o 4, en el que dicho ácido nucleico control se detecta utilizando un ensayo de flap que emplea un oligonucleótido invasivo que contiene un nucleótido 3' terminal que aparea su base con un resto A o T en el sitio de dicha citosina metilada, detectando con ello la presencia de copias no metiladas de dicho locus genómico.
- 25 6.- Un método según la reivindicación 3, 4 o 5, en el que dicho ensayo de flap emplea un primer conjunto de reactivos del ensayo de flap que incluye un primer oligonucleótido invasivo, una primera sonda de flap que contiene un primer flap y un primer módulo FRET, y en el que dicho ácido nucleico control se detecta utilizando un segundo conjunto de reactivos del ensayo de flap que incluye un segundo oligonucleótido invasivo, una segunda sonda de flap que contiene un segundo flap y un segundo módulo FRET que produce una señal que es distinguible del primer
- 30 módulo FRET, en el que el primer y el segundo reactivo de flap están en la misma mezcla de reacción.
- 7.- Un método según cualquiera de las reivindicaciones anteriores, en el que la metilación de dicho locus está relacionada con el cáncer.
- 8- Un método según cualquiera de las reivindicaciones anteriores, en el que dicho locus es de BMP3, TFPI1, NDRG4, Septin 9, TFPI2, o vimentina.
- 35 9.- Un método según cualquiera de las reivindicaciones anteriores, en el que dicha muestra son heces obtenidas de un ser humano.
- 10.- Un método según cualquiera de las reivindicaciones anteriores, en el que dichas etapas de amplificación y de detección se realizan empleando una mezcla de reacción que contiene reactivos de PCR y reactivos de flap, y no se añaden otros reactivos a dicha mezcla de reacción entre dichas etapas de amplificación y de detección.
- 40 11.- Un método según cualquiera de las reivindicaciones anteriores, que comprende las siguientes condiciones de termociclado:
- una primera serie de 5 a 15 ciclos de:
- i) una primera temperatura de al menos 90 °C;
- ii) una segunda temperatura en el intervalo de 60 °C a 75 °C;
- 45 iii) una tercera temperatura en el intervalo de 65 °C a 75 °C;
- seguida de una segunda serie de 20 a 50 ciclos de:
- i) una cuarta temperatura de al menos 90 °C;
- ii) una quinta temperatura que es 10 °C más baja que la segunda temperatura; y



iii) una sexta temperatura en el intervalo de 65 °C a 75 °C.

12.- Una mezcla de reacción que comprende:

5 a) reactivos de amplificación que comprenden una polimerasa termoestable, nucleótidos, un primer cebador y un segundo cebador para amplificar un locus genómico diana a partir de una muestra de ácido nucleico tratada; en la que:

i. dicho primer cebador se hibrida con una secuencia metilada en dicho locus y contiene un nucleótido G o C 3' terminal que se corresponde con una citosina metilada en dicho locus genómico; y

ii. dichos reactivos amplifican preferentemente las copias metiladas de dicho locus genómico para producir una muestra amplificada;

10 b) reactivos del ensayo de flap que comprenden una flap endonucleasa, un módulo FRET, y un oligonucleótido flap que comprende un nucleótido G o C en una posición que se corresponde con la citosina metilada en el locus genómico, en la que no se incluye ningún oligonucleótido invasivo diferenciado; y

15 c) dicha muestra de ácido nucleico tratada, en la que dicha muestra de ácido nucleico tratada se prepara tratando una muestra de ácido nucleico inicial que comprende copias metiladas y copias no metiladas de dicho locus genómico con un agente que modifica la citosina no metilada para producir uracilo;

en la que dicha mezcla de reacción se caracteriza porque puede amplificar y detectar la presencia de copias metiladas de dicho locus genómico en dicha muestra.

20 13.- Un método según cualquiera de las reivindicaciones 1 a 11, o una mezcla de reacción según la reivindicación 12, en el que dicha sonda de flap comprende un nucleótido G o C interno en una posición que se corresponde con una segunda citosina metilada en dicho locus genómico.

14.- Un método según cualquiera de las reivindicaciones 1 a 11 o 13, o una mezcla de reacción según la reivindicación 12 o 13, en el que dicho primer cebador comprende un nucleótido G o C interno en una posición que se corresponde con una segunda citosina metilada en dicho locus genómico.

15.- Un kit para detectar un locus genómico metilado mediante un método según la reivindicación 1, que comprende:

25 a) reactivos de PCR que incluyen un primer cebador y un segundo cebador, en el que el primer cebador se hibrida con una secuencia metilada en el locus genómico y contiene un nucleótido G o C 3' terminal que se corresponde con una citosina metilada en la secuencia metilada; y

30 b) reactivos del ensayo de flap que comprenden una flap endonucleasa, un módulo FRET, y un oligonucleótido flap que comprende un nucleótido G o C en una posición que se corresponde con una citosina metilada en la secuencia metilada, en el que no se incluye ningún oligonucleótido invasivo diferenciado;

opcionalmente, comprende además instrucciones para realizar el método de la reivindicación 1.

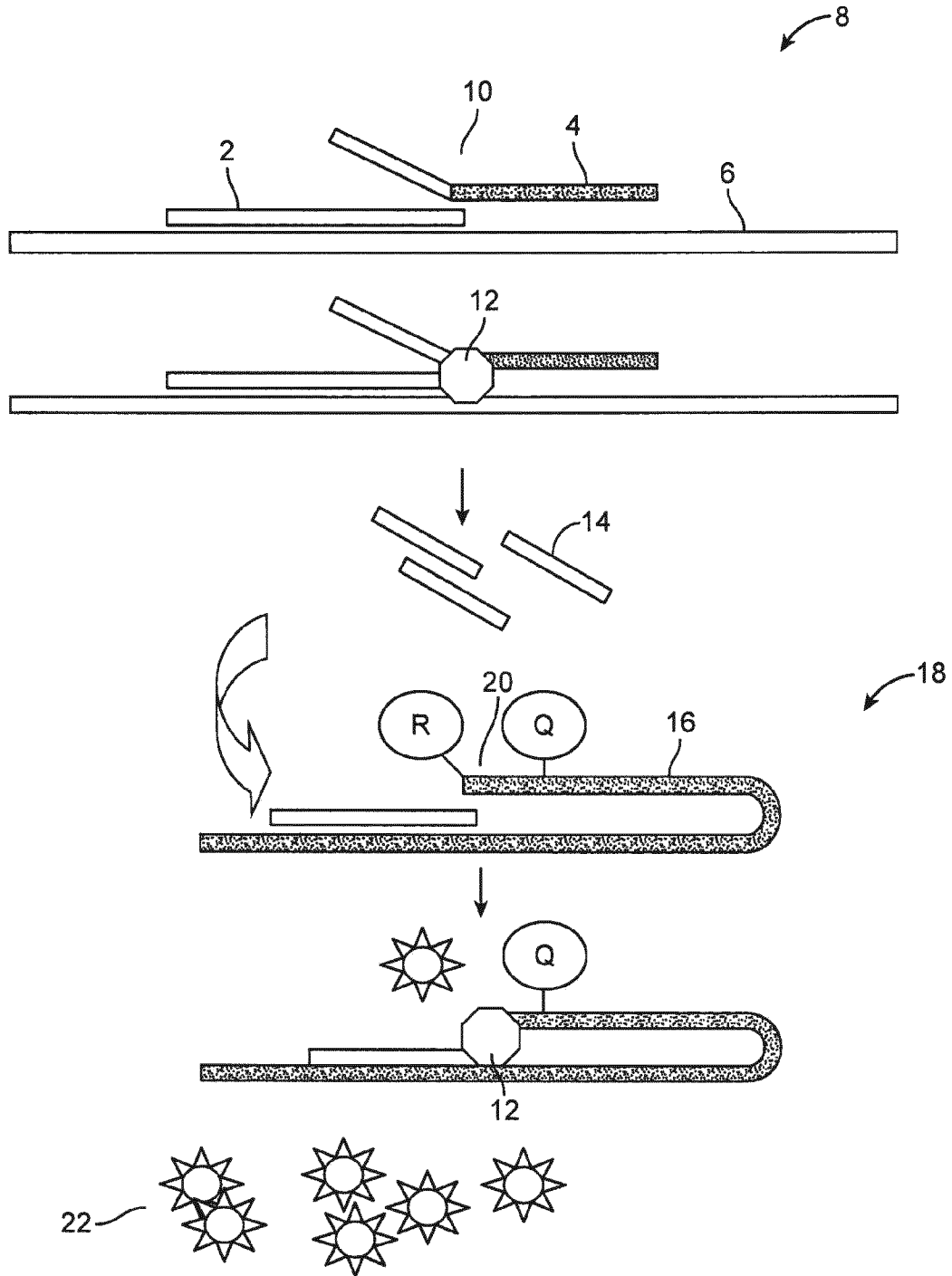


FIG. 1

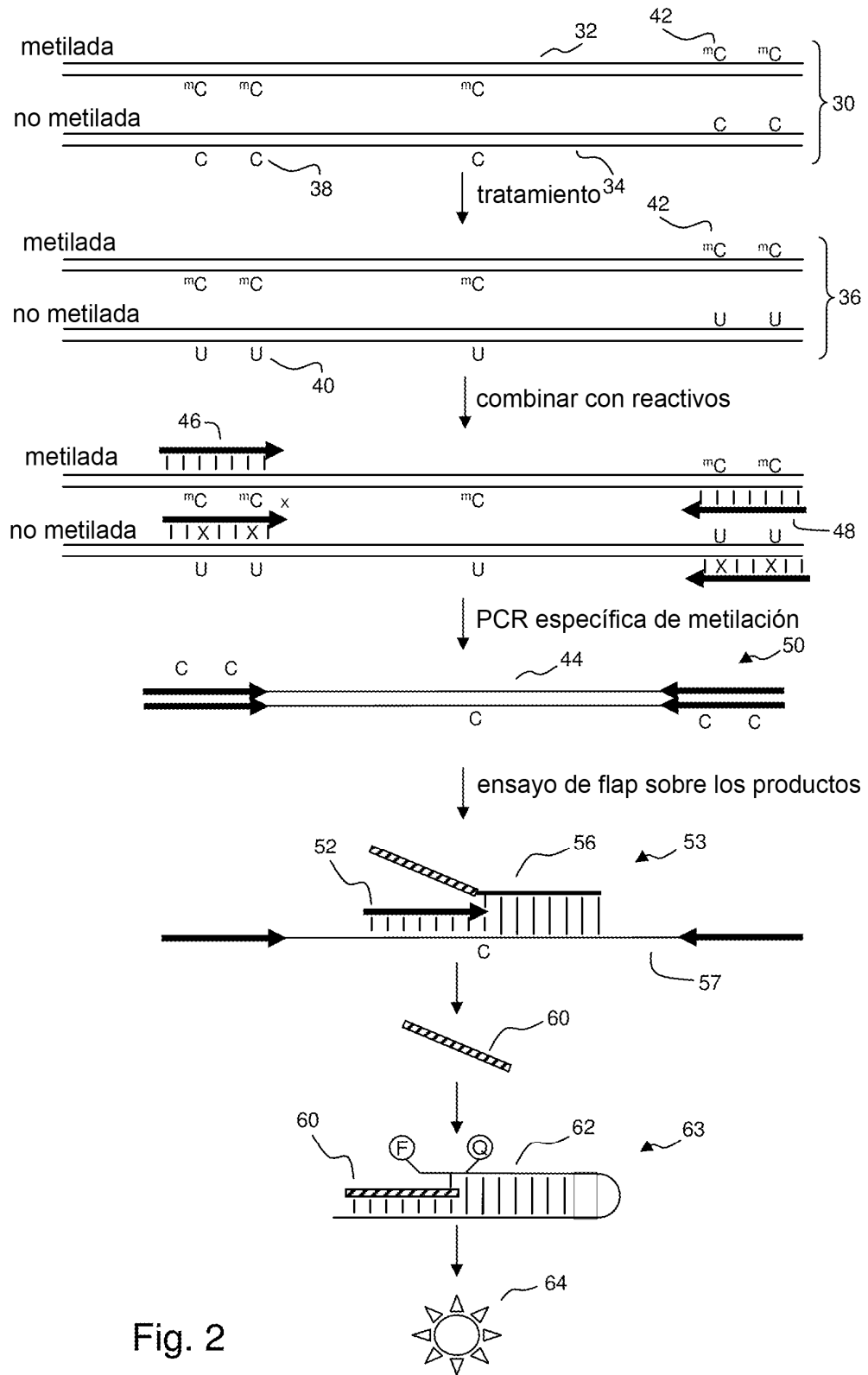


Fig. 2

Fragmento de secuencia de vimentina humana (VIM) que muestra la metilación y la conversión con bisulfito de secuencias no metiladas

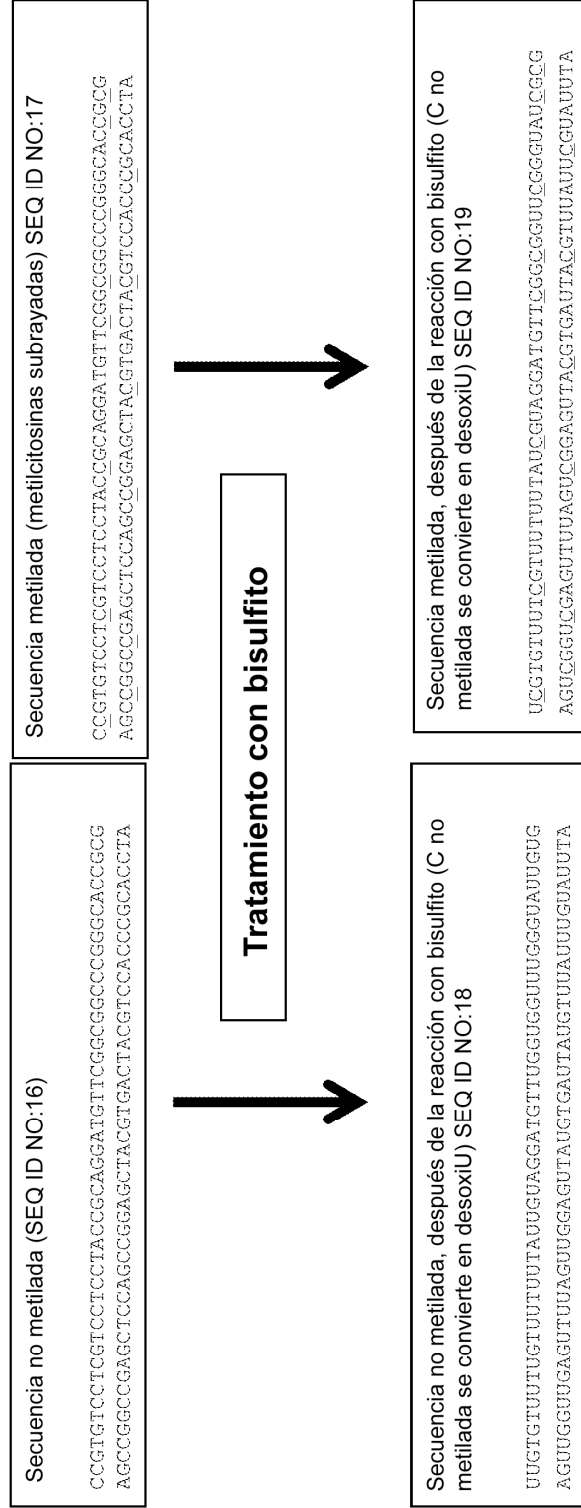


Fig. 3

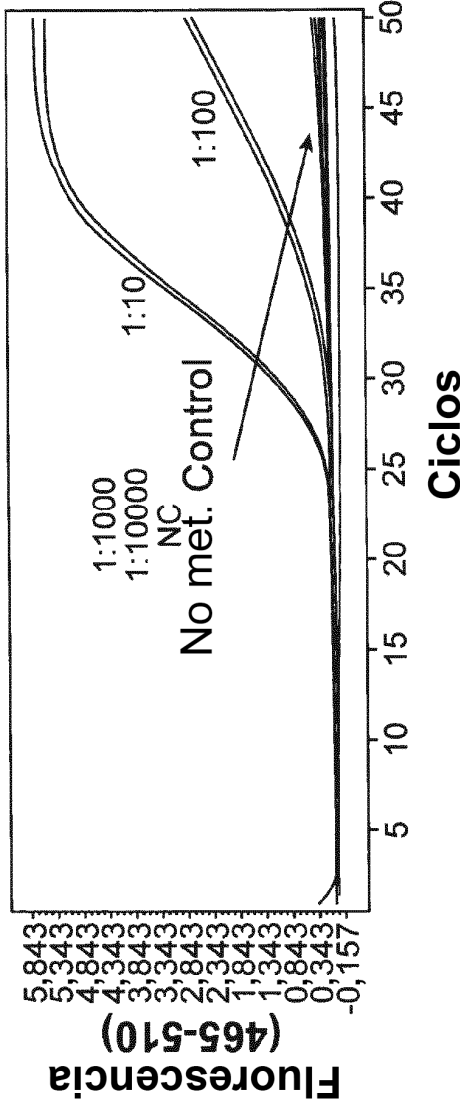
**Alineamiento de cebadores y sondas de flap, después de la conversión con bisulfito de citosinas:**

VIM no metilada (desapareamientos con cebadores o sondas)	1	UUGTGTUUUGTUUUUUAUUGUAGGATGTTUGGUGUUUGGUAUUGUG	50
		X X X X	
VIM metilada	1	UCGTGTUUTC <u>G</u> TUU <u>T</u> UUAUC <u>G</u> UAGGATGTT <u>C</u> GG <u>G</u> UU <u>C</u> GGUAUC <u>G</u> C <u>G</u>	50
Cebador directo		GGCGGTTCCGGTATCG	
Cebador de flap (las primeras 9 bases son el flap)		gacgcggag-GCG	
VIM no metilada (desapareamientos con cebadores o sondas)	51	AGUUGUUGAGUTUUAGUUGGAGUTAUGTGAUTAUGTUUAUUUGUAUUTA	100
		X X X X X X	
VIM metilada	51	AGUC <u>G</u> GU <u>C</u> GAGUTUUAGU <u>C</u> GGAGUTAC <u>G</u> TGAUTAC <u>G</u> TUU <u>A</u> UUC <u>G</u> UAUUTA	100
Cebador de flap (cont.)		AGTCGGTCCG/3C6/	
Cebador inverso		3' -TCAGCCCTCAATGCACTAATGC-5'	

**FIG. 4**

**Curvas de amplificación**

— C1: NC	— C2: MM2-B-1E1M/1E5U	— C3: MM2-B-1E2M/1E5U
— C4: MM2-B-1E3M/1E5U	— C5: MM2-B-1E4M/1E5U	— C6: MM2-B-No metilado -1E5
— C7: MM2-B-WT-1E5	— C8: HGD-1E5	— D1: NC
— D2: MM2-B-1E1M/1E5U	— D3: MM2-B-1E2M/1E5U	— D4: MM2-B-1E3M/1E5U
— D5: MM2-B-1E4M/1E5U	— D6: MM2-B-No metilado -1E5	— D7: MM2-B-WT-1E5
— D8: HGD-1E5		

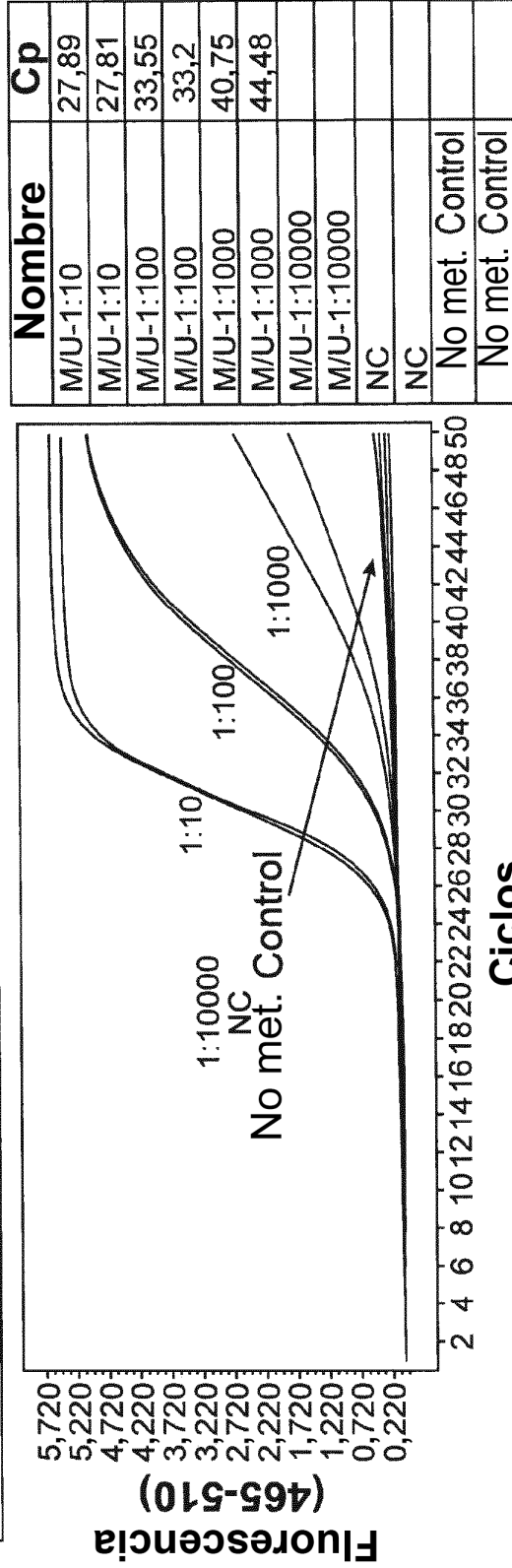


Nombre	Cp
M/U-1:10	30,04
M/U-1:10	29,94
M/U-1:100	40,19
M/U-1:100	40,95
M/U-1:1000	
M/U-1:1000	
M/U-1:10000	
M/U-1:10000	
NC	
NC	
No met. Control	
No met. Control	

**FIG. 5**

**Curvas de amplificación**

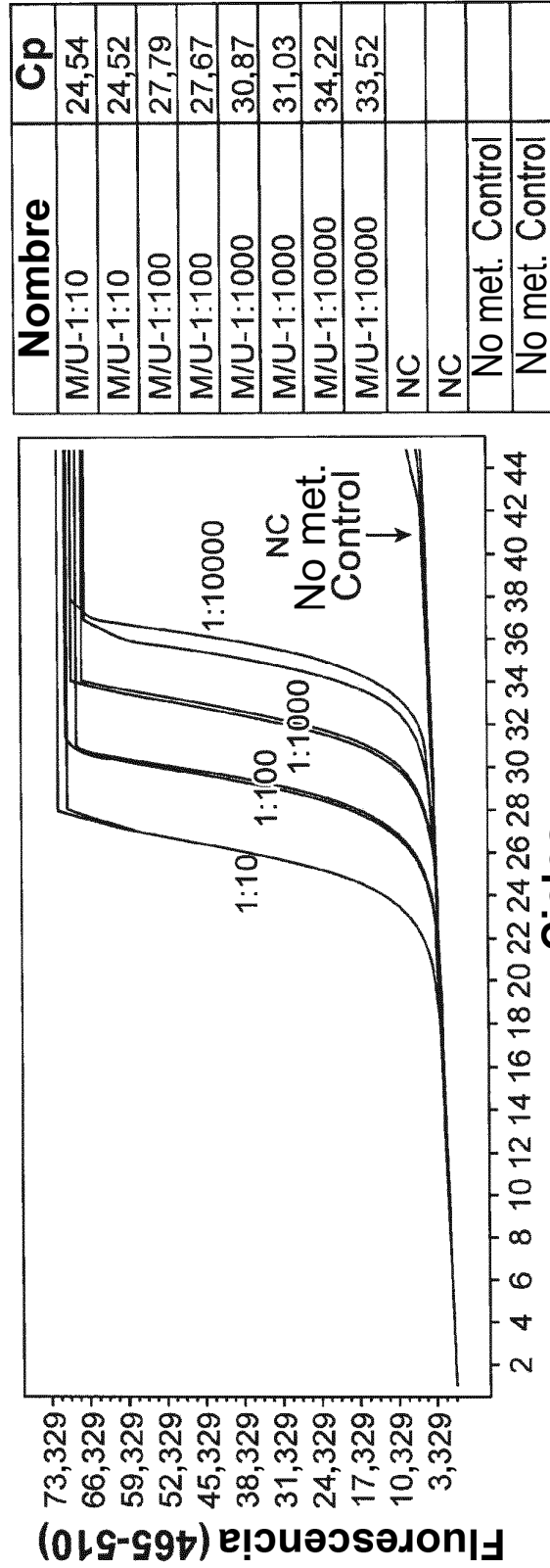
— E1: NC	— E2: FLJ-1E1M/1E5U	— E3: FLJ-1E2M/1E5U	— E4: FLJ-1E3M/1E5U
— E5: FLJ-1E4M/1E5U	— E6: FLJ- No metilado -1E5	— E7: FLJ-WT-1E5	— E8: HGD-1E5
— F1: NC	— F2: FLJ-1E1M/1E5U	— F3: FLJ-1E2M/1E5U	— F4: FLJ-1E3M/1E5U
— F5: FLJ-1E4M/1E5U	— F6: FLJ- No metilado -1E5	— F7: FLJ-WT-1E5	— F8: HGD-1E5



**FIG. 6**

**Curvas de amplificación**

— A3: M/U-1:10	— A4: M/U-1:10	— B3: M/U-1:100	— B4: M/U-1:100
— D3: M/U-1:10000	— D4: M/U-1:10000	— E3: No met.C	— E4: No met.C
— C3: M/U-1:1000	— C4: M/U-1:1000		
— H1: NC	— H2: NC		



**FIG. 7**