

19



OFICINA ESPAÑOLA DE
PATENTES Y MARCAS

ESPAÑA



11 Número de publicación: **2 654 561**

51 Int. Cl.:

C12Q 1/68

(2006.01)

12

TRADUCCIÓN DE PATENTE EUROPEA

T3

86 Fecha de presentación y número de la solicitud internacional: **09.07.2012 PCT/EP2012/063436**

87 Fecha y número de publicación internacional: **17.01.2013 WO13007702**

96 Fecha de presentación y número de la solicitud europea: **09.07.2012 E 12732686 (6)**

97 Fecha y número de publicación de la concesión europea: **04.10.2017 EP 2729579**

54 Título: **Procedimientos y ácidos nucleicos para determinar el pronóstico de un sujeto con cáncer**

30 Prioridad:

08.07.2011 US 201161505919 P

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

14.02.2018

73 Titular/es:

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

72 Inventor/es:

**LEWIN, JOERN y
KRISPIN, MANUEL**

74 Agente/Representante:

ISERN JARA, Jorge

Observaciones :

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

ES 2 654 561 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

Procedimientos y ácidos nucleicos para determinar el pronóstico de un sujeto con cáncer

5 CAMPO DE LA INVENCION

La presente invención se refiere a marcadores de ADN genómico útiles para determinar el pronóstico de un sujeto con cáncer de colon o colorrectal, determinar el tratamiento médico para un sujeto con cáncer de colon o colorrectal, determinar si un tumor de un sujeto con cáncer o colorrectal indica que el tumor es agresivo o tiene potencial metastásico o indica un tiempo de supervivencia reducido para el sujeto, la detección de una forma agresiva de cáncer en un sujeto, o la selección de un sujeto con cáncer de colon o colorrectal para el tratamiento del cáncer. Las realizaciones particulares proporcionan procedimientos, ácidos nucleicos, matrices de ácidos nucleicos y kits útiles para determinar el pronóstico de un sujeto que tiene cáncer.

15 ANTECEDENTES

Los procedimientos para determinar el pronóstico, y por lo tanto los procedimientos y agentes para determinar el tratamiento, de un paciente con cáncer incluye determinar el estadio del tumor basándose en diversos criterios. A menudo, esta determinación incluye procedimientos invasivos para observar los cambios histológicos en la morfología del tejido y el nivel de invasión del tumor en el tejido vecino y la metástasis.

En particular, el cáncer colorrectal es el segundo cáncer más frecuente en Europa y en los EE. UU. (412,900 y 150,000 individuos en 2006, respectivamente). En el 75% de los casos, la enfermedad se elimina mediante cirugía. Sin embargo, hay recurrencia en el 30-40% de los cánceres colorrectales en estadio II-III, la mayoría dentro de los 3-5 años del diagnóstico inicial. Además, solo el 16-66% de los pacientes son sintomáticos en el momento del diagnóstico de recurrencia y de estos tumores solo el 1,7-7% son resectables. Por lo tanto, 93- 98.3% de los casos recurrentes se identifican más allá del tiempo en que la resección es suficiente para eliminar todas el tumor o las células tumorales. Ver Fakhri, M.G. MD, CEA Monitoring in Colorectal Cancer, What You Should Know, Volumen 20: Número 6: 2006.

Las guías de práctica actuales para la vigilancia posterior a la resección para el estadio II y tumores mayores incluyen monitorización de CEA (antígeno carcinoembrionario) cada 3-6 meses durante 2 años, luego cada 6 meses durante un total de 5 años y/o colonoscopia después de 1 año, opcionalmente repetido cada dos años. Para pacientes colorrectales Etapa I y II que son positivos para CEA antes de la cirugía, solo el 3% a 32% de los pacientes se puede monitorizar mediante monitorización basada en CEA, dejando entre 68 y 97% de pacientes en Estadio I y II que no pueden ser monitorizados con CEA. Además, la sensibilidad de CEA depende del sitio de recurrencia de manera que solo una porción del 3-32% de los pacientes que pueden ser monitorizados puede beneficiarse.

Actualmente, el único marcador de pronóstico válido para predecir el resultado de los pacientes con cáncer colorrectal (CCR) es el sistema de estadificación Tumor-Nodo-Metástasis. (TNM). Los parámetros de este sistema son generalmente cualitativos y no son informativos para diferenciar aún más el riesgo en pacientes con riesgo estándar, que constituyen la mayoría del cáncer de colon en estadio II. Aproximadamente el 30% de los pacientes con cáncer de colon tienen una enfermedad en estadio II. Las guías actuales completas de la red de Cáncer nacional (NCCN) no recomiendan el uso de rutina de la quimioterapia adyuvante para todos los pacientes con cáncer de colon en estadio II, sino que consideran el tratamiento adyuvante en situaciones de alto riesgo de recurrencia. La tasa de supervivencia a cinco años para la población general de pacientes en el estadio II se ha estimado en un 75-80%. A pesar de estas tasas de curación relativamente altas con cirugía sola, en una proporción significativa de pacientes en estadio II, el cáncer recurrirá. La identificación de los marcadores que distinguen a los pacientes con bajo riesgo de aquellos con mayor riesgo de recurrencia de la enfermedad sería útil para identificar a los pacientes que serían candidatos para la quimioterapia adyuvante. Los biomarcadores en cáncer de colon en estadio II hasta la fecha se han limitado al diagnóstico clínico, pero no a su uso en el pronóstico o el resultado clínico.

Se han descrito varias proteínas y marcadores genéticos en un intento de mejorar la información del pronóstico y predecir el beneficio del tratamiento sistémico. A diferencia de otros tipos de cáncer, con excepción de la mutación KRAS, ninguno de los marcadores estudiados ha ingresado en el tratamiento clínico del cáncer colorrectal hasta el momento.

Metilación de isla CpG: se ha demostrado que la metilación aberrante de islas CpG conduce al silenciamiento transcripcional de ciertos genes que se han relacionado previamente con la patogénesis de diversos trastornos proliferativos celulares, incluido el cáncer. Las islas CpG son secuencias que son ricas en dinucleótidos CpG y generalmente se pueden encontrar en la región 5' de aproximadamente el 50% de todos los genes humanos. La metilación de las citosinas en estas islas conduce a la pérdida de la expresión génica y se ha informado de la inactivación del cromosoma X y la impronta genómica.

La metilación del ADN y el pronóstico de la enfermedad: se ha demostrado que la metilación del ADN está asociada con el pronóstico del paciente en varias publicaciones tales como el documento EP 1692316 y el documento WO 2007/085497.

Es necesario contar con mejores medios para determinar el pronóstico, el resultado clínico, la carga tumoral, la carga de cáncer y/o la inclusión del paciente en un grupo de tratamiento, en cualquier punto que comience en el diagnóstico inicial y continúe durante el tratamiento, incluida la capacidad para determinar el estado de recaída, remisión o recurrencia, utilizando técnicas de prueba mínimamente invasivas.

RESUMEN DE LA INVENCION

La invención proporciona un procedimiento para determinar el pronóstico de un sujeto con cáncer de colon o colorrectal como se especifica en las reivindicaciones 1 y 9. La invención suministra un procedimiento para determinar el pronóstico de un cáncer de colon o colorrectal que comprende las etapas de: medir el nivel de pretratamiento del ADN genómico metilado del SEPTIN9 (SEQ ID NO:1) o un fragmento del mismo, en una muestra de sangre obtenida del sujeto antes de cirugía o resección; medir el nivel posterior al tratamiento del ADN genómico metilado del gen o un fragmento del mismo, en una muestra de sangre obtenida del sujeto después de cirugía o resección, por lo que una cantidad incrementada o equivalente del ADN genómico metilado o fragmento en la muestra posterior al tratamiento en comparación con la muestra de pretratamiento indica tratamiento adicional de cáncer para el sujeto luego de cirugía o resección. En una realización, una cantidad incrementada del ADN genómico metilado o fragmento en la muestra posterior al tratamiento después de cirugía o resección en comparación con la muestra de pretratamiento antes de cirugía o resección indica que el cáncer de colon o colorrectal es agresivo o tiene un potencial metastásico o un tiempo de supervivencia reducido para el sujeto. En una realización preferida, el procedimiento de la invención proporciona un procedimiento para determinar el pronóstico de un sujeto con cáncer de colon o colorrectal, que comprende las etapas de: a) medir el nivel de pretratamiento del ADN genómico metilado del SEPTIN9 (SEQ ID NO:1) o un fragmento del mismo, en una muestra de sangre, obtenida del sujeto antes de cirugía o resección; b) medir el nivel posterior al tratamiento del ADN genómico metilado del gen o un fragmento del mismo, en una muestra de sangre obtenida del sujeto después de cirugía o resección; y c) comparar el nivel de postratamiento medido y el nivel de pretratamiento medido de ADN metilado, por lo que una cantidad incrementada o equivalente del ADN genómico metilado o fragmento en la muestra de tratamiento posterior en comparación con la muestra de pretratamiento indica un mal pronóstico y, por lo tanto, la necesidad de un tratamiento adicional contra el cáncer para el sujeto. En una realización preferida del procedimiento, el procedimiento comprende las etapas c) y d) como sigue: c) comparación del nivel de postratamiento medido después de la resección o cirugía y el nivel de pretratamiento medido de ADN metilado antes de cirugía o resección y d) determinación del pronóstico de un sujeto con cáncer de colon o colorrectal basado sobre el resultado de la comparación de la etapa c), mediante el cual una cantidad aumentada o equivalente del ADN genómico metilado o fragmento en la muestra posterior al tratamiento en comparación con la muestra de pretratamiento indica un mal pronóstico y, por lo tanto, una necesidad adicional de tratamiento del cáncer para el sujeto.

Los niveles estables o incluso aumentados del ADN genómico metilado, preferiblemente, indican que la cirugía o resección no eliminó las células cancerígenas que descargan el fragmento de ADN metilado o que su número aumentó a pesar del tratamiento, es decir, el cáncer creció más. En contraste con esto, los niveles disminuidos del ADN genómico metilado, preferiblemente, indican que el número de células cancerígenas disminuyó, es decir, que el tratamiento fue exitoso para reducir la carga tumoral del paciente. En particular, una disminución a niveles que están por debajo del nivel de detección indica que todas las células cancerosas pueden haber sido erradicadas del paciente, es decir, una cura del cáncer. Por lo general, un cáncer que responde mal al tratamiento se considera agresivo.

Si el tratamiento de cáncer aplicado es cirugía o resección, una disminución del nivel del ADN genómico metilado a un nivel por debajo del límite de detección, preferiblemente indica una cura del cáncer. La persona experta en la técnica entenderá que, dependiendo del resultado de los estudios clínicos, pueden definirse otros niveles umbral para definir una "cura" de un paciente. El establecimiento de tales niveles de umbral se puede lograr mediante procedimientos estadísticos convencionales en el campo de las estadísticas (médicas).

Sin embargo, si el nivel del ADN genómico metilado medido después de cirugía o resección está por encima del nivel de detección, esto, preferiblemente, indica que la cirugía o resección fue insuficiente para lograr un curado completo. Este es generalmente el caso si el cáncer ya se diseminó más allá del área afectada por el tratamiento localizado. Por lo tanto, incluso en el caso de una disminución del nivel del ADN genómico metilado, la presencia continuada de niveles detectables del ADN genómico metilado indica un pobre pronóstico porque un cáncer que se disemina más allá de su lugar de origen es, por lo general, mucho más difícil para tratar.

La selección del tratamiento adicional de un paciente con cáncer depende de su pronóstico. Si el pronóstico es bueno, el tratamiento posterior no necesita ser tan agresivo como en los casos con mal pronóstico. Como el pronóstico del paciente es un parámetro importante para la selección del tratamiento adicional de un paciente con cáncer, la invención proporciona un procedimiento para determinar el tratamiento médico para un sujeto con cáncer de colon o colorrectal, que comprende las etapas de: medir el nivel de pretratamiento del ADN genómico metilado del SEPTIN9 (SEQ ID NO:1), o un fragmento del mismo, en una muestra de sangre obtenida del sujeto antes de cirugía o resección; medir el nivel posterior al tratamiento del ADN genómico metilado del gen o un fragmento del mismo, en una muestra de sangre obtenida del sujeto después de cirugía o resección, por lo que una cantidad incrementada o equivalente del ADN genómico metilado o fragmento en la muestra posterior al tratamiento en comparación con la muestra de pretratamiento, indica tratamiento adicional contra el cáncer para el sujeto. En una realización preferida, la invención

también proporciona un procedimiento para determinar qué tipo de tratamiento médico es adecuado para un sujeto con cáncer de colon o colorrectal, que comprende las etapas de: a) medir el nivel de pretratamiento del ADN genómico metilado del SEPTIN9 (SEQ ID NO:1) , o un fragmento del mismo, en una muestra de sangre obtenida del sujeto; antes de cirugía o resección b) medir el nivel posterior al tratamiento del ADN genómico metilado del gen o un fragmento del mismo, en una muestra de sangre obtenida del sujeto después de cirugía o resección; y c) comparar el nivel de postratamiento medido y el nivel de pretratamiento medido del ADN metilado, por lo que una cantidad incrementada o equivalente del ADN genómico metilado o fragmento en la muestra posterior al tratamiento en comparación con la muestra de pretratamiento indica tratamiento de cáncer adicional para el sujeto después de cirugía o resección. En una realización preferida del procedimiento, el procedimiento comprende las etapas c) y d) de la siguiente manera: c) comparación del nivel de postratamiento medido y el nivel de pretratamiento medido de ADN metilado y d) determinación basada en el resultado de la comparación de la etapa c) qué tipo de tratamiento médico es adecuado para un sujeto con cáncer de colon o colorrectal, por lo que una cantidad incrementada o equivalente del ADN genómico metilado o fragmento en la muestra posterior al tratamiento en comparación con la muestra de pretratamiento indica tratamiento adicional de cáncer para el sujeto.

Preferiblemente, un nivel posterior al tratamiento del ADN genómico metilado que disminuyó por debajo del nivel de detección indica que no se requiere tratamiento médico adicional. En estos casos, una monitorización del paciente para recaídas puede ser suficiente. Sin embargo, si el nivel posterior al tratamiento del ADN genómico metilado no disminuye o incluso aumenta, puede ser necesario un tratamiento médico adicional. Como un nivel creciente del ADN genómico metilado indica una falla del tratamiento, esta situación, preferiblemente, indica la necesidad de cambiar a un tipo diferente de tratamiento.

La persona experta en la técnica entenderá que la elección de un tratamiento adecuado para un paciente con cáncer no puede basarse exclusivamente en el resultado de una única prueba de laboratorio. Esta decisión se basa, preferiblemente, en el juicio médico de la condición del paciente. Dicho juicio, preferiblemente incluye resultados de procedimientos de diagnóstico convencionales tales como procedimientos de formación de imágenes, así como los estados generales de salud del paciente particular además de los resultados obtenidos aplicando el procedimiento de la presente invención.

La invención proporciona un procedimiento para determinar si un tumor de un sujeto con cáncer de colon o colorrectal indica que el tumor es agresivo o tiene potencial metastásico o indica un tiempo de supervivencia reducido para el sujeto que comprende: medir el nivel de pretratamiento del ADN genómico metilado del SEPTIN9 (SEQ ID NO:1) o un fragmento del mismo, en una muestra de sangre obtenida del sujeto antes de cirugía o resección; y medir el nivel posterior al tratamiento del ADN genómico metilado del gen o un fragmento del mismo, en una muestra de sangre obtenida del sujeto después de cirugía o resección, por lo que una cantidad aumentada o equivalente del ADN genómico metilado o fragmento en la muestra posterior al tratamiento en comparación con la muestra previa al tratamiento indica que el cáncer es agresivo o tiene potencial metastásico o indica un tiempo de supervivencia reducido para el sujeto. En una realización preferida, la invención proporciona un procedimiento para determinar si un tumor de un sujeto con cáncer de colon o colorrectal indica que el tumor es agresivo o tiene potencial metastásico o indica un tiempo de supervivencia reducido para el sujeto que comprende: a) medir el nivel de pretratamiento del ADN genómico metilado del SEPTIN9 (SEQ ID NO:1) ADN, o un fragmento del mismo, en una muestra de sangre obtenida del sujeto; antes de cirugía o resección; b) medir el nivel posterior al tratamiento del ADN genómico metilado del gen o un fragmento del mismo, en una muestra de sangre obtenida del sujeto después de cirugía o resección; y c) comparar el nivel de postratamiento medido y el nivel de pretratamiento medido de ADN metilado, por lo que una cantidad incrementada o equivalente del ADN genómico metilado o fragmento en la muestra de postratamiento en comparación con la muestra de pretratamiento indica que el tumor es agresivo o tiene potencial metastásico o indica un tiempo de supervivencia reducido para el sujeto. En una realización preferida del procedimiento, el procedimiento comprende las etapas c) y d) de la siguiente manera: c) comparación del nivel de postratamiento medido después de la cirugía o resección y el nivel de pretratamiento medido de ADN metilado antes de la cirugía o resección y d) determinación basada en el resultado de la comparación de la etapa c) si un tumor de un sujeto con cáncer de colon o colorrectal indica que el tumor es agresivo o tiene potencial metastásico o indica un tiempo de supervivencia reducido para el sujeto, por lo que una cantidad aumentada o equivalente del ADN genómico metilado o fragmento en la muestra posterior al tratamiento después de cirugía o resección en comparación con la muestra de pretratamiento antes de cirugía o resección indica que el tumor es agresivo o tiene potencial metastásico o indica un tiempo de supervivencia reducido para el sujeto.

Además, la invención proporciona un procedimiento para determinar si un tumor de un sujeto con cáncer de colon o colorrectal es agresivo y/o tiene potencial metastásico que comprende las etapas de a) medir el nivel de pretratamiento del ADN genómico metilado del SEPTIN9 (SEQ ID NO:1), o un fragmento del mismo, en una muestra de sangre obtenida del sujeto antes de cirugía o resección; b) medir el nivel posterior al tratamiento del ADN genómico metilado del gen o un fragmento del mismo, en una muestra de sangre obtenida del sujeto después de cirugía o resección; c) comparar el nivel de postratamiento medido y el nivel de pretratamiento medido del ADN metilado, por lo que una cantidad incrementada o equivalente del ADN genómico metilado o fragmento en la muestra posterior al tratamiento en comparación con la muestra de pretratamiento indica que el tumor es agresivo y/o tiene potencial metastásico. En una realización preferida del procedimiento, el procedimiento comprende las etapas c) y d) de la siguiente manera: c) comparación del nivel de postratamiento medido y el nivel de pretratamiento medido de ADN metilado y d)

determinación basada en el resultado de la comparación de la etapa c) si un tumor de un sujeto con cáncer de colon o colorrectal es agresivo y/o tiene potencial metastásico, por lo que una cantidad incrementada o equivalente del ADN genómico metilado o fragmento en la muestra posterior al tratamiento en comparación con la muestra de pretratamiento indica que el tumor es agresivo y/o tiene potencial metastásico.

5 La invención proporciona un procedimiento para detectar una forma agresiva de cáncer en un sujeto, que comprende a) medir el nivel de pretratamiento del ADN genómico metilado del SEPTIN9 (SEQ ID NO:1), o un fragmento del mismo, en una muestra de sangre obtenida del sujeto antes de cirugía o resección; b) medir el nivel posterior al tratamiento del ADN genómico metilado del gen o un fragmento del mismo, en una muestra de sangre obtenida del
10 sujeto después de cirugía o resección, por lo que una cantidad aumentada del ADN genómico metilado o fragmento en la muestra posterior al tratamiento en comparación con la muestra de pretratamiento indica que el cáncer es una forma agresiva. En una realización preferida, la invención proporciona un procedimiento para detectar una forma agresiva de cáncer en un sujeto, que comprende a) medir el nivel de pretratamiento del ADN genómico metilado del SEPTIN9 (SEQ ID NO:1), o un fragmento del mismo, en una muestra de sangre obtenida del sujeto antes de cirugía
15 resección; b) medir el nivel posterior al tratamiento del ADN genómico metilado del gen o un fragmento del mismo, en una muestra de sangre obtenida del sujeto después de cirugía o resección; y c) comparar el nivel de postratamiento medido y el nivel de pretratamiento medido del ADN metilado, por lo que una cantidad incrementada de ADN genómico metilado o fragmento en la muestra posterior al tratamiento en comparación con la muestra de pretratamiento indica que el cáncer es una forma agresiva. En una realización preferida del procedimiento, el procedimiento comprende las
20 etapas c) y d) de la siguiente manera: c) comparación del nivel de postratamiento medido y el nivel de pretratamiento medido de ADN metilado y d) detección basada en el resultado de la comparación de la etapa c) una forma agresiva de cáncer en un sujeto, por el cual una cantidad incrementada del ADN genómico metilado o fragmento en la muestra posterior al tratamiento en comparación con la muestra de pretratamiento indica que el cáncer es una forma agresiva.

25 La invención proporciona un procedimiento para seleccionar un sujeto con cáncer de colon o colorrectal para el tratamiento del cáncer que comprende: medir el nivel de pretratamiento del ADN genómico metilado del SEPTIN9 (SEQ ID NO:1), o un fragmento del mismo, en una muestra de sangre obtenida del sujeto antes de cirugía o resección; y medir el nivel posterior al tratamiento del ADN genómico metilado del gen o un fragmento del mismo, en una muestra de sangre obtenida del sujeto después de cirugía o resección, por lo que un aumento en la cantidad de ADN genómico
30 metilado del gen en la muestra posterior al tratamiento en comparación con la muestra previa al tratamiento indica tratamiento adicional contra el cáncer. En una realización preferida, la invención proporciona un procedimiento para seleccionar un sujeto con cáncer de colon o colorrectal para el tratamiento adicional del cáncer que comprende: medir el nivel de pretratamiento del ADN genómico metilado de un gen, del SEPTIN9 (SEQ ID NO:1) o un fragmento del mismo, en una muestra de sangre obtenida del sujeto antes de cirugía o resección; y medir el nivel posterior al
35 tratamiento del ADN genómico metilado del gen o un fragmento del mismo, en una muestra de sangre obtenida del sujeto después de cirugía o resección; comparar el nivel de postratamiento medido y el nivel de pretratamiento medido de ADN metilado, con lo que aumenta la cantidad de ADN genómico metilado del gen o fragmento del mismo o una cantidad equivalente de dicho ADN o fragmento del mismo en la muestra de postratamiento comparada con la muestra de pretratamiento indica la necesidad de un tratamiento adicional contra el cáncer. En una realización preferida del
40 procedimiento, el procedimiento comprende las etapas c) y d) de la siguiente manera: c) comparación del nivel de postratamiento medido después de cirugía o resección y el nivel de pretratamiento medido de ADN metilado antes de cirugía o resección y d) selección basada en el resultado de la comparación de la etapa c) un sujeto con cáncer de colon o colorrectal para tratamiento adicional de cáncer, mediante el cual aumenta la cantidad de ADN genómico metilado del gen o fragmento del mismo o una cantidad equivalente de dicho ADN o fragmento del mismo en la muestra
45 posterior al tratamiento en comparación con la muestra de pretratamiento indica la necesidad de un tratamiento adicional contra el cáncer.

Se divulga un procedimiento para determinar el éxito de un tratamiento contra el cáncer de colon o colorrectal en un sujeto que comprende las etapas de a) medir el nivel de pretratamiento del ADN genómico metilado del SEPTIN9 (SEQ ID NO:1), o un fragmento del mismo, en una muestra de sangre obtenida del sujeto antes de cirugía o resección; y b) medir el nivel posterior al tratamiento del ADN genómico metilado del gen o un fragmento del mismo, en una muestra de sangre obtenida del sujeto después de cirugía o resección; c) comparar el nivel de postratamiento medido y el nivel de pretratamiento medido de ADN metilado, mediante lo cual (i) una disminución en la cantidad de ADN genómico metilado del gen o fragmento del mismo en la muestra posterior al tratamiento en comparación con el la
50 muestra de pretratamiento indica que el tratamiento fue exitoso y (ii) un aumento en la cantidad de ADN genómico metilado del gen o el fragmento del mismo o una cantidad equivalente de dicho ADN o fragmento del mismo en la muestra posterior al tratamiento en comparación con la muestra de pretratamiento indica que el tratamiento no fue exitoso. En una realización preferida del procedimiento, el procedimiento comprende las etapas c) y d) de la siguiente manera: c) comparación del nivel de postratamiento medido después de cirugía o resección y el nivel de pretratamiento medido de ADN metilado antes de cirugía o resección y d) determinación basada en el resultado de la comparación de la etapa c) el éxito de un tratamiento contra el cáncer en un sujeto, donde (i) una disminución en la cantidad de ADN genómico metilado del gen o fragmento del mismo en la muestra posterior al tratamiento en comparación con la muestra de pretratamiento indica que el tratamiento fue exitoso y (ii) un aumento en la cantidad de ADN genómico metilado del gen o fragmento del mismo o una cantidad equivalente de dicho ADN o fragmento del mismo en la muestra
60 posterior al tratamiento en comparación con la muestra de pretratamiento indica que el tratamiento no fue exitoso
65

- 5 Preferiblemente, un tratamiento que fue "exitoso" logró al menos uno de los siguientes efectos: remisión del cáncer, aumento del tiempo hasta la recurrencia del cáncer, aumento del tiempo hasta la progresión tumoral, alivio de los síntomas del cáncer, reducción de masa tumoral y disminución del número de tumores. Más preferiblemente, un "tratamiento exitoso", caracterizado por una curación del cáncer, es decir, la erradicación completa detectable y células tumorales no detectables. Un indicador preferido de la cura del cáncer es la supervivencia sin recurrencia del paciente durante al menos 5 años o, más preferiblemente, al menos 10 años.
- Un tratamiento que "no tuvo éxito", preferiblemente, no logró ninguno de los objetivos descritos anteriormente.
- 10 El nivel de ADN metilado del SEPTIN9 y opcionalmente del RASSF2a es generalmente útil como un marcador para las propiedades de un cáncer tal como agresividad o carga tumoral. Una comparación de los niveles de ADN metilado tomados en diferentes puntos en el tiempo, por lo tanto, indican independientemente de tratamiento en desarrollo como se desarrollan las propiedades del cáncer durante el tiempo.
- 15 La primera y segunda muestra se puede tomar en cualquier momento siempre y cuando la segunda muestra se tome después de la primera muestra. Preferiblemente, la segunda muestra se toma al menos 1 mes, al menos 2 meses, al menos 3 meses, al menos 6 meses, al menos 9 meses o al menos 12 meses después de la primera muestra.
- 20 Dentro de un aspecto de los procedimientos de la invención, el gen es SEPTIN9 (SEQ ID NO: 1) o RASSF2a (SEQ ID NO: 16).
- En otro aspecto de los procedimientos de la invención, el gen es SEPTIN9 (SEQ ID NO: 1).
- 25 En otro aspecto de los procedimientos de la invención, el gen es RASSF2A (SEQ ID NO: 16).
- En una realización preferida adicional de la invención, los procedimientos descritos anteriormente se basan en la medición del nivel de ADN metilado tanto de SEPTIN9 como de RASSF2A.
- 30 El cáncer se selecciona del grupo que consiste de: en una realización, la etapa del cáncer colorrectal es cáncer colorrectal estadio 1. En otra realización, el estadio del cáncer colorrectal es cáncer colorrectal estadio II. En otra realización, el cáncer es cáncer colorrectal estadio III. En otra realización, el cáncer colorrectal es cáncer colorrectal estadio IV.
- 35 El término "tratamiento localizado" se refiere preferentemente a resección quirúrgica del tumor y/o radioterapia. El término "tratamiento no localizado" es equivalente al tratamiento sistémico y, preferiblemente, se refiere a quimioterapia y/o inmunoterapia.
- La muestra de sangre en una realización la sangre es suero o plasma. Se prefiere el uso de suero o plasma.
- 40 En otro aspecto de los procedimientos de la invención, el ADN genómico metilado o fragmento del mismo se mide cuantitativamente o se mide cuantitativamente en parte. En otro aspecto de los procedimientos de la invención, el ADN genómico metilado o fragmento se mide cuantitativamente en parte y cualitativamente en parte o semicuantitativamente
- 45 Dentro de otro aspecto de los procedimientos de la invención, medir el ADN genómico metilado o fragmento comprende poner en contacto ADN genómico de la muestra de sangre con al menos un reactivo o una serie de reactivos que distingue entre dinucleótidos CpG metilados y no metilados dentro de al menos una región objetivo del ADN genómico, donde la región objetivo comprende, o hibrida en condiciones restrictivas a una secuencia de al menos 9, al menos 16 o al menos 25 nucleótidos contiguos de SEQ ID NO: 1, 2, 3 o 16 en donde dichos nucleótidos contiguos comprenden al menos una secuencia de dinucleótidos CpG. En una realización, poner en contacto el ADN genómico, o el fragmento del mismo en b), comprende el uso de un reactivo seleccionado del grupo que comprende bisulfito, sulfito de hidrógeno, bisulfito y combinaciones de los mismos.
- 50 Dentro de otro aspecto de los procedimientos de la invención comprenden: a) extraer o aislar de otro modo el ADN genómico o fragmento del mismo de las muestras de sangre; b) tratar el ADN genómico extraído o aislado o uno de sus fragmentos con uno o más reactivos para convertir las bases de citosina que no están metiladas en su posición 5 en uracilo o en otra base que es detectablemente diferente de la citosina en términos de propiedades de hibridación; c) poner en contacto el ADN genómico tratado o el fragmento tratado, con una enzima de amplificación y al menos un cebador que comprende, una secuencia contigua de al menos 9, al menos 10, al menos 11, al menos 12, al menos 13, al menos 14, al menos 15, al menos 16, al menos 17, al menos 19, al menos 20, al menos 25, o al menos 50 nucleótidos que es complementario o se hibrida en condiciones moderadamente estrictas o rigurosas a una secuencia tratada o a un complemento de los mismos, en el que el ADN genómico tratado o el fragmento del mismo se amplifica para producir al menos un amplificado, o no se amplifica; y d) determinar, basándose en la presencia, ausencia o cantidad de, o en una propiedad de dicho amplificado, el estado o nivel de metilación de al menos un dinucleótido CpG del gen, o un promedio, o un valor que refleje un estado de metilación promedio o nivel de una pluralidad de
- 55
- 60
- 65

dinucleótidos CpG del gen. El ADN genómico tratado mencionado anteriormente se selecciona preferiblemente del grupo que consiste en la SEQ ID NO: 4, 5, 6, 7, 8, 9, 10, 11, 12, 13, 14, 15, 17, 18, 19 y 20.

Dentro de otro aspecto de los procedimientos de la invención comprende a) extraer o aislar de otro modo el ADN genómico o fragmento del mismo de las muestras de sangre; b) digerir el ADN genómico extraído o aislado o un fragmento del mismo con una o más enzimas de restricción sensibles a la metilación; c) poner en contacto la digestión enzimática de restricción de ADN de b), con una enzima de amplificación y al menos dos cebadores adecuados para la amplificación de una secuencia que comprende al menos un dinucleótido CpG del gen; y d) determinar, basándose en la presencia, ausencia o clase de un amplificado, el estado o nivel de metilación de al menos un dinucleótido CpG del gen.

Más información sobre los procedimientos preferidos para medir el nivel de un ADN genómico metilado se puede encontrar más adelante en la solicitud. En una realización especialmente preferida de la presente invención, el procedimiento para medir los niveles de metilación del ADN genómico es MethyLight™, HeavyMeth™ o PCR específica de metilación.

La presente invención proporciona un procedimiento para determinar el pronóstico de un sujeto que tiene cáncer colorrectal (CRC) o cáncer de colon, en un sujeto que comprende determinar los niveles de Metilación de ADN de Septin 9 (Septin9) y opcionalmente de RASSF2A en plasma aislado de dicho sujeto en el que después de la resección del tumor primario, el estado de metilación es indicativo del pronóstico de dicho sujeto. En una realización, la resección es curativa.

Los ejemplos descritos en este documento mostraron que el biomarcador Septin9 disminuye en aproximadamente el 73% del estadio II del CRC investigado y solo en el 20% de los pacientes en el estadio III después de la resección del tumor primario. La presencia de Septin9 en pacientes con CCR después del tratamiento con intención curativa se puede utilizar como un indicador de pronóstico precoz de recurrencia de la enfermedad. El hecho de que Septin9 aún sea detectable después de la resección del tumor primario, indica un alto riesgo de la presencia de células tumorales (por ejemplo, micro metástasis) que todavía están en el cuerpo del paciente y que pueden ser sensibles a la detección por Septin9.

En realizaciones adicionales, dicha expresión se determina detectando la presencia, ausencia o cantidad de metilación de CpG dentro de dicho gen, y a partir de ahí deduciendo el pronóstico de que dicho sujeto tenga cáncer. Dicho procedimiento comprende las siguientes etapas: i) poner en contacto ADN genómico aislado de una muestra de sangre obtenida del sujeto con al menos un reactivo, o una serie de reactivos que distingue entre dinucleótidos CpG metilados y no metilados dentro de al menos una región objetivo del ADN genómico, en el que la secuencia de nucleótidos de dicha región objetivo comprende al menos una secuencia de dinucleótidos CpG de al menos un gen o secuencia genómica de este grupo de genes y ii) determinación del pronóstico de un sujeto que tiene cáncer. Preferiblemente, la región objetivo comprende, o hibrida en condiciones rigurosas, una secuencia de al menos 16, al menos 25 o al menos 50 nucleótidos contiguos.

Dicho uso del gen puede habilitarse por medio de cualquier análisis de la expresión del gen, por medio de análisis de expresión de ARNm o análisis de expresión de proteína. En una realización, la determinación del pronóstico de un sujeto que tiene cáncer se habilita por medio del análisis del estado de metilación de al menos un gen o secuencia genómica que está metilada en tejido neoplásico, pero no metilada en tejido no canceroso, incluyendo isoformas, fragmentos, promotor o elementos reguladores, y versiones anticodificantes de los mismos.

Se divulga un procedimiento para el análisis de muestras biológicas para características asociadas con la progresión del cáncer, el procedimiento caracterizado porque el ácido nucleico, o un fragmento del mismo se pone en contacto con un reactivo o serie de reactivos capaces de distinguir entre metilado y no metilado. Dinucleótidos CpG dentro de la secuencia genómica. En una realización, el gen es SEPTIN9 o RASSF2A.

Preferiblemente, la secuencia de SEPTIN9 está definida por SEQ ID NO: 1, 2 o 3. Más preferiblemente, la secuencia de SEPTIN9 está definida por SEQ ID NO: 2 o 3.

La secuencia de RASSF2A está, preferiblemente, definida por SEQ ID NO: 16.

En una realización preferida de la presente invención, se determina el estado de metilación de la región promotora de SEPTIN9 y opcionalmente RASSF2A. En una realización más preferida, se determina el estado de metilación de al menos una citosina comprendida por la secuencia genómica definida por SEQ ID NO: 32 y/o 34. En una realización aún más preferida de la invención se determina el estado de metilación de al menos una citosina seleccionada del grupo que consiste en las citosinas en las posiciones 21, 28, 30, 37 y 39 de la SEQ ID NO: 32 y las posiciones 25, 29, 46, 52, 58, 70, 74, 79 y 89 de SEQ ID NO: 34. En la realización más preferida, se determina el estado de metilación de todas las posiciones de citosina mencionadas anteriormente en SEQ ID NO: 32 y/o 34.

La fuente de la muestra de prueba preferiblemente plasma, o combinaciones de la misma.

Específicamente, la presente invención proporciona un procedimiento para determinar el pronóstico de un sujeto que tiene cáncer adecuado para uso en una herramienta de pronóstico, que comprende: obtener una muestra de sangre que comprende ácido(s) nucleico(s) genómico(s); poner en contacto el (los) ácido(s) nucleico(s), o un fragmento del mismo, con un reactivo o una pluralidad de reactivos suficientes para distinguir entre secuencias de dinucleótidos CpG metiladas y no metiladas dentro de una secuencia objetivo del ácido nucleico sujeto, donde la secuencia objetivo comprende o hibrida en condiciones rigurosas para, una secuencia que comprende al menos 16, al menos 25 o al menos 50 nucleótidos contiguos del gen, dichos nucleótidos contiguos que comprenden al menos una secuencia de dinucleótido CpG; y determinar, basándose al menos en parte en dicha distinción, el estado de metilación de al menos una secuencia de dinucleótidos CpG objetivo, o un promedio, o un valor que refleja un estado de metilación promedio de una pluralidad de secuencias de dinucleótidos CpG objetivo.

Para distinguir entre secuencias de dinucleótidos CpG metiladas y no metiladas dentro de la secuencia objetivo comprende la conversión dependiente del estado de metilación o la no conversión de al menos una secuencia de dinucleótidos CpG a la correspondiente secuencia de dinucleótidos convertida o no convertida dentro de una secuencia seleccionada del grupo que consiste de cadenas de sentido y anticodificantes convertidas en bisulfito de los genes y regiones contiguas de las mismas correspondientes a la secuencia objetivo.

Las realizaciones adicionales proporcionan un procedimiento para la determinación del pronóstico de un sujeto que tiene cáncer que comprende: obtener una muestra de sangre que tiene ADN genómico objeto; extraer el ADN genómico; tratar el ADN genómico, o un fragmento del mismo, con uno o más reactivos para convertir las bases de citosina no metiladas en la posición 5 a uracilo o en otra base que sea detectablemente diferente de la citosina en términos de propiedades de hibridación; poner en contacto el ADN genómico tratado, o el fragmento tratado del mismo, con una enzima de amplificación y al menos dos cebadores que comprenden, en cada caso, una secuencia contigua de al menos 9 nucleótidos de longitud que es complementaria o hibrida en condiciones moderadamente rigurosas o rigurosas a secuencia seleccionada del grupo que consiste en cadenas codificantes y anticodificantes convertidas a bisulfito, y complementos de las mismas, en donde el ADN tratado o el fragmento del mismo se amplifica para producir un amplificado, o no se amplifica; y determinar, basándose en una presencia, ausencia o clase de, o en una propiedad de dicho amplificado, el estado de metilación o un promedio, o un valor que refleja un promedio del nivel de metilación de al menos uno, pero más preferiblemente una pluralidad de dinucleótidos CpG de las secuencias genómicas.

Los procedimientos descritos aquí comprenden el uso de al menos un procedimiento seleccionado del grupo que consiste en: i) hibridar al menos una molécula de ácido nucleico que comprende una secuencia contigua al menos 9, al menos 25 o al menos 50 nucleótidos de longitud que es complementaria de, o hibrida en condiciones moderadamente rigurosas o rigurosas con una secuencia seleccionada del grupo que consiste en cadenas codificantes o anticodificantes convertidas a bisulfito, y sus complementos; ii) hibridar al menos una molécula de ácido nucleico, unida a una fase sólida, que comprende una secuencia contigua de al menos 9 nucleótidos al menos 25 o al menos 50 de longitud que es complementaria o hibrida en condiciones moderadamente rigurosas o rigurosas con una secuencia seleccionada del grupo que consiste en cadenas de sentido codificantes y anticodificantes convertidas a bisulfito y sus complementos; iii) hibridar al menos una molécula de ácido nucleico que comprende una secuencia contigua al menos 9, al menos 25 o al menos 50 nucleótidos de longitud que es complementaria o hibrida en condiciones moderadamente rigurosas o rigurosas con una secuencia seleccionada del grupo que consiste de cadenas codificantes y anticodificantes convertidas a bisulfito, y complementos de las mismas, y que extienden al menos una molécula de ácido nucleico hibridada de este tipo por al menos una base de nucleótidos; y iv) secuencia del amplificado.

Realizaciones adicionales proporcionan un procedimiento para el análisis (es decir, determinar la progresión de la enfermedad y/o el pronóstico del paciente) de un cáncer, que comprende: obtener una muestra de sangre que tiene ADN genómico objeto; extraer el ADN genómico; poner en contacto el ADN genómico, o un fragmento del mismo, que comprende una o más secuencias seleccionadas del grupo que consiste en las secuencias genómicas o una secuencia que hibrida en condiciones rigurosas a esta, con una o más enzimas de restricción sensibles a la metilación, en donde el ADN genómico se digiere de ese modo para producir fragmentos de digestión, o no se digiere de ese modo; y determinar, basándose en una presencia, ausencia o clase de, o en la propiedad de al menos uno de dichos fragmentos, el estado de metilación de al menos una secuencia de dinucleótidos CpG de las secuencias genómicas o un promedio, o un valor que refleja un estado de metilación promedio de una pluralidad de secuencias de dinucleótidos CpG de los mismos. El ADN genómico digerido o no digerido puede amplificarse antes de dicha determinación.

Las realizaciones adicionales proporcionan nuevas secuencias genómicas y químicamente modificadas de ácidos nucleicos, así como oligonucleótidos y/u oligómeros de PNA para el análisis de patrones de metilación de citosina dentro de las secuencias genómicas.

BREVE DESCRIPCIÓN DE LOS DIBUJOS

Las Figuras 1-4 muestran diagramas de caja de las relaciones de ADN Sept9 post/pre cirugía (ADN Sept9 pg metilado post cirugía dividido ADN Sept9 pg metilado precirugía) en pacientes con cáncer colorrectal clasificados por estadio de cáncer (eje x). Las proporciones solo se representaron para los pacientes que muestran niveles de ADN Septin9 > 0 precirugía. Los cuatro números en la parte superior de la gráfica son valores p de pruebas t unilaterales usando

niveles post versus precirugía emparejados por pacientes. En la Fig. 1 y 3 Estadio I: línea punteada y círculos, Estadio II: línea punteada y triángulo, Estadio III: línea discontinua/punteada y cruces y Estadio IV: línea cerrada y rombos.

5 Las Figuras 5 y 6 muestran los niveles de ADN de Septin9 (eje y: \log_{10} de ADN Sept9 pg metilado) en pacientes con cáncer colorrectal pre y poscirugía (eje x). Los diferentes estadios del cáncer se visualizaron de la siguiente manera. Figura 5: Estadio I (4 pacientes): línea punteada y círculos; Estadio II (9 pacientes): línea punteada y triángulo; Estadio III (4 pacientes): línea discontinua/punteada y cruces; Estadio IV (2 pacientes): línea cerrada y rombo.

10 Las Figuras 7 y 8 muestran diagramas de cajas de relaciones de ADN RASSF2A post/precirugía (ADN Sept9 pg metilado poscirugía de pg metilado dividido ADN RASSF2A pg metilado precirugía) en pacientes con cáncer colorrectal clasificados por estadio de cáncer (eje x). Las proporciones solo se representaron para los pacientes que muestran niveles de ADN RASSF2A > 0 precirugía. Los cuatro números en la parte superior de la gráfica son valores p de pruebas t pareadas unilaterales usando niveles post versus precirugía emparejados por pacientes. Figura 5: Estadio I (4 pacientes): línea punteada y círculos; Estadio II (9 pacientes): línea discontinua y triángulo; Estadio III (4 pacientes): línea discontinua/punteada y cruces; Estadio IV (2 pacientes): línea cerrada y rombos.

20 Las Figuras 9-12 muestran los niveles de ADN de RASSF2A metilado (eje y: \log_{10} ADN de RASSF2A pg metilado) en pacientes con cáncer colorrectal pre y poscirugía (como se indica en el eje x). Los diferentes estadios del cáncer se visualizaron de la siguiente manera. Estadio I (4 pacientes): línea punteada y círculos; Estadio II (9 pacientes): línea punteada y triángulo; Estadio III (4 pacientes): línea discontinua/punteada y cruces; Estadio IV (2 pacientes): línea cerrada y rombo.

25 La Figura 13 muestra la ubicación del gen SEPT9 dentro del genoma humano en el cromosoma 17q 25 (Ensembl Jul 2005). Flechas que indican la ubicación de SEQ ID NO: 2 y 3.

La Figura 14 muestra el análisis cuantitativo de la metilación de Septin9 en plasma pre y poscirugía de pacientes con CCR.

30 La Figura 15 muestra el análisis cuantitativo de la metilación de RASSF2A en plasma pre y poscirugía de pacientes con CCR.

DESCRIPCIÓN DETALLADA DE LA INVENCION

Definiciones:

35 El término "relación observada/esperada" ("relación O/E") se refiere a la frecuencia de los dinucleótidos CpG dentro de una secuencia de ADN particular, y corresponde al $[\text{número de sitios CpG}/(\text{número de bases C} \times \text{número de bases G})]/\text{longitud de banda para cada fragmento}$.

40 El término "isla CpG" se refiere a una región contigua de ADN genómico que satisface los criterios de (1) que tiene una frecuencia de dinucleótidos CpG que corresponde a una "relación observada/esperada" >0,6, y (2) que tiene un "contenido GC" >0.5. Las islas CpG son típicamente, pero no siempre, entre aproximadamente 0,2 a aproximadamente 1 KB, o aproximadamente 2 kb de longitud.

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

50 El término "hemi-metilación" o "hemimetilación" se refiere al estado de metilación de un ADN bicatenario en el que solo una cadena del mismo está metilada.

55 El término "AUC" como se usa en el presente documento es una abreviatura para el área bajo una curva. En particular, se refiere al área bajo una curva característica operativa del receptor (ROC). La curva ROC es un gráfico de la tasa positiva verdadera contra la tasa positiva falsa para los diferentes puntos de corte posibles de una prueba de diagnóstico. Muestra la compensación entre sensibilidad y especificidad según el punto de corte seleccionado (cualquier aumento en la sensibilidad irá acompañado de una disminución de la especificidad). El área bajo una curva ROC (AUC) es una medida para la precisión de una prueba (cuanto mayor sea el área, mejor, óptimo es 1, una prueba aleatoria tendría una curva ROC en la diagonal con un área de 0.5; para referencia: J.P. Egan. Signal Detection Theory and ROC Analysis, Academic Press, New York, 1975).

60 El término "micromatriz" se refiere ampliamente tanto a "micromatriz de ADN" y "chip(s) de ADN", como se reconoce en la técnica, abarca todos los soportes sólidos reconocidos en la técnica, y abarca todos los procedimientos para fijar moléculas de ácido nucleico a este o síntesis de ácidos nucleicos sobre el mismo.

65

Los “parámetros genéticos” son mutaciones y polimorfismos de genes y secuencias que además se requieren para su regulación. Para designarse como mutaciones se encuentran, en particular, inserciones, supresiones, mutaciones puntuales, inversiones y polimorfismos y, particularmente preferidos, SNP (polimorfismos de un solo nucleótido).

5 Los “parámetros epigenéticos” son, en particular, metilación de citosina. Otros parámetros epigenéticos incluyen, por ejemplo, la acetilación de histonas que, sin embargo, no pueden analizarse directamente usando el procedimiento descrito pero que, a su vez, se correlacionan con la metilación del ADN.

10 El término “reactivo de bisulfito” se refiere a un reactivo que comprende bisulfito, bisulfito, hidrogenosulfito o combinaciones de los mismos, útil como se describe en el presente documento para distinguir entre secuencias de dinucleótidos CpG metiladas y no metiladas.

15 El término “ensayo de metilación” se refiere a cualquier ensayo para determinar el estado de metilación de una o más secuencias de dinucleótidos CpG dentro de una secuencia de ADN.

20 El término “MS.AP-PCR” (Reacción en Cadena de la Polimerasa Cebada Arbitrariamente sensible a Metilación) se refiere a la tecnología reconocida en la técnica que permite un escaneo global del genoma usando cebadores ricos en CG para enfocarse en las regiones que más probablemente contengan dinucleótidos CpG, y se describe por Gonzalzo et al., Cancer Research 57: 594-599, 1997.

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

25 El término ensayo “HeavyMethyl™”, en la realización del mismo implementado en la presente memoria, se refiere a un ensayo en el que las sondas de bloqueo específicas de metilación (también denominadas bloqueadores) que cubren posiciones CpG entre, o cubiertas por los cebadores de amplificación permiten la amplificación selectiva de metilación específica de una muestra de ácido nucleico.

30 El término ensayo “HeavyMethyl™ MethyLight™”, en la realización del mismo implementado en la presente memoria, se refiere a un ensayo HeavyMethyl™ MethyLight™, que es una variación del ensayo MethyLight™, en el que el ensayo MethyLight™ se combina con sondas de bloqueo específicas de metilación que cubren posiciones CpG entre los cebadores de amplificación.

35 El término “Ms-SNuPE” (extensión de cebador de nucleótido único sensible a la metilación) se refiere al ensayo reconocido en la técnica descrito por Gonzalzo & Jones, Nucleic Acids Res. 25:2529- 2531, 1997.

El término “MSP” (PCR específico de metilación) se refiere al ensayo de metilación reconocido en la técnica descrito por Herman et al. Proc. Natl. Acad. Sci. USA 93: 9821-9826, 1996, y por la Patente de Estados Unidos No. 5,786,146.

40 El término “COBRA” (Análisis de restricción de bisulfito combinado) se refiere al ensayo de metilación reconocido en la técnica descrito por Xiong & Laird, Nucleic Acids Res. 25:2532-2534, 1997.

45 El término “MCA” (amplificación de isla CpG metilada) se refiere al ensayo de metilación descrito por Toyota et al., Cancer Res. 59: 2307-12, 1999, y en el documento WO 00/26401 A1.

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

50 “Condiciones de hibridación rigurosas”, como se define aquí, implican hibridación a 68°C en 5x SSC/5x solución de Denhardt/1.0% SDS, y lavado en 0.2 x SSC/0.1% SDS a temperatura ambiente, o implica el equivalente reconocido en la técnica del mismo (por ejemplo, condiciones en las que se lleva a cabo una hibridación a 60°C en 2,5 x tampón SSC, seguido de varias etapas de lavado a 37°C en una baja concentración de tampón, y permanece estable). Las condiciones moderadamente rigurosas, tal como se definen en el presente documento, implican incluir lavado en 3x SSC a 42°C, o el equivalente reconocido en la técnica del mismo. Los parámetros de concentración de sal y temperatura pueden variarse para alcanzar el nivel óptimo de identidad entre la sonda y el ácido nucleico objetivo. La orientación con respecto a tales condiciones está disponible en la técnica, por ejemplo, por Sambrook et al., 1989, Molecular Cloning, A Laborator y Manual, Cold Spring Harbor Press, N.Y.; y Ausubel et al. (eds.), 1995, Current Protocols in Molecular Biology, (John Wiley & Sons, N.Y.) en la Unidad 2.10.

60 Los términos “enzimas de restricción específicas de metilación” o “enzimas de restricción sensibles a la metilación” deben entenderse como una enzima que digiere selectivamente un ácido nucleico dependiente del estado de metilación de su sitio de reconocimiento. En el caso de tales enzimas de restricción que cortan específicamente si el sitio de reconocimiento no está metilado o hemimetilado, el corte no tendrá lugar, o con una eficacia significativamente reducida, si el sitio de reconocimiento está metilado. En el caso de tales enzimas de restricción que cortan específicamente si el sitio de reconocimiento está metilado, el corte no tendrá lugar, o con una eficacia

significativamente reducida si el sitio de reconocimiento no está metilado. Se prefieren las enzimas de restricción específicas de metilación, cuya secuencia de reconocimiento contiene un dinucleótido CG (por ejemplo, cgcg o cccggg). Se prefieren adicionalmente para algunas realizaciones enzimas de restricción que no se cortan si la citosina en este dinucleótido está metilada en el átomo de carbono C5.

5 Las “enzimas de restricción específicas sin metilación” o las “enzimas de restricción no sensibles a la metilación” son enzimas de restricción que cortan una secuencia de ácido nucleico independientemente del estado de metilación con una eficacia casi idéntica. También se les llama “enzimas de restricción inespecíficas de metilación”. “

10 En referencia a secuencias de matriz compuestas, la frase “nucleótidos contiguos” se refiere a una región de secuencia contigua de cualquier secuencia contigua individual del arreglo compuesto, pero no incluye una región de la secuencia del arreglo compuesto que incluye un “nodo”, como se define en este documento arriba.

15 La descripción de un biomarcador que está metilado en cáncer, pero no metilado en tejido no canceroso como un indicador de pronóstico de cáncer se tomará para incluir todas las variantes de transcripción de los mismos y todos los promotores y elementos reguladores de los mismos. Además, como se conoce una pluralidad de SNP dentro del biomarcador o gen, se tomará el término para incluir todas las variantes de secuencia del mismo.

20 Vista general:

La presente invención proporciona un procedimiento para determinar el pronóstico de un sujeto que tiene cáncer, que comprende determinar los niveles de metilación y/o expresión de al menos un biomarcador que está metilado en cáncer, pero no metilado en tejido no canceroso en una muestra de sangre aislada de dicho sujeto en el que la metilación y/o el estado de expresión es indicativo del pronóstico de dicho sujeto que tiene cáncer.

25 Los procedimientos para determinar el pronóstico y, por lo tanto, los procedimientos y agentes para el tratamiento de un paciente con cáncer incluyen la estadificación del tumor según diversos criterios. A menudo, esta determinación incluye procedimientos invasivos para observar los cambios histológicos en la morfología del tejido y el nivel de invasión del tumor en el tejido vecino y la metástasis. Se utilizan varios procedimientos para la estadificación o clasificación del cáncer para evaluar la progresión o el estadio del cáncer utilizando criterios de clasificación estándar.

30 En el cáncer colorrectal, dos de estos procedimientos de la estadificación son la estadificación Tumor-No de-Metástasis (TNM) (estadios I-IV) desarrollada por el American Joint Committee on Cancer (AJCC Cancer Staging Manual, 6ta edición, Springer-Verlag, New York, 2002), incorporado aquí como referencia, y el sistema de estadificación de Duke o Astler-Coller modificado (estadios AD) (Astler V B, Coller F A., Ann Surg 1954; 139: 846-52). Ambos procedimientos relacionan las medidas de la diseminación del tumor primario a través de capas de colon o pared rectal con los órganos adyacentes, los ganglios linfáticos y los sitios distantes para evaluar la progresión del tumor. Las estimaciones del riesgo de recurrencia y las decisiones de tratamiento en el cáncer de colon actualmente se basan principalmente en la estadificación del tumor.

35 Se divulgan procedimientos y kits para determinar el pronóstico de un sujeto con cáncer de colon o colorrectal, determinar el tratamiento médico para un sujeto con cáncer de colon o colorrectal, determinar si un tumor de un sujeto con cáncer de colon o colorrectal indica que el tumor es agresivo o tiene potencial metastásico o indica un tiempo de supervivencia reducido para el sujeto, detectar una forma agresiva de cáncer en un sujeto, seleccionar un sujeto con cáncer de colon o colorrectal para el tratamiento del cáncer o determinar la carga tumoral o la carga del cáncer en un sujeto que comprende determinar los niveles de metilación y/o expresión de al menos un biomarcador metilado en cáncer pero no metilado en tejido no canceroso en una muestra de sangre aislada de dicho sujeto en el que la metilación y/o el estado de expresión es indicativo del pronóstico de dicho sujeto que tiene cáncer. Los procedimientos comprenden extraer o aislar de otro modo el ADN genómico o fragmento del mismo de las muestras de sangre; tratar el ADN genómico extraído o aislado o uno de sus fragmentos con uno o más reactivos para convertir las bases de citosina que no están metiladas en su posición en 5 en uracilo o en otra base que sea detectablemente diferente de la citosina en términos de propiedades de hibridación; poner en contacto el ADN genómico tratado o fragmento tratado, con una enzima de amplificación y al menos un cebador que comprende, una secuencia contigua de al menos 9, al menos 18, al menos 25 o al menos 50 nucleótidos que es complementaria o hibrida bajo condiciones moderadamente estrictas o condiciones rigurosas para una secuencia tratada o un complemento de la misma, en donde el ADN genómico tratado o el fragmento del mismo se amplifica para producir al menos un amplificado, o no se amplifica; y determinar, basándose en la presencia, ausencia o cantidad de, o en una propiedad de dicho amplificado, el estado o nivel de metilación de al menos un dinucleótido CpG del gen, o un promedio, o un valor que refleje un estado o nivel de metilación promedio de una pluralidad de dinucleótidos CpG del gen.

60 Los procedimientos para tratar el ADN extraído, amplificar el ADN y detectar el ADN, y analizar el ADN se describen adicionalmente aquí.

65 La invención proporciona la detección en una muestra de sangre aislada de un sujeto con cáncer de colon o colorrectal de un biomarcador o gen que está metilado en cáncer, pero no metilado en tejido no canceroso, y el pronóstico

adicional, la determinación del resultado clínico o la determinación del tratamiento médico para el sujeto con cáncer de colon o colorrectal.

5 Preferiblemente, el procedimiento de la invención comprende las etapas de a) medir el nivel de ADN genómico metilado de SEPTIN9 (SEQ ID NO:1), o un fragmento del mismo, en una primera muestra de sangre obtenida de un sujeto que padece cáncer; b) medir el nivel de ADN genómico metilado del gen o un fragmento del mismo, en una muestra de sangre adicional obtenida del sujeto; y c) comparar los niveles medidos de ADN metilado en la muestra adicional y la primera muestra.

10 En una realización, la detección y el análisis se realizan en una muestra de pretratamiento y nuevamente en una muestra de tratamiento posterior, donde el tratamiento es cualquier tratamiento del paciente (o tejido del paciente) con un procedimiento o administración que disminuiría, eliminaría, encogería, minimizaría o extirparía el tumor. Dichos procedimientos incluyen, entre otros, resección quirúrgica, inmunoterapia, radioterapia, quimioterapia, terapias dirigidas a tumores sólidos, terapia con láser, terapias dirigidas a tejidos blandos y tratamientos para el cáncer de la sangre. En esta realización, la "muestra de pretratamiento" corresponde a la "primera muestra" y la "muestra de postratamiento" corresponde a la "muestra adicional"

20 La muestra de pretratamiento puede tomarse en cualquier momento antes de que comience el tratamiento. Sin embargo, preferiblemente se toma no más de 1 semana, no más de 2 semanas, no más de 4 semanas o no más de 8 semanas antes de que comience el tratamiento. La muestra posterior al tratamiento se toma preferiblemente en cualquier momento después de que comience el tratamiento. Si el tratamiento es quimioterapia, se prevé explícitamente que la muestra posterior al tratamiento se tome antes de que se complete el curso de tratamiento del paciente siempre que el paciente haya recibido al menos una dosis de al menos un compuesto farmacéutico utilizado para quimioterapia.

25 El tratamiento recomendado para el cáncer de colon depende de la estadificación del tumor. Los estadios I, II y III se caracterizan por la ausencia de metástasis a distancia. Por lo tanto, la resección quirúrgica del tumor es el tratamiento de elección. Para estadios II B, II C, III y alto riesgo II A se recomienda la quimioterapia adyuvante. Para tumores en estadio IV, la resección quirúrgica solo se recomienda si el número y la ubicación de metástasis a distancia indican la posibilidad de una curación completa mediante la eliminación de todos los tumores. En la enfermedad en estadio IV, la resección quirúrgica se acompaña de quimioterapia adyuvante y/o neoadyuvante.

35 En una realización preferida de la presente invención, el tumor es carcinoma de colon en estadio I, II o III. En este caso, un nivel del ADN genómico metilado en la muestra de tratamiento posterior que indica una eliminación completa del tumor, preferiblemente un nivel por debajo del límite de detección, indica que el tratamiento del cáncer mediante resección quirúrgica fue exitoso. Esto es equivalente a un buen pronóstico del paciente y quimioterapia adyuvante, ya que el tratamiento adicional es, preferiblemente, no recomendado.

40 En otra realización preferida de la presente invención, el tratamiento es la quimioterapia adyuvante o neoadyuvante de un tumor en estadio I, II o III o un tumor en estadio IV operable o quimioterapia sin cirugía adicional como tratamiento sistémico de un tumor en estadio IV no operable. En este caso, un nivel disminuido del ADN genómico metilado en la muestra posterior al tratamiento en comparación con la muestra de pretratamiento, preferiblemente, indica que el régimen de tratamiento quimioterapéutico seleccionado fue exitoso para reducir la carga tumoral del paciente. Esto es equivalente a la indicación de que el régimen de tratamiento quimioterapéutico no necesita ser adaptado. Sin embargo, si el nivel de la secuencia genómica metilada en la muestra posterior al tratamiento permanece constante o incluso aumenta, esto indica, preferiblemente, que el tratamiento actual no es exitoso y que el régimen de tratamiento debe adaptarse. En esta realización, se prefiere la toma de más de una muestra de postratamiento en diferentes puntos de tiempo durante la quimioterapia con el fin de determinar constantemente si el régimen de tratamiento quimioterapéutico es exitoso o no.

50 La invención proporciona un procedimiento de pronóstico de un sujeto con cáncer de colon o colorrectal que abarca la detección de las células tumorales cuando se ha eliminado el tumor primario, tal como mediante los procedimientos descritos anteriormente. Por lo tanto, la invención proporciona la determinación de si los procedimientos empleados para eliminar el tumor primario fueron exitosos y completos. Además, la invención proporciona procedimientos para determinar si el tumor se ha diseminado. Históricamente, los procedimientos para determinar si el tumor se había diseminado se basaban en procedimientos patológicos e histológicos para determinar la afectación y la metástasis de los ganglios linfáticos, como los procedimientos de estadificación del cáncer descritos anteriormente. Con la presente invención, parámetros tales como carga tumoral, carga de cáncer, diseminación tumoral y/o metástasis pueden determinarse tomando una primera muestra, a partir de la cual se evalúa el ADN genómico para determinar la presencia de SEPTIN9 (SEQ ID NO:1) que está metilado en cáncer, pero no metilado en tejido no canceroso, y tomando una segunda muestra, a partir de la cual se evalúa el ADN genómico para detectar la presencia de SEPTIN9 (SEQ ID NO:1) que está metilado en cáncer, pero no metilado en tejido no canceroso, y determinar si las células tumorales o cancerosas permanecen en el sujeto y, por lo tanto, indican una necesidad de tratamiento clínico.

65 En ciertas realizaciones, los procedimientos de detección se realizan cuantitativamente, cuantitativamente en parte, o cuantitativamente en parte y cualitativamente en parte.

En ciertas realizaciones, el gen adicional o biomarcador que está metilado en cáncer, pero no metilado en tejido no canceroso es RASSF2A.

5 El gen humano de Septin 9 (también conocido como proteína de fusión tipo MLL-septin, MLL-proteína de fusión tipo septin MSF-A, Slpa, Eseptin, Msf, proteína tipo septin del OvarioMama proteína similar a Septin (septin Ov/Br) y Septin D1) se encuentra en el cromosoma 17q25 dentro de contig AC068594.15.1.168501 y es un miembro de la familia de genes Septin. La Figura 13 proporciona la anotación de Ensembl del gen de Septin 9, y muestra 4 variantes de transcripción, las variantes de Septin 9 y las variantes de Q9HC74 (que son versiones truncadas de las transcripciones de Septin 9). La SEQ ID NO: 1 proporciona la secuencia de dicho gen, que comprende regiones tanto de los transcritos de Septin 9 y Q9HC74 como de las regiones promotoras. SEQ ID NO: 2 y SEQ ID NO: 3 son subregiones de las mismas que proporcionan la secuencia de regiones promotoras ricas en CpG de transcritos de Septin 9 y Q9HC74, respectivamente. SEQ ID NOs: 4 y 5, son secuencias para la cadena sensible al ADN de Septin 9 tratada químicamente (con bisulfito) y la cadena anticodificantes, respectivamente, que corresponden a la secuencia de la SEQ ID NO: 1 (es decir, donde los dinucleótidos CpG son metilados), como se muestra en la Tabla 1. SEQ ID NOs: 10 y 11, son secuencias para la cadena codificantes de ADN de Septin 9 tratada químicamente (bisulfito) y la cadena anticodificantes, respectivamente, que corresponden a la secuencia de SEQ ID NO: 1 (es decir, donde los dinucleótidos CpG son no metilados), como se muestra en la Tabla 1. SEQ ID NOs: 6 y 7 son secuencias para la cadena sensible al ADN de Septin 9 tratada químicamente (con bisulfito) y la cadena anticodificantes, respectivamente, que corresponden a la SEQ ID NO: 2 (es decir, donde los dinucleótidos CpG están metilados), como se muestra en la Tabla 1. SEQ ID NOs: 12 y 13 son secuencias para la cadena codificantes de ADN de Septin 9 tratada químicamente (bisulfito) y cadena anticodificantes, respectivamente, que corresponden a la SEQ ID NO: 2 (es decir, donde los dinucleótidos CpG no están metilados) como se muestra en la Tabla 1. SEQ ID NOs: 8 y 9, son secuencias para la cadena codificantes de ADN Q9HC74 tratada químicamente (bisulfito) y la cadena anticodificantes, respectivamente, que corresponden a la secuencia de SEQ ID NO: 3 (es decir, donde los dinucleótidos CpG están metilados), como se muestra en la Tabla 1. SEQ ID NOs: 14 y 15, son secuencias para la cadena codificantes de ADN de Septin 9 tratada químicamente (bisulfito) y la cadena anticodificantes, respectivamente, que corresponden a la secuencia de SEQ ID NO: 3 (es decir, donde los dinucleótidos CpG son no metilados), como se muestra en la Tabla 1. Septin9 y estas variantes también se han descrito en la Solicitud de Patente de EE. UU. Publicada No: US-2009-0075260, publicada como Patente de Estados Unidos N°: 7,951,563; solicitud de patente estadounidense publicada No.: 2006-0286576, publicada como patente de los Estados Unidos No.: 7,749,702; y en la Solicitud de Patente de Estados Unidos publicada No.: US-2011-0039719, como descripción del gen SEPTIN9 y la información de secuencia. Secuencias adicionales relacionadas con el gen Septin9 se describen en los ejemplos y la descripción de este documento.

35 En ciertas realizaciones, el gen o biomarcador que está metilado en cáncer, pero no metilado en tejido no canceroso es RASSF2A (SEQ ID NO: 16). El gen RASSF2 se encuentra en la ubicación cromosómica 20p13 y codifica múltiples isoformas de transcripción de ARNm. Los miembros de la familia de la proteína Ras están asociados con el cáncer, RASSF2 se une a K-Ras y la expresión de RASSF2 se asocia con un crecimiento celular controlado. La pérdida de expresión da como resultado la proliferación celular no inhibida y, por consiguiente, RASSF2 es un gen supresor de tumores (Vos et al. J. Biol. Chem., Vol. 278, Número 30, 28045-28051, jul. 25, 2003). El gen RASSF2 comprende una región densa CpG en el promotor del gen, que abarca los primeros 2 exones no codificantes. Esta región se ha caracterizado por ser cometilada, y, además, la metilación de la misma se ha asociado con el desarrollo de carcinomas gástricos y de colon. Hesson et al. (Oncogene 2005 jun. 2; 24(24): 3987-94) caracterizaron la isla CpG como cometilada, por medio de análisis COBRA y secuenciación de bisulfito de líneas celulares de cáncer de colon. Además, confirmaron mediante análisis MSP que 21/30 (70%) de las líneas celulares de cáncer de colon analizadas se metilaron dentro de la región promotora RASSF2A. La investigación adicional ha indicado que la metilación de RASSF2 puede estar asociada con el cáncer gástrico (Endoh et al., Br J. Cancer. 2005 12 de diciembre; 93(12): 1395-9) y cáncer nasofaríngeo (Zhang et al. J. Cancer. 2007 1 de enero; 120(I): 32-8). SEQ ID NO: 16 proporciona la secuencia de RASSF2A. SEQ ID NOs: 17 y 18, son secuencias para la cadena codificantes de ADN RASSF2A tratada químicamente (bisulfito) y la cadena anticodificantes, respectivamente, que corresponden a SEQ ID NO: 16 (es decir, donde los dinucleótidos CpG están metilados) como se muestra en la Tabla 1. SEQ ID NOs: 19 y 20 son secuencias para la cadena codificantes de ADN de RASSF2A tratada químicamente (bisulfito) y cadena anticodificantes, respectivamente, que corresponden a la secuencia de SEQ ID NO: 16 (es decir, donde los dinucleótidos CpG no están metilados) como se muestra en la Tabla 1. La secuencia del gen genómico completo se muestra en SEQ ID NO: 16, que se ha descrito en la Solicitud de Patente de EE. UU. Publicada: US-2010-0092953, como referencia para la descripción del gen RASSF2A y la información de secuencia.

60 Usando los procedimientos de la invención, la presencia, determinada cuantitativamente, cuantitativamente en parte, cualitativa, cualitativamente en parte, o cuantitativamente en parte y cualitativamente en parte del gen o biomarcador en la muestra posterior al tratamiento en un sujeto en estadio I o II, indica un mal pronóstico o necesidad de un tratamiento de cáncer más agresivo.

65 Usando los procedimientos de la invención, un nivel equivalente o superior del gen o biomarcador en la muestra posterior al tratamiento en un sujeto en estadio III indica la necesidad de una monitorización continua usando los procedimientos descritos en este documento para ver si hay una tendencia del nivel de la gen o biomarcador para aumentar.

Los procedimientos de la invención proporcionan no solo para detectar un cambio en el nivel del gen o biomarcador en la muestra posterior al tratamiento, sino también para el control o la vigilancia continua de la respuesta al tratamiento o la eficacia del no tratamiento del sujeto y puede ser utilizado para determinar si el cáncer o tumor está en remisión o recurrencia.

La modificación del ADN con bisulfito es una herramienta reconocida en el arte que se utiliza para evaluar el estado de metilación de CpG. El procedimiento más frecuentemente utilizado para analizar el ADN para la presencia de 5-metilcitosina se basa en la reacción de bisulfito con citosina por lo que, tras la hidrólisis alcalina subsiguiente, la citosina se convierte en uracilo que corresponde a la timina en su comportamiento de emparejamiento de bases. Significativamente, sin embargo, la 5-metilcitosina permanece sin modificar bajo estas condiciones. En consecuencia, el ADN original se convierte de tal manera que la metilcitosina, que originalmente no podía distinguirse de la citosina por su comportamiento de hibridación, ahora se puede detectar como la única citosina restante usando técnicas biológicas moleculares estándar reconocidas en la técnica, por ejemplo, mediante amplificación e hibridación, o mediante secuenciación. Todas estas técnicas se basan en propiedades de emparejamiento de bases diferenciales, que ahora se pueden explotar completamente.

Una descripción de los procedimientos reconocidos en la técnica para detectar 5-metilcitosina es proporcionada por Rein, T., et al., *Nucleic Acids Res.*, 26: 2255, 1998.

La técnica de bisulfito, con algunas excepciones (por ejemplo, Zeschng M, et al, *Eur J Hum Genet.* 5: 94-98, 1997), actualmente solo se usa en investigación. En general, se amplifican fragmentos específicos cortos de un gen conocido después de un tratamiento con bisulfito, y se secuencian completamente (Olek y Walter, *Nat Genet.* 1997 17: 275-6, 1997), se someten a una o más reacciones de extensión de cebador (Gonzalzo & Jones, *Nucleic Acids Res.*, 25: 2529-31, 1997; documento WO 95/00669; patente de los Estados Unidos No. 6,251,594) para analizar posiciones de citosina individuales, o tratadas mediante digestión enzimática (Xiong & Laird, *Nucleic Acids Res.*, 25: 2532-4, 1997). La detección por hibridación también se ha descrito en la técnica (Olek et al., Documento WO 99/28498). Además, se ha descrito el uso de la técnica de bisulfito para la detección de la metilación con respecto a genes individuales (Grigg & Clark, *Bioessays*, 16: 431-6, 1994; Zeschng M, et al., *Hum Mol Genet.*, 6: 387-95, 1997; Feil R., et al *Nucleic Acids Res.*, 22: 695 -, 1994; Martin V., et al., *Gene*, 157: 261-4, 1995, WO 9746705 y WO 9515373).

Se divulga el uso de la técnica de bisulfito, en combinación con uno o más ensayos de metilación, para la determinación del estado de metilación de secuencias de dinucleótidos CpG dentro de las secuencias genómicas. Los dinucleótidos CpG genómicos pueden estar metilados o no metilados (alternativamente conocidos como metilados ascendente y descendente respectivamente). Sin embargo, los procedimientos de la presente invención son adecuados para el análisis de muestras de sangre de naturaleza heterogénea, por ejemplo, una baja concentración de células tumorales dentro de un fondo de sangre o eyaculación. Por consiguiente, cuando se analiza el estado de metilación de una posición CpG dentro de tal muestra, la persona experta en la técnica puede usar un ensayo cuantitativo para determinar el nivel (por ejemplo, porcentaje, fracción, proporción, proporción o grado) de metilación en una posición CpG particular opuesta a un estado de metilación. En consecuencia, el término estado de metilación o estado de metilación también debe tomarse para indicar un valor que refleja el grado de metilación en una posición CpG.

A menos que se indique específicamente, los términos "hipermetilado" o "metilado hacia arriba" se tomarán para significar un nivel de metilación superior al de un punto de corte específico, donde dicho punto de corte puede ser un valor que representa el nivel medio o medio de metilación para una población determinada, o es preferiblemente un nivel de corte optimizado. El "corte" también se denomina aquí "umbral". En el contexto de la presente invención, los términos "metilado", "hipermetilado" o "metilado hacia arriba" se tomarán para incluir un nivel de metilación por encima del punto de corte cero (0)% (o equivalentes del mismo) de metilación para todas las posiciones CpG dentro y asociado con (por ejemplo, en regiones promotoras o reguladoras) al menos un gen o secuencia genómica que está metilada en cáncer, pero no metilada en tejido no canceroso.

De acuerdo con la presente invención, la determinación del estado de metilación de las secuencias de dinucleótidos CpG dentro de las secuencias genómicas tiene utilidad en la determinación del pronóstico de un sujeto que tiene cáncer.

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

Por ejemplo, la secuenciación genómica se ha simplificado para el análisis de los patrones de metilación del ADN y la distribución de 5-metilcitosina mediante el uso de tratamiento con bisulfito (Frommer et al, *Proc. Natl. Acad. Sci. USA* 89: 1827-1831, 1992). Adicionalmente, se usa la digestión con enzimas de restricción de productos de PCR amplificados a partir de ADN convertido con bisulfito, por ejemplo, el procedimiento descrito por Sadri & Hornsby (*Nucl.*

Acids Res. 24: 5058-5059, 1996), o COBRA (Análisis de restricción de bisulfito combinado) (Xiong & Laird, Nucleic Acids Res. 25: 2532-2534, 1997).

5 COBRA. El análisis COBRA™ es un ensayo de metilación cuantitativa útil para determinar los niveles de metilación del ADN en los locus génicos específicos en pequeñas cantidades de ADN genómico (Xiong & Laird, Nucleic Acids Res. 25: 2532-2534, 1997). Brevemente, la digestión con enzimas de restricción se usa para revelar diferencias de secuencias dependientes de la metilación en productos de PCR de ADN tratado con bisulfito de sodio. Las diferencias de secuencia dependientes de metilación se introducen primero en el ADN genómico mediante tratamiento con bisulfito estándar de acuerdo con el procedimiento descrito por Frommer et al. (Proc. Natl. Acad. Sci. USA 89: 1827-1831, 1992). La amplificación por PCR del ADN convertido con bisulfito se realiza luego usando cebadores específicos para las islas CpG de interés, seguido de digestión con endonucleasa de restricción, electroforesis en gel y detección usando sondas de hibridación marcadas específicas. Los niveles de metilación en la muestra de ADN original están representados por las cantidades relativas de producto de PCR digerido y no digerido de forma linealmente cuantitativa en un amplio espectro de niveles de metilación de ADN. Además, esta técnica se puede aplicar de manera fiable al ADN obtenido a partir de muestras de tejido embebidas en parafina microdisseccionadas.

Los reactivos típicos (por ejemplo, como podría encontrarse en un kit típico basado en COBRA™) para el análisis COBRA™ pueden incluir, pero no se limitan a: cebadores de PCR para gen específico (o secuencia de ADN tratada con bisulfito o isla CpG); enzima de restricción y tampón apropiado; oligonucleótido de hibridación genética; controlar el oligonucleótido de hibridación; kit de marcaje de quinasas para sonda de oligonucleótidos; y nucleótidos marcados. Además, los reactivos de conversión de bisulfito pueden incluir: tampón de desnaturalización de ADN; tampón de sulfonación; Reactivos o kits de recuperación de ADN (por ejemplo, Precipitación, ultrafiltración, columna de afinidad); tampón de desulfonación; y componentes de recuperación de ADN.

25 Preferiblemente, ensayos tales como "MethyLight™" (una técnica de PCR en tiempo real basada en fluorescencia) (Eads., et al Cancer Res. 59: 2302-2306, 1999), Ms-SNuPE™ (extensión de iniciador de nucleótido único sensible a la metilación) (Gonzalzo & Jones, Nucleic Acids Res. 25: 2529-2531, 1997), PCR específica de metilación ("MSP"; Herman) et al, Proc. Natl. Acad. Sci. USA 93: 9821-9826, 1996; Patente de los Estados Unidos No. 5,786,146) y amplificación de isla CpG metilada ("MCA"; Toyota et al, Cancer Res. 59: 2307-12, 1999) se usan solos o en combinación con otros de estos procedimientos.

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

El término ensayo "HeavyMethyl™ MethyLight™", en la realización del mismo implementado en la presente memoria, se refiere a un ensayo HeavyMethyl™ MethyLight™, que es una variación del ensayo MethyLight™, en el que el ensayo MethyLight™ se combina con sondas de bloqueo específicas de metilación que cubren posiciones CpG entre los cebadores de amplificación. El ensayo HeavyMethyl™ también puede usarse en combinación con cebadores de amplificación específicos de metilación.

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

50 MSP. La MSP (PCR específica de metilación) permite evaluar el estado de metilación de prácticamente cualquier grupo de sitios CpG dentro de una isla CpG, independientemente del uso de enzimas de restricción sensibles a la metilación (Herman et al., Proc. Natl. Acad. Sci. USA 93: 9821-9826, 1996; Patente de los Estados Unidos No. 5,786,146). Brevemente, el ADN se modifica mediante bisulfito sódico convirtiendo todas las citosinas que no están metiladas, pero no metiladas, en uracilo, y amplificándose posteriormente con cebadores específicos para ADN metilado frente a ADN no metilado. La MSP requiere solo pequeñas cantidades de ADN, es sensible a los alelos metilados al 0.1% de un locus de isla CpG dado, y puede realizarse en el ADN extraído de muestras incluidas en parafina. Los reactivos típicos (por ejemplo, como podría encontrarse en un kit típico basado en MSP) para el análisis de MSP pueden incluir, pero no están limitados a: cebadores de PCR metilados y no metilados para gen específico (o secuencia de ADN tratada con bisulfito o isla CpG), PCR optimizada tampones y desoxinucleótidos, y sondas específicas.

60 MethyLight™. El ensayo MethyLight™ es un ensayo de metilación cuantitativa de alto rendimiento que utiliza tecnología de PCR en tiempo real basada en fluorescencia (TaqMan™) que no requiere más manipulaciones después de la etapa de PCR (Eads et al, Cancer Res. 59: 2302-2306, 1999). Brevemente, el proceso de MethyLight™ comienza con una muestra mixta de ADN genómico que se convierte, en una reacción de bisulfito de sodio, en un conjunto mixto de diferencias de secuencia dependiente de metilación de acuerdo con procedimientos estándar (el proceso de bisulfito convierte residuos de citosina no metilados en uracilo). La PCR basada en fluorescencia se realiza entonces

en una reacción “sesgada” (con cebadores de PCR que se superponen a los conocidos dinucleótidos CpG). La discriminación de secuencia puede ocurrir tanto a nivel del proceso de amplificación como a nivel del proceso de detección de fluorescencia.

5 El ensayo MethyLight™ puede usarse como una prueba cuantitativa para los patrones de metilación en la muestra de ADN genómico, en el que la discriminación de la secuencia ocurre al nivel de la hibridación de la sonda. En esta versión cuantitativa, la reacción de PCR proporciona una amplificación específica de metilación en presencia de una sonda fluorescente que se solapa con un sitio de metilación putativo particular. Se proporciona un control imparcial para la cantidad de ADN de entrada mediante una reacción en la que ni los cebadores, ni la sonda se superponen a ningún dinucleótido CpG. Alternativamente, una prueba cualitativa para la metilación genómica se logra al sondear el grupo de PCR sesgado con oligonucleótidos de control que no “cubren” sitios de metilación conocidos (una versión basada en fluorescencia de las técnicas HeavyMethyl™ y MSP), o con oligonucleótidos que cubren sitios de metilación potencial.

15 El proceso MethyLight™ puede usarse con cualquier sonda adecuada, por ejemplo “TaqMan®”, Lightcycler®, etc. Por ejemplo, el ADN genómico bicatenario se trata con bisulfito sódico y se somete a uno de dos conjuntos de reacciones de PCR usando sondas TaqMan®; por ejemplo, con cebadores de MSP y/o oligonucleótidos bloqueadores de HeavyMethyl y sonda TaqMan®. La sonda TaqMan® tiene una etiqueta dual con moléculas fluorescentes “informadoras” y “silenciadoras”, y está diseñada para ser específica para una región de contenido de GC relativamente alta, de modo que se derrita a una temperatura superior a 10°C en el ciclo de PCR que los cebadores hacia adelante o inversos. Esto permite que la sonda TaqMan® permanezca completamente hibridada durante la etapa de hibridación/extensión de PCR. Como la polimerasa Taq sintetiza enzimáticamente una nueva cadena durante el PCR, eventualmente alcanzará la sonda TaqMan® hibridada. La actividad de la polimerasa Taq 5' a 3' endonucleasa desplazará la sonda TaqMan® digiriéndola para liberar la molécula informadora fluorescente para la detección cuantitativa de su señal ahora no apagada utilizando un sistema de detección fluorescente en tiempo real.

Los reactivos típicos (por ejemplo, como podría encontrarse en un kit típico basado en MethyLight™) para el análisis de MethyLight™ pueden incluir, pero no están limitados a: cebadores de PCR para gen específico (o secuencia de ADN tratada con bisulfito o isla CpG); Sondas TaqMan® o Lightcycler®; tampones de PCR optimizados y desoxinucleótidos; y polimerasa Taq.

El ensayo QM™ (metilación cuantitativa) es una prueba cuantitativa alternativa para patrones de metilación en muestras de ADN genómico, en el que la discriminación de la secuencia ocurre a nivel de la hibridación de la sonda. En esta versión cuantitativa, la reacción de PCR proporciona una amplificación no sesgada en presencia de una sonda fluorescente que se solapa con un sitio de metilación putativo particular. Se proporciona un control imparcial para la cantidad de ADN de entrada mediante una reacción en la que ni los cebadores, ni la sonda se superponen a ningún dinucleótido CpG. Alternativamente, una prueba cualitativa para la metilación genómica se logra probando el grupo de PCR sesgado con oligonucleótidos de control que no “cubren” sitios de metilación conocidos (una versión basada en fluorescencia de las técnicas HeavyMethyl™ y MSP), o con oligonucleótidos que cubren sitios de metilación potencial.

El proceso QM™ puede usarse con cualquier sonda adecuada, por ejemplo “TaqMan®”, Lightcycler® etc. en el proceso de amplificación. Por ejemplo, el ADN genómico bicatenario se trata con bisulfito sódico y se somete a cebadores no sesgados y a la sonda TaqMan®. La sonda TaqMan® tiene una etiqueta dual con moléculas fluorescentes “informadoras” y “silenciadoras”, y está diseñada para ser específica para una región de contenido de GC relativamente alta, de modo que se derrita a una temperatura superior a 10°C en el ciclo de PCR que los cebadores directos o inversos. Esto permite que la sonda TaqMan® permanezca completamente hibridada durante el paso de hibridación/extensión de PCR. Como la polimerasa Taq sintetiza enzimáticamente una nueva cadena durante la PCR, eventualmente alcanzará la sonda TaqMan® hibridada. La actividad de la polimerasa Taq 5' a 3' endonucleasa desplazará la sonda TaqMan® digiriéndola para liberar la molécula informadora fluorescente para la detección cuantitativa de su señal ahora no apagada utilizando un sistema de detección fluorescente en tiempo real.

Los reactivos típicos (por ejemplo, como podría encontrarse en un kit basado en QM™ típico) para análisis QM™ pueden incluir, pero no se limitan a: cebadores de PCR para gen específico (o secuencia de ADN tratada con bisulfito o isla CpG); Sondas TaqMan® o Lightcycler®; tampones de PCR optimizados y desoxinucleótidos; y polimerasa Taq.

Ms-SNuPE. La técnica Ms-SNuPE™ es un procedimiento cuantitativo para evaluar las diferencias de metilación en sitios CpG específicos basados en el tratamiento con bisulfito de ADN, seguido de la extensión de cebadores de un solo nucleótido (Gonzalvo & Jones, Nucleic Acids Res. 25: 2529-2531, 1997). Brevemente, el ADN genómico se hace reaccionar con bisulfito sódico para convertir la citosina no metilada en uracilo mientras deja inalterada la 5-metilcitosina. La amplificación de la secuencia objetivo deseada se realiza luego usando cebadores de PCR específicos para ADN convertido con bisulfito, y el producto resultante se aísla y se usa como molde para el análisis de metilación en el (los) sitio(s) CpG de interés. Se pueden analizar pequeñas cantidades de ADN (por ejemplo, Secciones de patología microdisectadas) y se evita la utilización de enzimas de restricción para determinar el estado de metilación en los sitios CpG.

65

Los reactivos típicos (por ejemplo, como podría encontrarse en un kit típico Ms-SNuPE™) para el análisis Ms-SNuPE™ pueden incluir, entre otros: cebadores de PCR para gen específico (o secuencia de ADN tratada con bisulfito o isla CpG); tampones de PCR optimizados y desoxinucleótidos; kit de extracción de gel; cebadores de control positivo; Cebadores Ms-SNuPE™ para gen específico; tampón de reacción (para la reacción Ms-SNuPE); y nucleótidos marcados. Además, los reactivos de conversión de bisulfito pueden incluir: tampón de desnaturalización de ADN; tampón de sulfonación; Reactivos o kit de recuperación de ADN (por ejemplo, precipitación, ultrafiltración, columna de afinidad); tampón de desulfonación; y componentes de recuperación de ADN.

Nueva utilidad para la detección de un biomarcador que está metilado en el cáncer, pero no metilado en el tejido no canceroso como un indicador pronóstico de cáncer/tumor en la sangre.

En un aspecto, el procedimiento de la invención comprende las siguientes etapas: i) determinar la metilación y/o expresión de al menos un gen o secuencia genómica que está metilada en tejido canceroso, pero no metilada en tejido no canceroso; y ii) determinar el pronóstico de un sujeto que tiene cáncer. En una realización, las etapas se llevan a cabo en tejido corporal o sangre. En una realización, el gen es SEPTIN9 (SEQ ID NOs: 1-15 y otras secuencias como se describe en este documento), cuya secuencia genómica no está metilada en tejido no canceroso y metilada en tejido canceroso. En otra realización, el gen es RASSF2A (SEQ ID NOs: 19-20, y otras secuencias como se describe en este documento), cuya secuencia genómica no está metilada en tejido no canceroso y metilada en tejido canceroso.

El procedimiento de la invención se puede habilitar por medio de cualquier análisis de la expresión de un ARN transcrito o polipéptido o proteína traducida a partir de dicho ARN, preferiblemente por medio de análisis de expresión de ARNm o análisis de expresión de polipéptido. Sin embargo, en la realización más preferida de la invención, la determinación del pronóstico de un sujeto que tiene cáncer se habilita por medio del análisis del estado de metilación de al menos un gen o secuencia genómica, y/o promotor o elementos reguladores de la genómica secuencia que no está metilada en tejido no canceroso y metilada en tejido canceroso. En otras realizaciones, la presente invención también proporciona ensayos y procedimientos de pronóstico, tanto cuantitativos como cualitativos para detectar la expresión de uno o más de los genes en un sujeto y determinar a partir de ellos el pronóstico de un sujeto que tiene cáncer en dicho sujeto. En otras realizaciones, la hipermetilación y/o la subexpresión de uno o más de los genes están asociadas con la progresión y la agresividad del cáncer.

En una realización preferida, la presencia de ADN de Septin9 metilado en una muestra antes de la cirugía por encima de 3 pg/ml es indicativa de la presencia de cáncer. Preferiblemente, después de la cirugía, una señal negativa de metilación de Septin9 es indicativa de buen pronóstico (0 pg/ml de Septin9 metilado). Preferiblemente después de la cirugía, la presencia de Septin9 metilado de la muestra de 0 a 3 pg/ml anterior indica un riesgo bajo para la recurrencia del cáncer. Preferiblemente después de la cirugía, un nivel de Septin9 metilado de 3 a 30 pg/ml de plasma es indicativo de un riesgo medio para la recurrencia del cáncer. Preferiblemente, después de la cirugía, la presencia de Septin9 metilado de la muestra anterior de 30 pg/ml indica un alto riesgo o recurrencia. En una realización preferida, la presencia de ADN de RASSF2A metilado en una muestra antes de la cirugía por encima de 3 pg/ml es indicativa de la presencia de cáncer. Preferiblemente, después de la cirugía, una señal de metilación RASSF2A negativa es indicativa de buen pronóstico (0 pg/ml de RASSF2A metilado). Preferiblemente después de la cirugía, la presencia de RASSF2A metilado de una muestra por encima de 0 a 3 pg/ml indica un riesgo bajo para la recurrencia del cáncer. Preferiblemente, después de la cirugía, un nivel de RASSF2A metilado de 3 a 30 pg/ml de plasma es indicativo de un riesgo medio para la recurrencia del cáncer. Preferiblemente, después de la cirugía, la presencia de RASSF2A metilado de una muestra superior a 30 pg/ml indica un alto riesgo o recurrencia. Las muestras preferidas son sangre, tejido tumoral y plasma. Preferiblemente, el cáncer es cáncer colorrectal.

Para detectar la presencia de ARNm que codifica un gen SEPTIN9 (SEQ ID NO: 1) o secuencia genómica, se obtiene una muestra del sujeto. La muestra puede ser cualquier muestra adecuada que comprenda materia celular del tumor. Los tipos de muestra adecuados incluyen tejido, sangre, plasma o suero y todas las posibles combinaciones de los mismos. Se prefiere que dichos tipos de muestra sean sangre. La muestra puede tratarse para extraer el ARN contenido en el mismo. El ácido nucleico resultante de la muestra se analiza a continuación. Se conocen muchas técnicas en el estado de la técnica para determinar niveles absolutos y relativos de expresión génica, las técnicas comúnmente usadas adecuadas para su uso en la presente invención incluyen la hibridación in situ (por ejemplo, FISH), análisis Northern, ensayos de protección de RNasa (RPA), micromatrices y técnicas basadas en PCR, tales como PCR cuantitativa y PCR de pantalla diferencial o cualquier otro procedimiento de detección de ácido nucleico. Se puede utilizar la técnica de reacción en cadena de transcripción/polimerización inversa (RT-PCR). El procedimiento de RT-PCR es bien conocido en la técnica (por ejemplo, ver Watson y Fleming, supra).

El procedimiento de RT-PCR se puede realizar de la siguiente manera. El ARN celular total se aísla, por ejemplo, mediante el procedimiento estándar de isotiocianato de guanidinio y el ARN total se transcribe de forma inversa. El procedimiento de transcripción inversa implica la síntesis de ADN en una plantilla de ARN utilizando una enzima transcriptasa inversa y un cebador dT de oligonucleótidos de extremo 3' y/o cebadores hexámeros aleatorios. El ADN así producido se amplifica luego por medio de PCR. (Belyavsky y col., Nucl Acid Res 17: 2919-2932, 1989; Krug y Berger, Methods in Enzymology, Academic Press, N.Y., Vol. 152, págs. 316-325, 1987, que se incorporan como referencia). Se prefiere adicionalmente la variante en "tiempo real" de RT-PCR, en donde el producto de PCR se detecta por medio de sondas de hibridación (por ejemplo, TaqMan, LightCycler, Molecular Beacons & Scorpion) o

SYBR green. La señal detectada de las sondas o verde SYBR se cuantifica a continuación mediante referencia a una curva estándar o comparando los valores de Ct con los de un estándar de calibración. El análisis de los genes constitutivos a menudo se utiliza para normalizar los resultados.

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

10 La comparación de las señales de dos o más poblaciones de células o tejidos revela diferencias relativas en los niveles de expresión génica. La cuantificación absoluta se puede realizar comparando la señal con una curva estándar generada utilizando cantidades conocidas de un transcrito in vitro correspondiente al ARN diana. El análisis de genes constitutivos, genes cuyos niveles de expresión se espera que permanezcan relativamente constantes independientemente de las condiciones, se utiliza a menudo para normalizar los resultados, eliminando cualquier diferencia aparente provocada por transferencia desigual de ARN a la membrana o carga desigual de ARN en el gel.

15 El primer paso en el análisis Northern es aislar el ARN puro e intacto de las células o tejidos de interés. Debido a que las transferencias Northern distinguen los ARN por tamaño, la integridad de la muestra influye en el grado en que una señal se localiza en una sola banda. Las muestras de ARN parcialmente degradadas darán como resultado que la señal se manche o distribuya en varias bandas con una pérdida general de sensibilidad y posiblemente una interpretación errónea de los datos. En el análisis de transferencia Northern, pueden utilizarse sondas de ADN, ARN y oligonucleótidos y estas sondas están preferiblemente marcadas (por ejemplo, marcadores radiactivos, marcadores de masas o marcadores fluorescentes). El tamaño del ARN objetivo, no la sonda, determinará el tamaño de la banda detectada, por lo que los procedimientos tales como el etiquetado con cebado aleatorio, que genera sondas de longitudes variables, son adecuados para la síntesis de la sonda. La actividad específica de la sonda determinará el nivel de sensibilidad, por lo que se prefiere que se usen sondas con actividades específicas altas.

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

35 Las sondas de ARN anticodificantes usadas en RPA se generan por transcripción in vitro de una plantilla de ADN con un punto final definido y están típicamente en el intervalo de 50-600 nucleótidos. El uso de sondas de ARN que incluyen secuencias adicionales no homólogas al ARN objetivo permite distinguir el fragmento protegido de la sonda de longitud completa. Normalmente se utilizan sondas de ARN en lugar de sondas de ADN debido a la facilidad de generar sondas de ARN monocatenarias y la reproducibilidad y fiabilidad de la digestión dúplex de ARN: ARN con RNasas (Ausubel y otros 2003), son particularmente preferidas sondas con actividades específicas altas.

40 Particularmente preferido es el uso de micromatrices. El proceso de análisis de micromatrices se puede dividir en dos partes principales. Primero es la inmovilización de secuencias génicas conocidas sobre portaobjetos de vidrio u otro soporte sólido seguido de hibridación del ADNc marcado fluorescentemente (que comprende las secuencias a interrogar) a los genes conocidos inmovilizados en el portaobjetos de vidrio (u otra fase sólida). Después de la hibridación, las matrices se escanean utilizando un escáner de micromatrices fluorescente. El análisis de la intensidad fluorescente relativa de diferentes genes proporciona una medida de las diferencias en la expresión génica.

45 Se pueden generar matrices de ADN inmovilizando oligonucleótidos presintetizados sobre portaobjetos de vidrio preparados u otras superficies sólidas. En este caso, las secuencias génicas representativas se fabrican y preparan utilizando procedimientos de purificación y síntesis de oligonucleótidos estándar. Estas secuencias génicas sintetizadas son complementarias a los transcritos de ARN de por lo menos un gen que está metilado en cáncer, pero no metilado en tejido no canceroso y tienden a ser secuencias más cortas en el intervalo de 25-70 nucleótidos. Alternativamente, los oligos inmovilizados se pueden sintetizar químicamente in situ en la superficie del portaobjetos. La síntesis de oligonucleótidos in situ implica la adición consecutiva de los nucleótidos apropiados a las manchas en la micromatriz; los puntos que no reciben un nucleótido están protegidos durante cada etapa del proceso utilizando máscaras físicas o virtuales. Preferiblemente, dichos ácidos nucleicos sintetizados son ácidos nucleicos bloqueados.

50 En experimentos de micromatriz de perfiles de expresión, las plantillas de ARN utilizadas son representativas del perfil de transcripción de las células o tejidos en estudio. El ARN se aísla primero de las poblaciones de células o tejidos que se van a comparar. A continuación, cada muestra de ARN se utiliza como plantilla para generar ADNc marcado fluorescentemente mediante una reacción de transcripción inversa. El marcaje fluorescente del ADNc puede realizarse mediante el etiquetado directo o procedimientos de marcaje indirecto. Durante el marcaje directo, los nucleótidos modificados fluorescentemente (por ejemplo, dCTP Cy³ o Cy⁵) se incorporan directamente en el ADNc durante la transcripción inversa. Alternativamente, el marcaje indirecto se puede lograr incorporando nucleótidos modificados con

aminoalilo 1 durante la síntesis de ADNc y luego conjugando un colorante de éster N-hidroxisuccinimida (NHS) con el ADNc modificado con aminoalilo después de que se complete la reacción de transcripción inversa. Alternativamente, la sonda puede estar sin marcar, pero se puede detectar mediante unión específica con un ligando que está marcado, directa o indirectamente. Los marcadores y procedimientos adecuados para marcar ligandos (y sondas) son conocidos en la técnica e incluyen, por ejemplo, marcadores radioactivos que pueden incorporarse por procedimientos conocidos (por ejemplo, traslación de cortes o quinasing). Otros marcadores adecuados incluyen, pero sin limitación, biotina, grupos fluorescentes, grupos quimioluminiscentes (por ejemplo, dioxetanos, dioxetanos particularmente activados), enzimas, anticuerpos y similares.

Para realizar el análisis diferencial de la expresión génica, los ADNc generados a partir de diferentes muestras de ARN se marcan con Cy³. El ADNc marcado resultante se purifica para eliminar los nucleótidos no incorporados, el colorante libre y el ARN residual. Después de la purificación, las muestras de cDNA marcadas se hibridan con la micromatriz. La rigurosidad de la hibridación está determinada por una serie de factores durante la hibridación y durante el procedimiento de lavado, que incluyen la temperatura, la fuerza iónica, el período de tiempo y la concentración de formamida. Estos factores se describen en, por ejemplo, Sambrook et al. (Molecular Cloning: A Laboratory Manual, 2^a ed., 1989). La micromatriz se escanea después de la hibridación utilizando un escáner de micromatrices fluorescente. La intensidad fluorescente de cada punto indica el nivel de expresión del gen analizado; los puntos brillantes corresponden a genes fuertemente expresados, mientras que los puntos oscuros indican una expresión débil.

Una vez que se obtienen las imágenes, los datos sin procesar se deben analizar. En primer lugar, la fluorescencia de fondo se debe restar de la fluorescencia de cada punto. Los datos luego se normalizan a una secuencia de control, como ácidos nucleicos añadidos exógenamente (preferiblemente ARN o ADN) o un panel genético constitutivo para dar cuenta de cualquier hibridación no específica, imperfecciones de matriz o variabilidad en la disposición de la matriz, etiquetado de ADNc, hibridación o lavado. La normalización de datos permite comparar los resultados de múltiples matrices.

Se divulga in kit para usar en determinar el pronóstico de un sujeto que tiene cáncer de acuerdo con los procedimientos de la presente invención, dicho kit comprende: un medio para medir el nivel de transcripción de por lo menos un gen o secuencia genómica que está metilado en el cáncer, pero no metilado en el tejido no canceroso. En una realización preferida, los medios para medir el nivel de transcripción comprenden oligonucleótidos o polinucleótidos capaces de hibridar en condiciones rigurosas o moderadamente rigurosas con los productos de transcripción de por lo menos un gen o secuencia genómica que está metilada en cáncer, pero no metilada en tejido no canceroso. En una realización más preferida, el nivel de transcripción se determina por técnicas seleccionadas del grupo de análisis de transferencia Northern, PCR de transcriptasa inversa, PCR en tiempo real, protección de RNasa y micromatriz. En otra realización de la invención, el kit comprende además medios para obtener y/o almacenar una muestra biológica del sujeto. Se prefiere un kit, que comprende además un recipiente que es más preferiblemente adecuado para contener los medios para medir el nivel de transcripción y la muestra biológica del sujeto, y más preferiblemente comprende instrucciones de uso e interpretación de los resultados del kit.

En una realización preferida, el kit comprende (a) una pluralidad de oligonucleótidos o polinucleótidos capaces de hibridar en condiciones restrictivas o moderadamente rigurosas con los productos de transcripción de por lo menos un gen o secuencia genómica que está metilada en cáncer, pero no metilada en tejido no canceroso (b) un recipiente, preferiblemente adecuado para contener los oligonucleótidos o polinucleótidos y una muestra de sangre del sujeto que comprende los productos de transcripción en los que los oligonucleótidos o polinucleótidos pueden hibridar en condiciones restrictivas o moderadamente rigurosas con los productos de transcripción, (c) medios para detectar la hibridación de (b); y opcionalmente, (d) instrucciones para el uso e interpretación de los resultados del kit.

El kit también puede contener otros componentes tales como tampón de hibridación (donde los oligonucleótidos se usarán como sonda) empaquetados en un recipiente separado. Alternativamente, cuando los oligonucleótidos se van a usar para amplificar una región diana, el kit puede contener, envasarse en contenedores separados, una polimerasa y un tampón de reacción optimizado para la extensión del cebador mediado por la polimerasa, tal como PCR. Preferiblemente, dicha polimerasa es una transcriptasa inversa. Se prefiere además que dicho kit contenga adicionalmente un reactivo de RNasa.

Se divulgan procedimientos para la detección de la presencia del polipéptido codificado por dichas secuencias génicas en una muestra obtenida de dicho sujeto.

Los niveles aberrantes de expresión de polipéptidos de los polipéptidos codificados por lo menos en un gen o secuencia genómica que está metilada en cáncer, pero no metilados en tejido no canceroso están asociados con el pronóstico de un sujeto que tiene cáncer.

Según la presente invención, la subexpresión de dichos polipéptidos está asociada con un pronóstico negativo de un sujeto que tiene cáncer.

Se puede usar cualquier procedimiento conocido en la técnica para detectar polipéptidos. Dichos procedimientos incluyen, pero no se limitan a, espectrometría de masa, inmunodifusión, inmunoelectroforesis, procedimientos inmunoquímicos, ensayos de ligante-ligando, técnicas inmunohistoquímicas, aglutinación y ensayos de complemento (por ejemplo, véase Basic and Clinical Immunology, Sites and Terr, eds., Appleton & Lange, Norwalk, Conn, pág. 217-262, 1991 que se incorpora como referencia). Se prefieren los procedimientos de inmunoensayo aglutinante-ligando que incluyen la reacción de anticuerpos con un epítipo o epítipos y el desplazamiento competitivo de un polipéptido marcado o un derivado del mismo.

Se divulga el uso de anticuerpos específicos para el (los) polipéptido (s) codificado (s) mediante por lo menos un gen o secuencia genómica que está metilado en cáncer, pero no metilado en tejido no canceroso.

Tales anticuerpos son útiles para determinar el pronóstico de un sujeto que tiene cáncer. En determinadas realizaciones, la producción de anticuerpos monoclonales o policlonales puede inducirse mediante el uso de un epítipo codificado por un polipéptido de por lo menos un gen o secuencia genómica que está metilado en cáncer, pero no metilado en tejido no canceroso como un antígeno. Dichos anticuerpos pueden a su vez utilizarse para detectar polipéptidos expresados. Los niveles de tales polipéptidos presentes se pueden cuantificar mediante procedimientos convencionales. La unión de anticuerpo-polipéptido se puede detectar y cuantificarse mediante una diversidad de medios conocidos en la técnica, tales como el marcaje con ligandos fluorescentes o radiactivos. La invención comprende adicionalmente kits para realizar los procedimientos mencionados anteriormente, en donde tales kits contienen anticuerpos específicos para los polipéptidos investigados.

Numerosos inmunoensayos de unión a polipéptidos competitivos y no competitivos son bien conocidos en la técnica. Los anticuerpos empleados en dichos ensayos pueden estar sin marcar, por ejemplo, como se utilizan en las pruebas de aglutinación, o pueden marcarse para usar una amplia variedad de procedimientos de ensayo. Las etiquetas que se pueden usar incluyen radionucleidos, enzimas, fluorescentes, quimioluminiscentes, sustratos de enzima o cofactores, inhibidores de enzimas, partículas, colorantes y similares. Los ensayos preferidos incluyen, pero sin limitación, radioinmunoensayo (RIA), inmunoensayos enzimáticos, por ejemplo, ensayo inmunoabsorbente ligado a enzimas (ELISA), inmunoensayos fluorescentes y similares. Pueden prepararse anticuerpos policlonales o monoclonales o epítipos de los mismos para su uso en inmunoensayos mediante cualquiera de una serie de procedimientos conocidos en la técnica.

En una realización alternativa del procedimiento, las proteínas pueden detectarse por medio de análisis de transferencia Western. Dicho análisis es estándar en la técnica, brevemente las proteínas se separan por medio de electroforesis, por ejemplo, SDS-PAGE. Las proteínas separadas se transfieren después a una membrana (o papel) adecuada, por ejemplo, nitrocelulosa, que retiene la separación espacial lograda por electroforesis. La membrana se incuba luego con un agente bloqueante para unir los lugares pegajosos restantes en la membrana, los agentes comúnmente usados incluyen proteína genérica (por ejemplo, proteína de la leche). Luego se agrega un anticuerpo específico para la proteína de interés, que se marca de forma detectable, por ejemplo, mediante colorantes o medios enzimáticos (por ejemplo, fosfatasa alcalina o peroxidasa de rábano). La ubicación del anticuerpo en la membrana se detecta luego.

En una realización alternativa del procedimiento, las proteínas pueden detectarse mediante inmunohistoquímica (el uso de anticuerpos para analizar antígenos específicos en una muestra). Dicho análisis es estándar en la técnica, en el que la detección de antígenos en tejidos se conoce como inmunohistoquímica, mientras que la detección en células cultivadas se denomina en general inmunocitoquímica. Brevemente, el anticuerpo primario que se detectará al unirse a su antígeno específico. El complejo anticuerpo-antígeno se une luego por un anticuerpo secundario conjugado con enzima. En presencia del sustrato y el cromógeno necesarios, la enzima unida se detecta de acuerdo con depósitos coloreados en los sitios de unión anticuerpo-antígeno. Existe una amplia gama de tipos de muestra adecuados, afinidad antígeno-anticuerpo, tipos de anticuerpos y procedimientos de mejora de la detección. Por lo tanto, las condiciones óptimas para la detección inmunohistoquímica o inmunocitoquímica las debe determinar el experto en la técnica para cada caso individual.

Un enfoque para preparar anticuerpos para un polipéptido es la selección y preparación de una secuencia de aminoácidos de todo o parte del polipéptido, sintetizando químicamente la secuencia de aminoácidos e inyectándola en un animal apropiado, generalmente un conejo o un ratón (Milstein y Kohler). Nature 256: 495-497, 1975; Gutfre y Milstein, Methods in Enzymology: Immunochemical Techniques 73: 1-46, Langone y Banatis eds., Academic Press, 1981, que se incorporan como referencia en su totalidad). Los procedimientos para la preparación de los polipéptidos o epítipos de los mismos incluyen, pero sin limitación, a síntesis química, técnicas de ADN recombinante o aislamiento de muestras biológicas.

En la etapa final del procedimiento, se determina el pronóstico del sujeto, por lo que la sub-expresión (de ARNm o polipéptidos) es indicativa del pronóstico de un sujeto que tiene cáncer. El término sub-expresión se tomará para significar la expresión a un nivel detectado menor que un corte predeterminado que puede seleccionarse del grupo que consiste en la media, la mediana o un valor umbral optimizado. El término sobreexpresión debe entenderse como expresión media a un nivel detectado mayor que un corte predeterminado que puede seleccionarse del grupo que consiste en la media, la mediana o un valor umbral optimizado.

Se divulga un kit para usar en la determinación del pronóstico de un sujeto que tiene cáncer de acuerdo con los procedimientos de la presente invención, que comprende: un medio para detectar por lo menos un gen o secuencia genómica metilada en cáncer, pero no metilado en polipéptidos tisulares no cancerosos. Los medios para detectar los polipéptidos comprenden preferiblemente anticuerpos, derivados de anticuerpos o fragmentos de anticuerpos. Los polipéptidos se detectan más preferiblemente por medio de transferencia Western utilizando un anticuerpo marcado. En otra realización de la invención, el kit comprende además medios para obtener una muestra biológica del sujeto. Se prefiere un kit, que comprende además un recipiente adecuado para contener los medios para detectar los polipéptidos en la muestra biológica del sujeto, y más preferiblemente comprende además instrucciones para el uso y la interpretación de los resultados del kit. En una realización preferida, el kit comprende: (a) un medio para detectar por lo menos un gen o secuencia genómica que está metilado en cáncer, pero no metilado en polipéptidos de tejidos no cancerosos; (b) un recipiente adecuado para contener dichos medios y la muestra biológica del sujeto que comprende los polipéptidos en donde los medios pueden formar complejos con los polipéptidos; (c) un medio para detectar los complejos de (b); y opcionalmente (d) instrucciones para el uso y la interpretación de los resultados del kit.

El kit también puede contener otros componentes tales como tampones o soluciones adecuadas para el bloqueo, lavado o recubrimiento, envasados en un contenedor separado.

20 Análisis de metilación

Las realizaciones particulares de la presente invención proporcionan una nueva aplicación del análisis de niveles y/o patrones de metilación dentro de por lo menos un gen o secuencia genómica que está metilada en cáncer, pero no metilada en tejido no canceroso que permite determinar el pronóstico de un sujeto que tiene cáncer

En una realización del procedimiento, el pronóstico de un sujeto que tiene cáncer se determina por análisis del estado de metilación de uno o más dinucleótidos CpG de por lo menos un gen o secuencia genómica que está metilado en cáncer, pero no metilado en tejido no canceroso.

El procedimiento divulgado comprende las siguientes etapas: i) poner en contacto ADN genómico (preferiblemente aislado de tejido, sangre, plasma o suero) obtenido del sujeto con por lo menos un reactivo, o una serie de reactivos que distingue entre metilado y dinucleótidos CpG no metilados en por lo menos un gen o secuencia genómica que está metilado en cáncer, pero no metilado en tejido no canceroso (que incluye promotor y regiones reguladoras del mismo) y ii) determinación del pronóstico de dicho sujeto que tiene cáncer.

Se prefiere que dichos uno o más dinucleótidos CpG de por lo menos un gen o secuencia genómica que se metila en cáncer, pero no metilados en tejido no canceroso estén comprendidos dentro de una secuencia diana genómica respectiva del mismo como se proporciona en las secuencias genómicas y sus complementos. Se divulga un procedimiento para determinar parámetros genéticos y/o epigenéticos de por lo menos un gen o secuencia genómica que está metilado en cáncer, pero no metilado en tejido no canceroso y/o la secuencia genómica según las secuencias genómicas dentro de un sujeto mediante el análisis de la metilación de la citosina. Dicho procedimiento comprende poner en contacto un ácido nucleico que comprende las secuencias genómicas en una muestra biológica obtenida de dicho sujeto con por lo menos un reactivo o una serie de reactivos, en el que dicho reactivo o serie de reactivos distingue entre dinucleótidos CpG metilados y no metilados dentro del ácido nucleico objetivo.

En una realización preferida, dicho procedimiento comprende las siguientes etapas: en el primer paso, se obtiene una muestra del tejido a analizar. La fuente puede ser cualquier fuente adecuada, tal como tejido, sangre, plasma o suero y todas las posibles combinaciones de los mismos. Se prefiere que dichas fuentes de ADN sean tejido, sangre, plasma o suero.

El ADN genómico luego se aisló de la muestra. El ADN genómico puede aislarse por cualquier medio estándar en la técnica, incluido el uso de kits disponibles comercialmente. Brevemente, en el que el ADN de interés está encapsulado en una membrana celular, la muestra biológica debe romperse y lisarse por medios enzimáticos, químicos o mecánicos. La solución de ADN puede eliminarse entonces de proteínas y otros contaminantes, por ejemplo, por digestión con proteinasa K. El ADN genómico se recupera de la solución. Esto se puede llevar a cabo por medio de una variedad de procedimientos que incluyen la precipitación salina, la extracción orgánica o la unión del ADN a un soporte en fase sólida. La elección del procedimiento se verá afectada por varios factores, incluidos el tiempo, los gastos y la cantidad requerida de ADN.

Cuando el ADN de muestra no está encerrado en una membrana (por ejemplo, ADN circulante de una muestra de sangre), se pueden emplear procedimientos estándar en la técnica para el aislamiento y/o la purificación de ADN. Dichos procedimientos incluyen el uso de un reactivo degenerativo de proteínas, por ejemplo, sal caotrópica, por ejemplo, clorhidrato de guanidina o urea; o un detergente, por ejemplo, dodecil sulfato de sodio (SDS), bromuro de cianógeno. Los procedimientos alternativos incluyen, pero sin limitación, precipitación con etanol o precipitación con propanol, concentración de vacío, entre otros, por medio de una centrifuga. El experto en la técnica también puede hacer uso de dispositivos tales como dispositivos de filtración, por ejemplo, filtración, superficies o membranas de

silice, partículas magnéticas, partículas de poliestirol, superficies de poliestirol, superficies cargadas positivamente, y membranas cargadas positivamente, membranas cargadas, superficies cargadas, membranas de interruptor cargadas, superficies conmutadas cargadas.

- 5 Una vez que se han extraído los ácidos nucleicos, se utiliza el ADN genómico bicatenario en el análisis, el análisis de metilación se puede llevar a cabo por cualquier medio conocido en la técnica que incluye, pero no se limita a, análisis de enzimas de restricción sensible a la metilación y análisis de reactivo químico.

10 Análisis químico

En la segunda etapa del procedimiento, la muestra de ADN genómico se trata de tal manera que las bases de citosina que no están metiladas en la posición 5' se convierten en uracilo, timina u otra base que es diferente a la citosina en términos de comportamiento de hibridación. Esto se entenderá aquí como 'pretratamiento' o 'tratamiento'.

- 15 Esto se logra preferiblemente por medio de tratamiento con un reactivo de bisulfito. El término "reactivo de bisulfito" se refiere a un reactivo que comprende bisulfito, sulfito, hidrogenosulfito o combinaciones de los mismos, útil como se describe en el presente documento para distinguir entre secuencias de dinucleótidos CpG metiladas y no metiladas. Los procedimientos de dicho tratamiento son conocidos en la técnica (por ejemplo, PCT/EP2004/01171 5). Se prefiere que el tratamiento con bisulfito se realice en presencia de disolventes desnaturizantes tales como, pero sin limitación, n-alquilenglicol, particularmente dietilenglicoldimetiléter (DME), o en presencia de derivados de dioxano o dioxano. En una realización preferida, los disolventes desnaturizantes se utilizan en concentraciones entre 1% y 35% (v/v).
 20 También se prefiere que la reacción de bisulfito se lleve a cabo en presencia de eliminadores tales como, pero sin limitación, derivados de cromano, por ejemplo, ácido 6- hidroxí-2,5,7,8,-tetrametilcromano 2-carboxílico o ácido trihidroxibenzoico y derivados de los mismos, por ejemplo, ácido gálico (ver: PCT/EP2004/011715 que se incorpora por referencia en su totalidad). La conversión de bisulfito se lleva a cabo preferiblemente a una temperatura de reacción entre 30°C y 70°C, por lo que la temperatura se incrementa a más de 85°C durante cortos periodos de tiempo durante la reacción (véase: PCT/EP2004/011715). El ADN tratado con bisulfito preferiblemente se purifica antes de la cuantificación. Esto se puede llevar a cabo por cualquier medio conocido en la técnica, tal como, pero sin limitación, a ultrafiltración, preferiblemente llevada a cabo por medio de columnas Microco™ (fabricadas por Millipore™). La purificación se lleva a cabo de acuerdo con un protocolo de fabricante modificado (véase: PCT/EP2004/011715).

- En la tercera etapa del procedimiento, se amplifican fragmentos del ADN tratado, utilizando grupos de oligonucleótidos cebadores de acuerdo con la presente invención, y una enzima de amplificación. La amplificación de varios segmentos de ADN se puede llevar a cabo simultáneamente en uno y el mismo recipiente de reacción. Típicamente, la amplificación se lleva a cabo utilizando una reacción en cadena de la polimerasa (PCR). Preferiblemente, dichos amplificadores tienen una longitud de 100 a 2,000 pares de bases. El conjunto de oligonucleótidos cebadores incluye por lo menos dos oligonucleótidos cuyas secuencias son cada una complementaria inversa, idéntica o hibrida en condiciones estrictas o altamente restrictivas con un segmento largo de por lo menos 16 pares de bases de las secuencias de bases de una de las secuencias y secuencias de bisulfito complementario a esto.

- 40 En una realización alternativa del procedimiento, el estado de metilación de las posiciones CpG preseleccionadas dentro de por lo menos un gen o secuencia genómica que está metilado en cáncer, pero no metilado en tejido no canceroso y preferiblemente dentro de las secuencias de ácido nucleico según las secuencias genómicas, se puede detectar mediante el uso de oligonucleótidos cebadores específicos de metilación. Esta técnica (MSP) se ha descrito en la Patente de Estados Unidos No. 6,265,171 de Herman. El uso de cebadores específicos de estado de metilación para la amplificación de ADN tratado con bisulfito permite la diferenciación entre ácidos nucleicos metilados y no metilados. Los pares de cebadores de MSP contienen por lo menos un cebador que hibrida con un dinucleótido CpG tratado con bisulfito. Por lo tanto, la secuencia de dichos cebadores comprende por lo menos un dinucleótido CpG. Los cebadores de MSP específicos para ADN no metilado contienen un "T" en la posición de la posición C en el CpG.
 45 Preferiblemente, por lo tanto, se requiere que la secuencia de bases de dichos cebadores comprenda una secuencia que tiene una longitud de por lo menos 9 nucleótidos que se hibrida con una secuencia de ácido nucleico tratada según una de las secuencias de bisulfito y secuencias complementarias a la misma, en la que la secuencia de bases de dichos oligómeros comprende por lo menos un dinucleótido CpG. Una realización preferida adicional del procedimiento comprende el uso de oligonucleótidos bloqueadores (el ensayo HeavyMethyl™). El uso de tales oligonucleótidos bloqueadores ha sido descrito por Yu y col., BioTechniques 23: 714-720, 1997. Los oligonucleótidos de la sonda de bloqueo se hibridan con el ácido nucleico tratado con bisulfito simultáneamente con los cebadores de PCR. La amplificación por PCR del ácido nucleico se termina en la posición 5' de la sonda de bloqueo, de modo que la amplificación de un ácido nucleico se suprime cuando está presente la secuencia complementaria a la sonda de bloqueo. Las sondas pueden diseñarse para hibridarse con el ácido nucleico tratado con bisulfito en una forma específica de estado de metilación. Por ejemplo, para la detección de ácidos nucleicos metilados dentro de una población de ácidos nucleicos no metilados, la supresión de la amplificación de ácidos nucleicos que no están metilados en la posición en cuestión se llevaría a cabo mediante el uso de sondas de bloqueo que comprenden un 'CpA' o 'TpA' en la posición en cuestión, en oposición a un 'CpG' si se desea la supresión de la amplificación de ácidos nucleicos metilados.

65

Para los procedimientos de PCR que utilizan oligonucleótidos bloqueadores, la interrupción eficaz de la amplificación mediada por polimerasa requiere que los oligonucleótidos bloqueadores no sean elongados por la polimerasa. Preferiblemente, esto se logra a través del uso de bloqueadores que son 3'-desoxioligonucleótidos, u oligonucleótidos derivados en la posición 3' con un grupo hidroxilo que no es "libre". Por ejemplo, los oligonucleótidos 3'-O-acetilo son representativos de una clase preferida de molécula bloqueante.

Adicionalmente, la descomposición de los oligonucleótidos bloqueadores mediada por la polimerasa se debería evitar. Preferiblemente, dicha preclusión comprende el uso de una polimerasa que carece de actividad exonucleasa 5'-3', o el uso de oligonucleótidos bloqueadores modificados que tienen, por ejemplo, puentes de tioato en los extremos 5' de los mismos que hacen que la molécula bloqueante sea resistente a nucleasas. Las aplicaciones particulares pueden no requerir tales modificaciones 5' del bloqueador. Por ejemplo, si los sitios de unión del bloqueador y del cebador se solapan, impidiendo por lo tanto la unión del cebador (por ejemplo, con un exceso de bloqueante), la degradación del oligonucleótido bloqueante se verá sustancialmente excluida. Esto se debe a que la polimerasa no extenderá el cebador hacia y a través (en la dirección 5'- 3') del bloqueador, un proceso que normalmente da como resultado la degradación del oligonucleótido bloqueador hibridado.

Una realización de bloqueador/PCR particularmente preferida, para los fines de la presente invención y como se implementa en el presente documento, comprende el uso de oligómeros de ácido nucleico peptídico (PNA) como oligonucleótidos de bloqueo. Tales oligómeros bloqueadores de PNA son idealmente adecuados, ya que no son ni descompuestos ni extendidos por la polimerasa.

Preferiblemente, por lo tanto, se requiere que la secuencia de bases de dichos oligonucleótidos bloqueadores comprenda una secuencia que tiene una longitud de por lo menos 9 nucleótidos que hibrida con una secuencia de ácido nucleico tratada según una de las secuencias de bisulfito y secuencias complementarias a la misma, en donde la secuencia de bases de dichos oligonucleótidos comprende por lo menos un dinucleótido CpG, TpG o CpA. Se prefiere particularmente que la secuencia de bases de dichos oligonucleótidos bloqueadores requiera que comprenda una secuencia que tenga una longitud de por lo menos 9 nucleótidos que se hibrida con una secuencia de ácido nucleico tratada según una de las SEQ ID NO: 5, 6, 9 o 10 y secuencias complementarias a la misma, en donde la secuencia de bases de dichos oligonucleótidos comprende por lo menos un dinucleótido TpG o CpA.

Los fragmentos obtenidos por medio de la amplificación pueden llevar una etiqueta detectable directa o indirectamente. Se prefieren marcadores en forma de marcadores de fluorescencia, radionucleidos o fragmentos de moléculas separables que tienen una masa típica que se puede detectar en un espectrómetro de masa. Donde dichas etiquetas son etiquetas masivas, se prefiere que los amplificadores etiquetados tengan una sola carga neta positiva o negativa, lo que permite una mejor delegación en el espectrómetro de masa. La detección se puede llevar a cabo y visualizar por medio de, por ejemplo, espectrometría de masa de desorción/ionización por láser asistido por matriz (MALDI) o utilizando espectrometría de masa por pulverización electrónica (ESI).

La espectrometría de masa de desorción/ionización láser asistida por matriz (MALDI-TOF) es un desarrollo muy eficiente para el análisis de biomoléculas (Karas & Hillenkamp, Anal Chem., 60: 2299-301, 1988). Un analito está incrustado en una matriz que absorbe la luz. La matriz se evapora mediante un pulso de láser corto transportando así la molécula de analito a la fase de vapor de una manera no fragmentada. El analito se ioniza por colisiones con moléculas de la matriz. Un voltaje aplicado acelera los iones en un tubo de vuelo libre de campo. Debido a sus diferentes masas, los iones se aceleran a diferentes velocidades. Los iones más pequeños alcanzan el detector antes que los más grandes. La espectrometría MALDI-TOF es muy adecuada para el análisis de péptidos y proteínas. El análisis de ácidos nucleicos es algo más difícil (Gut & Beck, Current Innovations y Future Trends, 1: 147-57, 1995). La sensibilidad con respecto al análisis de ácidos nucleicos es aproximadamente 100 veces menor que para los péptidos, y disminuye desproporcionadamente al aumentar el tamaño del fragmento. Adicionalmente, para ácidos nucleicos que tienen una cadena principal con carga negativa múltiple, el proceso de ionización a través de la matriz es considerablemente menos eficiente. En la espectrometría MALDI-TOF, la selección de la matriz juega un papel eminentemente importante. Para la desorción de péptidos, se han encontrado varias matrices muy eficaces que producen una cristalización muy fina. Ahora hay varias matrices receptoras para ADN, sin embargo, la diferencia en sensibilidad entre péptidos y ácidos nucleicos no se ha reducido. Sin embargo, esta diferencia en la sensibilidad se puede reducir modificando químicamente el ADN de tal manera que se vuelva más similar a un péptido. Por ejemplo, los ácidos nucleicos de fosfortioato, en los que los fosfatos habituales de la cadena principal están sustituidos con tiofosfatos, se pueden convertir en un ADN de carga neutra utilizando química de alquilación simple (Gut & Beck, Nucleic Acids Res. 23: 1367-73, 1995). El acoplamiento de una etiqueta de carga a este ADN modificado da como resultado un aumento en la sensibilidad de MALDI-TOF al mismo nivel que el encontrado para los péptidos.

Una ventaja adicional del etiquetado de carga es la mayor estabilidad del análisis frente a las impurezas, lo que hace que la detección de sustratos no modificados sea considerablemente más difícil.

En la cuarta etapa del procedimiento, los amplificadores obtenidos durante el tercer paso del procedimiento se analizan para determinar el estado de metilación de los dinucleótidos CpG antes del tratamiento.

En realizaciones en las que los amplificadores se obtuvieron por medio de la amplificación de MSP, la presencia, ausencia o clase de un amplificado es en sí mismo indicativo del estado de metilación de las posiciones CpG cubiertas por el cebador, de acuerdo con las secuencias de base de dicho cebador.

5 Los amplificadores obtenidos mediante PCR estándar y metilación específica pueden analizarse adicionalmente por medio de procedimientos basados en bases tales como tecnología de matriz y tecnologías basadas en sondas, así como por medio de técnicas tales como secuenciación y extensión dirigida por plantilla.

10 En una realización del procedimiento, los amplificadores sintetizados en la etapa tres se hibridan posteriormente con una matriz o un conjunto de oligonucleótidos y/o sondas de PNA. En este contexto, la hibridación tiene lugar de la siguiente manera: el conjunto de sondas utilizado durante la hibridación está compuesto preferiblemente de por lo menos 2 oligonucleótidos u oligómeros de PNA; en el proceso, los amplificadores sirven como sondas que hibridan con oligonucleótidos previamente unidos a una fase sólida; los fragmentos no hibridados se eliminan posteriormente; dichos oligonucleótidos contienen por lo menos una secuencia de bases que tiene una longitud de por lo menos 9 nucleótidos que es complementaria inversa o idéntica a un segmento de las secuencias de bases especificadas en el presente Listado de Secuencias; y el segmento comprende por lo menos un dinucleótido CpG, TpG o CpA. La porción de hibridación de los ácidos nucleicos hibridantes tiene típicamente por lo menos 9, 15, 20, 25, 30 o 35 nucleótidos de longitud. Sin embargo, las moléculas más largas tienen utilidad inventiva y, por lo tanto, están dentro del alcance de la presente invención.

20 En una realización preferida, dicho dinucleótido está presente en el tercio central del oligómero. Por ejemplo, en el que el oligómero comprende un dinucleótido CpG, dicho dinucleótido es preferiblemente el quinto al noveno nucleótido del extremo 5' de un 13-mer. Existe un oligonucleótido para el análisis de cada dinucleótido CpG dentro de una secuencia seleccionada del grupo que consiste en las secuencias genómicas, y las posiciones equivalentes dentro de las secuencias de bisulfito. Dichos oligonucleótidos también pueden estar presentes en forma de ácidos nucleicos peptídicos. Los amplificadores no hibridados se eliminan. Los amplificadores hibridados son luego detectados. En este contexto, se prefiere que las etiquetas unidas a los amplificadores sean identificables en cada posición de la fase sólida en la que se encuentra una secuencia de oligonucleótidos.

30 En aún otra realización adicional del procedimiento, el estado de metilación genómica de las posiciones de CpG se puede comprobar por medio de sondas de oligonucleótidos (como se detalló anteriormente) que se hibridan con el ADN tratado con bisulfito concurrentemente con los cebadores de amplificación PCR (en los que dichos cebadores pueden tener ya sea metilación específica o estándar).

35 Una realización particularmente preferida de este procedimiento es el uso de PCR cuantitativa en tiempo real con base en fluorescencia (Heid et al., *Genome Res.* 6: 986-994, 1996; véase también la Patente de Estados Unidos No. 6,331,393) que emplea una sonda de oligonucleótido fluorescente doblemente marcada (TaqMan™ PCR, utilizando un Sistema de Detección de Secuencia ABI Prism 7700, Perkin Elmer Applied Biosystems, Foster City, California). La reacción de PCR TaqMan™ emplea el uso de un oligonucleótido de interrogación no extensible, denominado sonda TaqMan™, que, en las realizaciones preferidas, se diseña para hibridarse con una secuencia rica en CpG ubicada entre los cebadores de amplificación directa e inversa. La sonda TaqMan™ comprende adicionalmente una "unidad estructural indicadora" fluorescente y una "unidad estructural inhibidora" unidos covalentemente a estructuras funcionales ligadoras (por ejemplo, fosforamiditas) unidas a los nucleótidos del oligonucleótido TaqMan™. Para el análisis de metilación dentro de ácidos nucleicos posteriores al tratamiento con bisulfito, se requiere que la sonda sea específica a metilación, como se describe en la Patente de Estados Unidos No. 6,331,393 también conocida como el ensayo MethyLight™. Las variaciones en la metodología de detección TaqMan™ que también son adecuadas para uso con la invención descrita incluyen el uso de tecnología de doble sonda (LightCycler™) o cebadores de amplificación fluorescente (tecnología Sunrise™). Ambas técnicas se pueden adaptar de una manera adecuada para uso con ADN tratado con bisulfito, y además para el análisis de metilación dentro de dinucleótidos CpG.

50 En una realización preferida adicional del procedimiento, la cuarta etapa del procedimiento comprende el uso de una extensión de oligonucleótido dirigido a plantilla, tal como MS-SNuPE como se describe por Gonzalzo & Jones, *Nucleic Acids Res.* 25:2529-2531, 1997.

55 En aún otra realización adicional del procedimiento, la cuarta etapa del procedimiento comprende la secuenciación y posterior análisis de secuencia del amplificado generado en la tercera etapa del procedimiento (Sanger F., et al., *Proc Natl Acad Sci* utiliza 74:5463-5467, 1977).

60 En una realización del procedimiento, los ácidos nucleicos genómicos se aíslan y se tratan de acuerdo con las primeras tres etapas del procedimiento descrito anteriormente, a saber:

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

b) extraer o aislar de otro modo el ADN genómico;

65

c) tratar el ADN genómico de b), o un fragmento del mismo, con uno o más reactivos para convertir las bases de citosina que no están metiladas en la posición 5 en uracilo o en otra base que sea detectablemente diferente de la citosina en términos de propiedades de hibridación; y en las que

5 d) la amplificación posterior al tratamiento en c) se lleva a cabo de una manera específica a metilación, concretamente mediante el uso de cebadores específicos a metilación u oligonucleótidos de bloqueo, y adicionalmente en los que

e) la detección de los amplificadores se lleva a cabo mediante una sonda de detección en tiempo real, como se describió anteriormente, y

10

f) determinar un pronóstico para el sujeto.

g) Preferiblemente, cuando se lleva a cabo la amplificación posterior de d) por medio de cebadores específicos a metilación, como se describió anteriormente, dichos cebadores específicos de metilación comprenden una secuencia que tiene una longitud de por lo menos 9, por lo menos 6, por lo menos 25, o a por lo menos 50 nucleótidos que se hibrida con una secuencia de ácidos nucleicos tratada de acuerdo con una de las secuencias de bisulfito y secuencias complementarias a la misma, en las que la secuencia de base de dichos oligómeros comprende por lo menos un dinucleótido de CpG.

15

20

La etapa e) del procedimiento, a saber, la detección de los amplificadores específicos indicativos del estado de metilación de una o más posiciones de CpG de acuerdo con las secuencias genómicas, se lleva a cabo mediante procedimientos de detección en tiempo real como se describió anteriormente.

Análisis de enzimas de restricción sensibles a metilación

25

En una realización alternativa de la invención, la segunda etapa descrita anteriormente se puede llevar a cabo por medio de un análisis de enzimas de restricción específico a metilación o metilación. Se conocen procedimientos en la técnica en los que se utiliza un reactivo de enzima de restricción sensible a metilación o una serie de reactivos de enzimas de restricción que comprenden reactivos de enzimas de restricción sensibles a metilación que distinguen entre dinucleótidos CpG metilados y no metilados dentro de una región objetivo se utilizan e determinar la metilación, por ejemplo pero no limitado a DMH.

30

En una realización preferida, el ADN se puede dividir antes del tratamiento con enzimas de restricción sensibles a metilación. Dichos procedimientos se conocen en la técnica y pueden incluir tanto medios físicos como enzimáticos. Particularmente se prefiere el uso de una pluralidad de enzimas de restricción que no son sensibles a metilación, y cuyos sitios de reconocimiento son ricos en AT y no comprenden dinucleótidos CG. El uso de dichas enzimas permite la conservación de islas CpG y regiones ricas en CpG en el ADN fragmentado. Las enzimas de restricción no específicas a metilación se seleccionan preferiblemente del grupo que consiste en MseI, BfaI, Csp6I, Tru1I, Tvu1I, Tru9I, Tvu9I, MaeI y XspI. Particularmente se prefiere el uso de dos o tres de dichas enzimas. Particularmente se prefiere el uso de una combinación de MseI, BfaI y Csp6I.

35

40

El ADN fragmentado luego se puede ligar a oligonucleótidos adaptadores con el fin de facilitar la posterior amplificación enzimática. El ligamiento de oligonucleótidos a fragmentos de ADN terminados romos y pegajosos es conocida en la técnica, y se lleva a cabo por defosforilación de los extremos (por ejemplo, utilizando fosfatasa alcalina de ternera o camarón) y el ligamiento subsiguiente utilizando enzimas ligasa (por ejemplo T4 ADN ligasa) en presencia de dATP. Los oligonucleótidos adaptadores tienen normalmente de por lo menos 18 pares de bases de longitud.

45

En la tercera etapa, el ADN (o fragmentos del mismo) se digiere luego con una o más enzimas de restricción sensibles a metilación. La digestión se lleva a cabo de manera que la hidrólisis del ADN en el sitio de restricción es informativa del estado de metilación de un dinucleótido CpG específico de por lo menos un gen o secuencia genómica que se metila en cáncer, pero no se metila en tejido no canceroso.

50

Preferiblemente, la enzima de restricción específica a metilación se selecciona del grupo que consiste en BsiEI, HgaI, HinPI, Hpy99I, AvaI, BceAI, BsaHI, BsiI, BstUI, Bsh1236I, AccII, BstFNI, McrBC, Glai, Mvnl, HpaII (HapII), Hhal, AclI, SmaI, HinP1I, HpyCH4IV, EagI y mezclas de dos o más de las enzimas anteriores. Se prefiere una mezcla que contiene las enzimas de restricción BstUI, HpaII, HpyCH4IV y HinP1I.

55

En la cuarta etapa, que es opcional pero una realización preferida, se amplifican los fragmentos de restricción. Esto se lleva a cabo preferiblemente utilizando una reacción en cadena de la polimerasa, y dichos amplificadores pueden llevar marcadores detectables adecuados como se discutió anteriormente, a saber, marcadores de fluoróforos, radionúclidos y marcadores de masa. Particularmente se prefiere la amplificación por medio de una enzima de amplificación y por lo menos dos cebadores que comprenden, en cada caso, una secuencia contigua de por lo menos 16 nucleótidos de longitud que es complementaria o se hibrida bajo condiciones moderadamente rigurosas o rigurosas con una secuencia seleccionada del grupo que consiste en las secuencias genómicas y complementos de las mismas. Preferiblemente, dicha secuencia contigua tiene por lo menos 16, 20 o 25 nucleótidos de longitud. En una realización alternativa, dichos cebadores pueden ser complementarios a cualquier adaptador ligados a fragmentos.

60

65

En la quinta etapa, se detectan los amplificadores. La detección puede ser de cualquier manera estándar en la técnica, por ejemplo, pero sin limitación, análisis de electroforesis en gel, análisis de hibridación, incorporación de etiquetas detectables dentro de los productos de PCR, análisis de matriz de ADN, análisis MALDI o ESI. Preferiblemente, dicha detección se lleva a cabo por hibridación con por lo menos un ácido nucleico o ácido nucleico peptídico que comprende en cada caso una secuencia contigua de por lo menos 16 nucleótidos de longitud que es complementaria o se hibrida bajo condiciones moderadamente rigurosas o rigurosas con una secuencia seleccionada del grupo que consiste en las secuencias genómicas y complementos de las mismas. Preferiblemente, dicha secuencia contigua tiene por lo menos 16, 20 o 25 nucleótidos de longitud.

Después de la determinación del estado de metilación o nivel de los ácidos nucleicos genómicos, se deduce el pronóstico de un sujeto que padece cáncer basándose en el estado de metilación o el nivel de por lo menos una secuencia de dinucleótidos CpG que se metila en el cáncer, pero no se metila en tejido no canceroso, o un promedio, o un valor que refleja un estado de metilación promedio de una pluralidad de secuencias de dinucleótidos CpG de las secuencias genómicas en las que la metilación se asocia con el pronóstico de un sujeto que tiene cáncer. En el que dicha metilación se determina por medios cuantitativos, el punto de corte para determinar dicha presencia de metilación es preferiblemente cero (es decir, en la que una muestra exhibe cualquier grado de metilación, se determina que tiene un estado metilado en la posición CpG analizada). No obstante, se prevé que el experto en la técnica pueda desear ajustar dicho valor de corte para proporcionar un ensayo de una sensibilidad o especificidad particularmente preferida. De acuerdo con lo anterior, dicho valor de corte se puede aumentar (aumentando de esta manera la especificidad), dicho valor de corte puede estar dentro de un intervalo seleccionado del grupo que consiste en 0% - 5%, 5% - 10%, 10% - 15%, 15% - 20%, 20% - 30% y 30% - 50%. Particularmente se prefieren los valores de corte que tienen por lo menos 0.1%, 1%, 10%, 15%, 25% y 30%.

Como se utiliza aquí, el término "pronóstico" se tomará como un indicador de la progresión prevista de la enfermedad (que incluye, pero no se limita a, la agresividad y el potencial metastásico) y/o el tiempo de supervivencia del paciente predicho.

En el contexto de la presente invención, el término "agresividad" se refiere a uno o más de alta probabilidad de recaída posterior a la cirugía; supervivencia del paciente por debajo del promedio o por debajo de la mediana; supervivencia libre de enfermedad por debajo del promedio o por debajo de la mediana; supervivencia sin recaídas por debajo del promedio o por debajo de la mediana; complicaciones relacionadas con el tumor por encima del promedio; progresión rápida de tumor o metástasis.

A menos que se indique lo contrario como se utiliza aquí, el término "supervivencia" incluirá todo lo siguiente: supervivencia hasta mortalidad, también conocida como supervivencia global (en la que dicha mortalidad puede ser independiente de la causa o relacionada con el tumor); "supervivencia libre de recurrencia" (en la que el término recurrencia incluirá recurrencia tanto ubicada como distante); supervivencia libre de metástasis; supervivencia libre de enfermedad (en la que el término enfermedad incluirá cáncer y enfermedades asociadas a esta). La duración de dicha supervivencia se puede calcular mediante referencia a un punto de inicio definido (por ejemplo, tiempo de diagnóstico o inicio del tratamiento) y punto final (por ejemplo, muerte, recurrencia o metástasis).

Se proporcionan ácidos nucleicos tratados, derivados de las secuencias genómicas, en los que el tratamiento es adecuado para convertir por lo menos una base de citosina no metilada de la secuencia de ADN genómico en uracilo u otra base que es detectablemente diferente de la citosina en términos de hibridación para uso en determinar el pronóstico de un sujeto que tiene cáncer o un tumor. Las secuencias genómicas en cuestión pueden comprender una o más posiciones CpG metiladas consecutivas. Dicho tratamiento del ácido nucleico comprende preferiblemente el uso de un reactivo seleccionado del grupo que consiste en bisulfito, hidrógeno sulfito, bisulfito y combinaciones de los mismos. También se proporciona un ácido nucleico modificado de origen no natural que comprende una secuencia de por lo menos 16 bases de nucleótidos contiguas en longitud de una secuencia seleccionada del grupo que consiste en las secuencias de bisulfito, en particular de las secuencias como se define por las SEQ ID NOs: 5, 7, 10 a 13 y 18 a 20. En realizaciones preferidas adicionales de la invención, dicho ácido nucleico tiene por lo menos 50, 100, 150, 200, 250 o 500 pares de bases de longitud de un segmento de la secuencia de ácidos nucleicos divulgada en las secuencias de bisulfito. Particularmente se prefiere una molécula de ácido nucleico que es idéntica o complementaria a todas o a una parte de las secuencias de las secuencias de bisulfito pero no a las secuencias genómicas u otro ADN de origen natural.

Se prefiere que dicha secuencia comprenda por lo menos un dinucleótido CpG, TpA o CpA y secuencias complementarias de los mismos. Las secuencias de las secuencias de bisulfito proporcionan versiones modificadas de origen no natural del ácido nucleico de acuerdo con las secuencias genómicas, en las que la modificación de cada secuencia genómica resulta en la síntesis de un ácido nucleico que tiene una secuencia que es única y distinta de dicha secuencia genómica como sigue. Para cada ADN genómico de cadena de sentido, se divulgan cuatro versiones convertidas. Una primera versión en la que "C" se convierte en "T", pero "CpG" permanece "CpG" (es decir, corresponde al caso en el que, para la secuencia genómica, todos los residuos "C" de secuencias de dinucleótidos CpG están metilados y, por lo tanto, no convertidos); una segunda versión divulga el complemento de la secuencia de ADN genómico divulgada (es decir, la cadena anticodificante), en la que "C" se convierte en "T", pero "CpG"

permanece como "CpG" (es decir, corresponde al caso en el que, para todos los residuos "C" de secuencias de dinucleótidos CpG están metilados y, por lo tanto, no se convierten). Las secuencias convertidas "metiladas en aumento" de las secuencias genómicas corresponden a las SEQ ID NOs: 4-9 para SEPTIN9 y para SEQ ID NOs: 17 y 18 para RASSF2A. Se proporciona una tercera versión químicamente convertida de cada secuencia genómica, en la que "C" se convierte en "T" para todos los residuos "C", incluidos los de secuencias de dinucleótidos "CpG" (es decir, corresponde al caso en el que, para las secuencias genómicas, todos los residuos "C" de las secuencias de dinucleótidos CpG están no metilados); una versión final químicamente convertida de cada secuencia, divulga el complemento de la secuencia de ADN genómico divulgada (es decir, la cadena anticodificantes), en la que "C" se convierte en "T" para todos los residuos "C", incluidos los de "CpG" "secuencias de dinucleótidos (es decir, corresponden al caso en el que, para el complemento (cadena anticodificantes) de cada secuencia genómica, todos los residuos "C" de las secuencias de dinucleótidos CpG están no metilados). Las secuencias convertidas "metiladas en disminución" de las secuencias genómicas corresponden a las SEQ ID NOs: 10-15 para SEPTIN9 y a las SEQ ID NOs: 19 y 20 para RASSF2A.

Significativamente, hasta ahora, las secuencias de ácido nucleico y las moléculas de acuerdo con las secuencias de bisulfito no estaban implicadas o relacionadas con el pronóstico de un sujeto que tiene cáncer.

En una realización alternativa, la invención proporciona adicionalmente oligonucleótidos u oligómeros adecuados para uso en los procedimientos de la invención para detectar el estado de metilación de citosina dentro de ADN genómico o tratado (químicamente modificado). Dichos ácidos nucleicos oligonucleotídicos u oligoméricos proporcionan medios de pronóstico novedosos. Dicho oligonucleótido u oligómero que comprende una secuencia de ácidos nucleicos que tiene una longitud de por lo menos nueve (9) nucleótidos que es idéntica a, se hibrida, bajo condiciones moderadamente rigurosas o rigurosas (como se define aquí anteriormente), a una secuencia de ácidos nucleicos tratada de acuerdo con el bisulfito secuencias y/o secuencias complementarias a las mismas, o a una secuencia genómica de acuerdo con las secuencias genómicas y/o secuencias complementarias a las mismas.

Se divulgan moléculas de ácido nucleico (por ejemplo, oligonucleótidos y moléculas de ácido nucleico peptídico (ANP) (oligómeros de PNA)) que se hibridan bajo condiciones de hibridación moderadamente rigurosas y/o rigurosas con todas o una parte de las secuencias o con los complementos en esto. Particularmente se prefiere una molécula de ácido nucleico que se hibrida bajo condiciones de hibridación moderadamente rigurosas y/o rigurosas con todas o una parte de las secuencias de las secuencias de bisulfito, pero no las secuencias genómicas u otro ADN genómico humano.

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

Preferiblemente, la porción de hibridación de los ácidos nucleicos de hibridación de la invención es por lo menos 95%, o por lo menos 98%, o 100% idéntica a la secuencia, o a una porción de la misma, o a los complementos de la misma.

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

Para secuencias objetivo que están relacionadas y sustancialmente idénticas a la secuencia correspondiente de las secuencias genómicas (tales como variantes alélicas y SNP), en lugar de idénticas, es útil establecer primero la temperatura más baja a la que solo se produce la hibridación homóloga con una concentración particular de sal (por ejemplo, SSC o SSPE). Luego, suponiendo que la discrepancia del 1% resulta en una disminución de 1°C en la T_m , la temperatura del lavado final en la reacción de hibridación se reduce de acuerdo con lo anterior (por ejemplo, si se buscan secuencias que tengan una identidad >95% con la sonda, la temperatura de lavado disminuye 5°C). En la práctica, el cambio en T_m puede estar entre 0.5°C y 1.5°C por 1% de discrepancia.

Ejemplos de oligonucleótidos de la invención de longitud X (en nucleótidos), como se indica mediante posiciones de polinucleótidos con referencia a las secuencias genómicas y convertidas descritas aquí, incluyen aquellos correspondientes a conjuntos (conjuntos sentido y anticodificantes) de oligonucleótidos de superposición consecutivos de longitud X, en los que los oligonucleótidos dentro de cada conjunto superpuesto consecutivamente (que corresponde a un valor X dado) se definen como el conjunto finito de oligonucleótidos Z desde las posiciones de nucleótidos:

n a $(n + (X-1))$;

en la que $n = 1, 2, 3, \dots (Y - (X-1))$;

en la que Y es igual a la longitud (nucleótidos o pares de bases) de SEQ ID NOs: 1-20;

en la que X es igual a la longitud común (en nucleótidos) de cada oligonucleótido en el conjunto (por ejemplo, X=20 para un conjunto de 20-meros que se superponen consecutivamente); y

donde el número (Z) de oligómeros superpuestos consecutivamente de longitud X para una SEQ ID NO: dada de longitud Y es igual a Y- (X-1).

Preferiblemente, el conjunto se limita a aquellos oligómeros que comprenden por lo menos un dinucleótido CpG, TpG o CpA.

Los ejemplos de oligonucleótidos de 20 meros de la invención incluyen los oligómeros descritos aquí (y el conjunto anticodificantes complementario de los mismos), indicados por posiciones de polinucleótidos con referencia a las SEQ ID NOs: 1 a 20:

1-20, 2-21, 3-22, 4-23, 5-24, etc.

Preferiblemente, el conjunto se limita a aquellos oligómeros que comprenden por lo menos un dinucleótido CpG, TpG o CpA.

Asimismo, los ejemplos de oligonucleótidos de 25 meros de la invención incluyen el siguiente conjunto de oligómeros xxx (y el conjunto anticodificantes complementario al mismo), indicado por posiciones de polinucleótidos con referencia a las SEQ ID NOs: 1 a 20:

1-25, 2-26, 3-27, 4-28, 5-29, etc.

Preferiblemente, el conjunto se limita a aquellos oligómeros que comprenden por lo menos un dinucleótido CpG, TpG o CpA.

Se divulga para cada una de las secuencias que se metila en cáncer, pero no se metila en tejido no canceroso (sentido y anticodificantes), conjuntos de oligonucleótidos consecutivamente superpuestos múltiples u oligonucleótidos modificados de longitud X, donde, por ejemplo, X=9, 10, 17, 20, 22, 23, 25, 27, 30 o 35 nucleótidos.

Los oligonucleótidos u oligómeros de acuerdo con la presente invención constituyen herramientas eficaces útiles para comprobar los parámetros genéticos y epigenéticos de la secuencia genómica correspondiente a las secuencias genómicas. Los conjuntos de dichos oligonucleótidos u oligonucleótidos modificados son aquellos conjuntos de oligómeros superpuestos consecutivamente correspondientes a la secuencia que se metila en cáncer, pero no se metila en tejido no canceroso (y a los complementos de los mismos). Preferiblemente, dichos oligómeros comprenden por lo menos un dinucleótido CpG, TpG o CpA.

Se divulgan aquellos oligonucleótidos u oligómeros particularmente preferidos en los que la citosina del dinucleótido CpG (o de las correspondientes secuencias convertidas de dinucleótido TpG o CpA) está dentro del tercio medio del oligonucleótido; es decir, en el que el oligonucleótido es, por ejemplo, de 13 bases de longitud, el dinucleótido CpG, TpG o CpA ubicado dentro del quinto al noveno nucleótido desde el extremo 5'.

Los oligonucleótidos de la invención también se pueden modificar al unir químicamente el oligonucleótido a una o más unidades estructurales o conjugados para potenciar la actividad, estabilidad o detección del oligonucleótido. Dichos restos o conjugados incluyen cromóforos, fluoróforos, lípidos tales como colesterol, ácido cólico, tioéter, cadenas alifáticas, fosfolípidos, poliaminas, polietilenglicol (PEG), unidades estructurales de palmitilo, y otros como se divulga, por ejemplo, en los números de patente de los Estados Unidos 5,514,758, 5,565,552, 5,567,810, 5,574,142, 5,585,481, 5,587,371, 5,597,696 y 5,958,773. Las sondas también pueden existir en forma de un PNA (ácido nucleico peptídico) que tiene propiedades de emparejamiento particularmente preferidas. De este modo, el oligonucleótido puede incluir otros grupos añadidos tales como péptidos, y puede incluir agentes de división activados por hibridación (Krol et al., BioTechniques 6:958-976, 1988) o agentes de intercalación (Zon, Pharm. Res. 5:539-549, 1988). Con este fin, el oligonucleótido se puede conjugar con otra molécula, por ejemplo, un cromóforo, fluoróforo, péptido, agente de entrecruzamiento activado por hibridación, agente de transporte, agente de división activado por hibridación, etc.

El oligonucleótido también puede comprender por lo menos una unidad estructural de azúcar y/o base modificada reconocida en la técnica, o puede comprender una cadena principal modificada o un enlace internucleosídico no natural.

Los oligonucleótidos u oligómeros de acuerdo con realizaciones particulares se utilizan normalmente en "conjuntos" que contienen por lo menos un oligómero para el análisis de cada uno de los dinucleótidos CpG de una secuencia genómica seleccionada del grupo que consiste en secuencias genómicas y secuencias complementarias de los mismos, o al dinucleótido CpG, TpG o CpA correspondiente dentro de una secuencia de los ácidos nucleicos tratados de acuerdo con las secuencias de bisulfito y secuencias complementarias a la misma. Sin embargo, se prevé que, por

factores económicos o de otro tipo, puede ser preferible analizar una selección limitada de los dinucleótidos CpG dentro de dichas secuencias, y de acuerdo con lo anterior se modifica el contenido del conjunto de oligonucleótidos.

5 Por lo tanto, en realizaciones particulares, la presente divulgación proporciona un conjunto de por lo menos dos (2) (oligonucleótidos y/u oligómeros de PNA) útiles para detectar el estado de metilación de citosina en ADN genómico tratado (las secuencias de bisulfito), o en ADN genómico (las secuencias genómicas y secuencias complementarias de las mismas). Estas sondas permiten la determinación del pronóstico de un sujeto que tiene cáncer. El conjunto de oligómeros también se puede utilizar para detectar polimorfismos de un solo nucleótido (SNP) en el ADN genómico tratado (las secuencias de bisulfito), o en el ADN genómico (las secuencias genómicas y secuencias complementarias a las mismas).

En realizaciones preferidas, por lo menos uno, y más preferiblemente todos los miembros de un conjunto de oligonucleótidos se unen a una fase sólida.

15 En realizaciones adicionales, la presente divulgación proporciona un conjunto de por lo menos dos (2) oligonucleótidos que se utilizan como oligonucleótidos cebadores para amplificar secuencias de ADN de una secuencia metilada en cáncer, pero no metilada en tejido no canceroso y secuencias complementarias a las mismas, o segmentos de las mismas.

20 Se anticipa que los oligonucleótidos pueden constituir la totalidad o parte de una "matriz" o "chip de ADN" (es decir, una disposición de diferentes oligonucleótidos y/u oligómeros de PNA unidos a una fase sólida). Dicha matriz de diferentes oligonucleótidos y/o secuencias de oligómeros de PNA se puede caracterizar, por ejemplo, porque está dispuesta en la fase sólida en forma de una red rectangular o hexagonal. La superficie de fase sólida puede estar compuesta de silicio, vidrio, poliestireno, aluminio, acero, hierro, cobre, níquel, plata u oro. También se pueden utilizar nitrocelulosa y plásticos tales como nylon, que pueden existir en forma de gránulos o también como matrices de resina. Se puede obtener una descripción general de la Técnica Anterior en la fabricación de matrices de oligómeros a partir de una edición especial de Nature Genetics (Nature Genetics Supplement, volumen 21, enero de 1999, y de la bibliografía citada aquí). Las sondas marcadas fluorescentemente se utilizan a menudo para la exploración de matrices de ADN inmovilizadas. La simple unión de los colorantes Cy3 y Cy5 al 5'-OH de la sonda específica es particularmente adecuada para las marcas de fluorescencia. La detección de la fluorescencia de las sondas hibridadas se puede llevar a cabo, por ejemplo, mediante un microscopio confocal. Los colorantes Cy3 y Cy5, además de muchos otros, están disponibles comercialmente.

35 También se anticipa que los oligonucleótidos, o secuencias particulares de los mismos, pueden constituir todo o parte de una "matriz virtual" en la que los oligonucleótidos, o secuencias particulares de los mismos, se utilizan, por ejemplo, como "especificadores" como parte de, o en combinación con una población diversa de sondas marcadas únicas para analizar una mezcla compleja de analitos. Dicho procedimiento, por ejemplo, se describe en el documento US 2003/0013091 (número de serie de los Estados Unidos 09/898,743, publicado el 16 de enero de 2003). En dichos procedimientos, se generan suficientes marcas para que cada ácido nucleico en la mezcla compleja (es decir, cada analito) pueda unirse de forma única mediante una marca única y de esta manera detectarse (cada marca se cuenta directamente, lo que da como resultado una lectura digital de cada especie molecular en la mezcla).

40 Se prefiere particularmente que los oligómeros de acuerdo con la divulgación se utilicen para determinar el pronóstico de un sujeto que tiene cáncer.

45 Kits

Más aún, un aspecto adicional de la presente divulgación es un kit que comprende: un medio para determinar la metilación de por lo menos un gen o secuencia genómica que está metilado en cáncer, pero no metilado en tejido no canceroso. Los medios para determinar la metilación de por lo menos un gen o secuencia genómica que se metila en cáncer, pero no metilado en tejido no canceroso comprenden preferiblemente un reactivo que contiene bisulfito; uno o una pluralidad de oligonucleótidos que consisten en secuencias que en cada caso son idénticas, son complementarias, o se hibridan bajo condiciones rigurosas o altamente restrictivas con por lo menos 9, por lo menos 18, por lo menos 25, o por lo menos 50 de segmento de longitud base de una secuencia seleccionado de las secuencias de bisulfito; y opcionalmente instrucciones para llevar a cabo y evaluar el procedimiento descrito de análisis de metilación. En una realización, la secuencia de bases de dichos oligonucleótidos comprende por lo menos un dinucleótido CpG, CpA o TpG.

60 En una realización adicional, dicho kit puede comprender adicionalmente reactivos estándar para realizar un análisis de metilación específico de la posición CpG, en el que dicho análisis comprende una o más de las siguientes técnicas: MS-SNuPE, MSP, MethyLight™, HeavyMethyl, COBRA y secuenciación de ácido nucleico. Sin embargo, un kit según las líneas de la presente invención también puede contener solo parte de los componentes anteriormente mencionados.

65 En una realización preferida, el kit puede comprender reactivos de conversión de bisulfito adicionales seleccionados del grupo que consiste en: regulador de desnaturalización de ADN; regulador de sulfonación; reactivos o kits de

recuperación de ADN (por ejemplo, precipitación, ultrafiltración, columna de afinidad); regulador de desulfonación; y componentes de recuperación de ADN.

5 En una realización alternativa adicional, el kit puede contener, empacada en recipientes separados, una polimerasa y un regulador de reacción optimizado para la extensión del cebador mediada por polimerasa, tal como la PCR. En otra realización el kit comprende además medios para obtener y/o almacenar una muestra de sangre del sujeto. Se prefiere un kit, que comprende adicionalmente un recipiente adecuado para contener los medios para determinar la metilación de por lo menos un gen o secuencia genómica que se metila en cáncer, pero no se metila en tejido no canceroso en la muestra de sangre del sujeto, y lo más preferiblemente además comprende instrucciones para el uso y la interpretación de los resultados del kit. En una realización preferida, el kit comprende: (a) un reactivo de bisulfito; (b) 10 un recipiente adecuado para contener dicho reactivo de bisulfito y la muestra de sangre del sujeto; (c) por lo menos un conjunto de oligonucleótidos cebadores que contienen dos oligonucleótidos cuyas secuencias en cada caso son idénticas, son complementarias o se hibridan bajo condiciones rigurosas o altamente rigurosas con un segmento de por lo menos 9 o más preferiblemente de 18 bases de una secuencia seleccionada del secuencias de bisulfito; y 15 opcionalmente (d) instrucciones para el uso y la interpretación de los resultados del kit. En una realización preferida alternativa, el kit comprende: (a) un reactivo de bisulfito; (b) un recipiente adecuado para contener dicho reactivo de bisulfito y la muestra de sangre del sujeto; (c) por lo menos un oligonucleótido y/o oligómero de PNA que tiene una longitud de por lo menos 9 o 16 nucleótidos que es idéntica o hibrida a una secuencia de ácidos nucleicos pretratada de acuerdo con una de las secuencias de bisulfito y secuencias complementarias a la misma; y opcionalmente (d) 20 instrucciones para uso e interpretación de los resultados del kit.

Tabla 1 Secuencias genómicas y variantes tratadas de las mismas de acuerdo con la invención

| SEQ ID NO: | Ubicación de Base de datos de Ensembl* | Base de datos de Ensembl* ubicación genómica | Transcripciones de gen asociadas* | Secuencia convertida de bisulfito metilado (sentido) | Secuencia convertida de bisulfito no metilado (anticodificantes) | Secuencia convertida de bisulfito no metilado (sentido) | Secuencia convertida de bisulfito no metilado (anticodificantes) |
|------------|--|--|-----------------------------------|--|--|---|--|
| 1 | AC068594.15.1. 168501 150580 a 151086 (+) a AC111170.11.1. 158988 137268 a 138151 (+) | 17 72789082 a 73008258 (+) | Septin 9 & Q9HC74 | 4 | 5 | 10 | 11] |
| 2 | AC068594.15.1. 168501 150580 a 151255 (+) | 17 72789082 a | Septin 9 | 6 | 7 | 12 | 13 |
| 3 | AC11182.20.1. 171898 127830 a 129168 (+) | 17 72881422 a 72882760 (+) | Q9HC74 | 8 | 9 | 14 | 15 |
| 16 | | | RASSF2 A | 17 | 18 | 19 | 20 |

Ejemplo 1

Los niveles de Septin9 y RASSF2A metilado como ejemplos de genes o secuencias genómicas que están metiladas en tejido neoplásico, pero no metilado en tejido no canceroso se investigaron en muestras de plasma coincidentes de pacientes con CCR con resección pre y postquirúrgica.

Los niveles de Septin9 y RASSF2A se determinaron mediante el procedimiento de ensayo triple que medía los genes Septin9, RASSF2A metilado y HB14. Se pueden ejecutar ensayos similares en formato simplex, dúplex, triplex, cuádruplex o multiplex.

El procedimiento para medir la metilación o el estado de metilación de genes y secuencias genómicas se conoce en la técnica. Véase, por ejemplo, la Patente de Estados Unidos No: 7,229.759, o la Patente Europea No: EP 1370691, ambas de las cuales se incorporan aquí como referencia para estos ensayos de metilación y procedimientos de detección. Se midió la metilación o el estado de metilación de los genes y las secuencias genómicas aquí. El ADN del plasma se convirtió en bisulfito y el nivel de ADN metilado en las posiciones en las secuencias genómicas se detectó en un ensayo tríplex.

Se utilizaron gradillas magnéticas Invitrogen (DynaMag-15 y DynaMag-2). El lavado A se preparó al agregar 45 ml de etanol (Merck, A000920, 99.8%) al concentrado A de Lavado Epi proColonUS. El lavado B se preparó al agregar 28 ml de etanol (Merck, A000920, 99.8%) al Concentrado B de Lavado Epi proColonUS. A un tubo Falcon marcado de 15 ml, se combinaron 3.5 ml de plasma sanguíneo con 3.5 ml de regulador de unión de lisis, se mezclaron al agitar en vórtice y se incubaron a temperatura ambiente durante 10 minutos. A esta reacción de lisis, se agregaron 90 µl de Perlas Magnéticas (Dynabeads MyOne SILANE, recientemente suspendidas al agitar en vórtice durante 30 segundos) y 2.5 ml de etanol a un volumen total de ~10 ml. El tubo se mezcló al invertir a mano 5-6 veces y se incubó con agitador giratorio (Rotador) durante 45 minutos a temperatura ambiente. El cebador lavado se realizó colocando tubos de 15 ml en una gradilla magnética durante por lo menos 5 minutos, después de lo cual se desechó el regulador y los tubos se transfirieron a una gradilla no magnética. Se agregó 1500 µl de Lavado A (como se describió anteriormente Regulador de Lisis/Unión + Etanol f. d. Molekularbiologie) y las perlas se resuspendieron al agitar en vórtice durante 10 segundos. La suspensión de perlas se transfirió a un tubo marcado de 2 ml con una pipeta de transferencia. Se utilizaron tubos SafeLock de 2 ml solo para garantizar un cierre seguro durante la incubación a 80°C para la centrifugación. La pipeta de transferencia se volvió a colocar en el tubo de 15 ml durante por lo menos 2 min para recoger las perlas restantes. Y colocado en el tubo de 2 ml con la misma pipeta de transferencia. Los tubos de 2 ml se colocaron en la gradilla magnética durante 2 minutos, después de los cuales se pipeteó la mayor cantidad posible de regulador de lavado teniendo cuidado de no eliminar las perlas. Los tubos se colocaron en una centrífuga y se centrifugaron durante 10 segundos a 1000 rcf para recoger las perlas en la parte inferior, se colocaron en la gradilla magnética durante 2 min y se eliminó el regulador residual.

El ADN plasmático se eluyó al agregar 100 µl de regulador de elución (Tris 10 mM, pH 8,0) a cada tubo y las perlas se resuspendieron mediante vórtex durante 10 segundos, asegurándose de que el sedimento se resuspendió por completo, luego se incubó a 80°C durante 15 min., en un agitador térmico a 1000 rpm Los tubos se giraron por impulso para eliminar las gotas de la tapa. Y se colocaron en la gradilla magnética durante 2 min. El eluido completo (alrededor de 100 µl) se transfirió a tubos de 2.0 ml previamente marcados.

El ADN plasmático se convirtió en bisulfito al agregar los siguientes reactivos al eluido: 150 µl de solución de bisulfito (ABS, solución de bisulfito de amonio, utilizando únicamente tubos sin abrir, descartando tubos utilizados) y 25 µl de regulador de protección (contiene THFA) (5 g Trolox + 40 ml de THFA). Los tubos se cerraron y se agitaron en vórtice durante 10 segundos para mezclarlos completamente. Los tubos se giraron por impulsos para evitar que se vierta líquido en la tapa, luego se colocaron en un bloque térmico o agitador y se incubaron durante 45 minutos a 80°C sin agitar. Los tubos se giraron por impulsos para eliminar las gotas de la tapa, luego las perlas se resuspendieron al agitar en vórtice durante 10 segundos, asegurándose de que todas las perlas se suspendieran por completo. Los siguientes componentes se agregaron en cada reacción de bisulfito en orden: 1000 µl de Lavado A y 20 µl de Perlas magnéticas (Dynabeads MyOne SILANE) hasta un volumen total de 300 ul y mezcladas cuidadosamente al agitar en vórtice, después de lo cual se incubaron en un agitador térmico y se agitaron a 1000 rpm durante 45 minutos a temperatura ambiente. Los tubos se giraron por impulso para eliminar las gotas de la tapa y se colocaron en la gradilla magnética durante 2 minutos para capturar las partículas. Luego, se usó una pipeta nueva para eliminar la mayor cantidad de líquido posible sin tocar las partículas capturadas. Los tubos se quitaron de la gradilla magnética para el procedimiento de lavado. Se agregaron 800 µl de Lavado A y las perlas se enjuagaron de la pared, luego se resuspendieron mediante un vórtex, un tubo de pulso giratorio para eliminar las gotas de la tapa, y se colocaron en la gradilla magnética durante 2 minutos. Utilizando una pipeta nueva se eliminó todo el líquido posible, sin tocar las partículas capturadas. Los tubos se sacaron de la gradilla magnética para el procedimiento de lavado. Se agregaron 800 µl de Lavado B, y las perlas se enjuagaron de la pared, se resuspendieron al agitar en vórtice y se giró por impulso el tubo para eliminar las gotas de la tapa, después de lo cual se colocaron en la gradilla magnética durante 2 minutos. Utilizando una pipeta nueva se eliminó todo el líquido posible, sin tocar las partículas capturadas. Los tubos se sacaron de la gradilla magnética para el procedimiento de lavado. Se agregaron 400 µl de Lavado B y las perlas se enjuagaron de la pared, se resuspendieron al agitar en vórtice, se giraron por impulsos para eliminar las gotas de la tapa y se colocaron en la gradilla magnética durante 2 minutos. Utilizando una pipeta nueva se eliminó todo el líquido posible,

sin tocar las partículas capturadas. Los tubos se giraron brevemente para recoger las gotas restantes en el fondo, se colocaron sobre la gradilla magnética durante 2 minutos y luego se eliminó el líquido residual con una pipeta. El sedimento se dejó secar durante 10 minutos a temperatura ambiente con tubos abiertos sobre el imán.

- 5 Los tubos se transfirieron a una gradilla no magnética y se agregaron 55 µl de regulador de elución (Tris 10 mM, pH 8.0) a cada tubo. A continuación, las perlas se resuspendieron mediante vórtice 20 segundos, después de lo cual los tubos se incubaron a 80°C durante 5 minutos en un agitador térmico a 1000 rpm, luego se agitaron de nuevo durante 10 segundos, se centrifugaron brevemente para recoger todo el líquido en el fondo. Los tubos se colocaron en la gradilla magnética durante 2 min. y el eluido completo se transfirió a una placa de PCR de 96 pozos (o tubos de 0.5 ml prerrotulados).

Las secuencias de sondas y cebadores para ensayo triplex realizado se muestran en la Tabla 2

Tabla 2

| Nombre del Oligo | Gene | Función | Secuencia | SEQ ID NO: |
|--------------------|----------|------------|--------------------------------|------------|
| 10307-92 | RASSF2A | Cebador | ctaaaacctcaacctaac | 21 |
| 10307-94 | RASSF2A | Cebador | gatttagagttgaatgtaaagtaa | 22 |
| 10307-9B1 | RASSF2A | Bloqueador | cctaacaatctctctcaccaccaacaaca | 23 |
| 10307-9taq2 | RASSF2A | Sonda | taccgtaaacgaccccgga | 24 |
| 17378-109 | Septin 9 | Cebador | gttgttattagtattatgt | 25 |
| Sept9 R 102 | Septin 9 | Cebador | aaataatcccatccaacta | 26 |
| Septin9 bloqueador | Septin 9 | Bloqueador | gttattatgttgattttgtggtaatgttag | 27 |
| 17378-10taq4-TAM | Septin 9 | Sonda | ttaaccgcgaaatccgac | 28 |
| HB14.F.2short | HB 14 | Cebador | gtgatggaggagtttagtaagtt | 29 |
| HB14.R.2short | HB 14 | Cebador | ccaataaacctactcctccttaa | 30 |
| HB14.taq1-BNM5 | HB 14 | Sonda | accaccaccaacacacaataacaacaca | 31 |

- 15 Secuencia genómica de Septin9:

Ctgcccaccagccatcatgtcggaccccggtcaacgcgcagctggatgggatcatt (SEQ ID NO: 32)

- 20 Secuencia genómica convertida de bisulfito de Septin9:

Ttgtttattagtattatgtcggatttcgcggttaacgcgtagttggatgggattatt (SEQ ID NO: 33)

- 25 Secuencia genómica de RASSF2A:

Acttagagctgaatgcaaagtaagcgtcgaatgcagaagtagccggggccgccacggcacctgcctcgtcggggcgagagaag acgccaggctgaggtcccag (SEQ ID NO: 34)

Secuencia genómica convertida de bisulfito de RASSF2A:

atttagagttgaatgtaaagtaagcgttcgaaatgtagaagtagtcggggctgttacgggtattgtttcgttcggggcgagagaagacgttag gttgaggttttag (SEQ ID NO: 35)

- 30

Tabla 3

| Etapas CRC | Número de pacientes | SEPTIN9 positivo antes de cirugía | SEPTIN9 positivo después de cirugía | RASSF2A positivo antes de cirugía | RASSF2A positivo después de cirugía |
|------------|---------------------|-----------------------------------|-------------------------------------|-----------------------------------|-------------------------------------|
| Etapas I | 4 | 1/4 | 0/4 | 1/4 | 0/4 |
| Etapas II | 9 | 9/9 | 4/9 | 6/9 | 5/9 |
| Etapas III | 4 | 4/4 | 2/4 | 4/4 | 2/4 |
| Etapas IV | 2 | 2/2 | 2/2 | 2/2 | 2/2 |

- Los resultados muestran que los pacientes con cánceres en etapas I y II tienden a perder la señal de Septin9 y RASF2A después de cirugía, los pacientes con etapa III tienden a retener la señal de Septin9 y RASF2A. Los pacientes con CCR en 2 etapas IV, que ya tienen enfermedad metastásica “retienen” la señal de Septin9 y RASF2A después de cirugía. Esto indica que las metástasis pueden ser detectadas por Septin9 y RASF2A incluso si se extirpa el tumor primario. Los resultados se representan en las Figuras 1-12. Las Figuras 14 y 15 muestran los resultados discutidos de Septin9 y RASF2A en un asunto cuantitativo. Los valores se indican en pg de ADN de Septin9/RASF2A metilado por ml de plasma.
- 5
- Procedimiento para el pronóstico de pacientes con CCR después de la resección curativa del tumor primario:
- 10
- La detección de Septin9 se puede realizar mediante diversas tecnologías de la técnica que pueden detectar la metilación del ADN en sangre/plasma. Es posible un análisis cualitativo, semicuantitativo y/o cuantitativo de mSeptin9 y está altamente relacionado con el uso previsto y la población de pacientes/tumores de interés.
- 15
- Determinación de muestra para análisis
- Para análisis semicuantitativo:
- 20
- Pacientes con tumor de CRC Etapa I, II y III.
- Antes de cirugía señal de Septin9 positiva (1 de 3 mediciones de réplica) = presencia de tumor Después de cirugía de señal de Septin9 negativa = buen pronóstico (3 de 3 mediciones de réplica)
- 25
- Señal de Septin9 después de cirugía 1 de 3 positiva = bajo riesgo
- Señal de Septin9 después de cirugía 2 de 3 positiva = riesgo medio
- Señal de Septin9 después de cirugía 3 de 3 positiva = riesgo alto
- 30
- Pacientes con tumor de CRC Etapa I, II y III.
- Señal de RASF2A antes de cirugía positiva (1 de 3 mediciones de réplica) = presencia de tumor
- Señal de RASF2A después de cirugía negativa = buen pronóstico (3 de 3 mediciones de réplica)
- 35
- Señal de RASF2A después de cirugía 1 de 3 positiva = bajo riesgo
- Señal de RASF2A después de cirugía 2 de 3 positiva = riesgo medio
- 40
- Señal de RASF2A después de cirugía 3 de 3 positiva = riesgo alto
- Para análisis cuantitativo:
- 45
- Pacientes con tumor de CRC Etapa II y III y (IV).
- Detección de magnitud de Septin9 antes y después de cirugía por ejemplo al utilizar un estándar interno.
- Pacientes con tumor de CRC Etapa I, II y III.
- 50
- Septin9 antes de cirugía por encima de 3 pg/ml de plasma = presencia de tumor
- Señal de Septin9 después de cirugía negativa = buen pronóstico (0 pg/ml Septin9)
- 55
- Septin9 después de cirugía > 0 a 3 pg/ml de plasma = bajo riesgo
- Septin9 después de cirugía desde 3 hasta 30 pg/ml de plasma = riesgo medio
- Septin9 después de cirugía por encima de 30 pg/ml de plasma = riesgo alto
- 60
- Detección de magnitud de RASF2A antes y después de cirugía por ejemplo al utilizar un estándar interno.
- Pacientes con tumor de CRC Etapa I, II y III.
- 65
- Antes de cirugía RASF2A por encima de 3 pg/ml de plasma = presencia de tumor
- Señal de RASF2A después de cirugía negativa = buen pronóstico (0 pg/ml de RASF2A en plasma)

ES 2 654 561 T3

RASSF2A después de cirugía -> 0 a 3 pg/ml de plasma = bajo riesgo

RASSF2A después de cirugía desde 3 hasta 30 pg/ml de plasma = riesgo medio

5

RASSF2A después de cirugía por encima de 30 pg/ml de RASSF2A en plasma = riesgo alto

REIVINDICACIONES

1. Procedimiento para

- 5 (i) determinar el pronóstico de un sujeto con cáncer de colon o colorrectal después de cirugía o resección que remueve el tumor primario y antes de un tratamiento después de la cirugía o resección del tumor primario,
- (ii) determinar la necesidad de tratamiento médico adicional para un sujeto con cáncer de colon o colorrectal después del tratamiento que remueve el tumor primario y antes de un tratamiento luego de cirugía o resección de tumor y antes
10 de un tratamiento luego de cirugía o resección,
- (iii) seleccionar un sujeto con cáncer de colon o colorrectal para tratamiento de cáncer adicional después del tratamiento que remueve el tumor primario y antes de un tratamiento luego de cirugía o resección, o
- 15 (iv) determinar, después del tratamiento que remueve el tumor primario y antes de un tratamiento luego de cirugía o resección, si el cáncer de colon o colorrectal de un sujeto con cáncer es metastásico, que comprende las etapas de:
- a. medir el nivel de ADN genómico metilado de SEPTIN9 (SEQ ID NO: 1) que se metila en cáncer de colon o colorrectal, pero no metilado en tejido no canceroso, o un fragmento del mismo, en la sangre obtenida del sujeto antes de que se
20 remueva el tumor primario mediante cirugía o resección (muestra de pretratamiento);
- b. medir el nivel de ADN genómico metilado de SEPTIN9 (SEQ ID NO: 1) o un fragmento del mismo, en la sangre obtenida del sujeto después de que se ha retirado el tumor primario mediante cirugía o resección y antes de un
25 tratamiento luego de cirugía o resección del tumor primario (muestra posterior a tratamiento), por lo cual una cantidad en aumento o equivalente del ADN genómico metilado o fragmento en la muestra posterior a tratamiento después de retiro del tumor primario en comparación con la muestra de pretratamiento indica
- (i) un mal pronóstico,
- 30 (ii) la necesidad de tratamiento de cáncer adicional para el sujeto,
- (iii) seleccionar el sujeto con cáncer para tratamiento de cáncer adicional, o
- (iv) que el cáncer es metastásico.
35
2. El procedimiento de acuerdo con la reivindicación 1, en el que adicionalmente se mide el nivel de ADN genómico metilado de RASSF2A (SEQ ID NO:16), preferiblemente la metilación del ADN genómico se mide por lo menos en una citosina seleccionada del grupo que consiste de las posiciones 21, 28, 30, 37 y 39 de la SEQ ID NO: 32 para SEPTIN9 (SEQ ID NO: 1) y posiciones 25, 29, 46, 52, 58, 70, 74, 79 y 89 de la SEQ ID NO: 34 para RASSF2A (SEQ ID NO: 16).
40
3. El procedimiento de acuerdo con la reivindicación 1, en el que la etapa del cáncer es cáncer colorrectal de Etapa I, Etapa II o Etapa III.
- 45 4. El procedimiento de acuerdo con cualquiera de las reivindicaciones 1 a 3, en el que la sangre es de suero o plasma.
5. El procedimiento de acuerdo con cualquiera de las reivindicaciones 1 a 4, en el que el ADN genómico metilado o un fragmento se mide cuantitativamente, o cuantitativamente en parte, cuantitativamente en parte y cualitativamente en parte o semicuantitativamente.
50
6. El procedimiento de acuerdo con cualquiera de las reivindicaciones 1 a 5, en el que el ADN genómico metilado o un fragmento se mide mediante MethyLight™, HeavyMethyl™ o PCR específico para metilación.
7. El procedimiento de acuerdo con cualquiera de las reivindicaciones 1 a 6, en el que medir el ADN genómico metilado o un fragmento comprende poner en contacto ADN genómico de la sangre con por lo menos un reactivo, o series de reactivos que se distingue entre dinucleótidos CpG metilados y no metilados dentro de por lo menos una región objetivo del ADN genómico, en la que la región objetivo comprende, o se hibrida bajo condiciones rigurosas a una secuencia de por lo menos 9, por lo menos 16 o por lo menos 25 nucleótidos contiguos de la SEQ ID NO: 1, en la que dichos nucleótidos contiguos comprenden por lo menos una secuencia de dinucleótidos CpG, en la que dicho reactivo se
60 selecciona preferiblemente del grupo que comprende bisulfito, hidrógeno sulfito, bisulfito, y combinaciones de los mismos.
8. El procedimiento de acuerdo con cualquiera de las reivindicaciones 1 a 7, en el que el nivel de ADN genómico metilado se mide para SEPTIN9 (SEQ ID NO: 1) y opcionalmente para RASSF2a (SEQ ID NO: 16), y en el que el ADN genómico metilado o fragmento se mide mediante MethyLight™, HeavyMethyl™ o PCR específico para metilación.
65

9. Un procedimiento para:

- 5 (i) determinar el pronóstico de un sujeto con cáncer de colon o colorrectal después de cirugía o resección que remueve el tumor primario y antes de un tratamiento luego de retiro del tumor primario,
- (ii) determinar la necesidad de tratamiento médico adicional para un sujeto con cáncer después que se remueve el tumor primario de colon o colorrectal y antes de un tratamiento luego de cirugía o resección,
- 10 (iii) seleccionar un sujeto con cáncer de colon o colorrectal para tratamiento de cáncer adicional después del tratamiento que remueve el tumor primario y antes de un tratamiento luego de retiro del tumor primario, o
- (iv) determinar, después de cirugía y resección que remueve el tumor primario, si el cáncer de colon o colorrectal de un sujeto con cáncer es metastásico y antes de un tratamiento después de la cirugía o resección, que comprende las etapas de:
- 15 a. medir el nivel de la expresión de gen y/o su promotor o elementos reguladores o un fragmento del mismo, y opcionalmente del gen RASSF2A y/o su promotor o elementos reguladores o un fragmento del mismo en la sangre obtenida del sujeto antes de que se remueva el tumor primario mediante cirugía o resección (muestra de pretratamiento);
- 20 b. medir el nivel de la expresión de gen y/o su promotor o elementos reguladores o un fragmento del mismo, y opcionalmente del gen RASSF2A y/o su promotor o elementos reguladores o un fragmento del mismo en la sangre obtenida del sujeto después de que se ha retirado el tumor primario mediante cirugía y resección y antes de un tratamiento después de la cirugía o resección (muestra posterior a tratamiento), por lo cual una cantidad en aumento o equivalente de la expresión de gen y/o su promotor o elementos reguladores o un fragmento del mismo, y
- 25 opcionalmente del gen RASSF2A y/o su promotor o elementos reguladores o un fragmento del mismo en la muestra posterior a tratamiento después de cirugía y resección en comparación con la muestra de pretratamiento indica
- (i) un mal pronóstico,
- 30 (ii) la necesidad de tratamiento de cáncer adicional para el sujeto,
- (iii) seleccionar el sujeto con cáncer para tratamiento de cáncer adicional, o
- 35 (iv) que el cáncer es metastásico.

Fig. 1

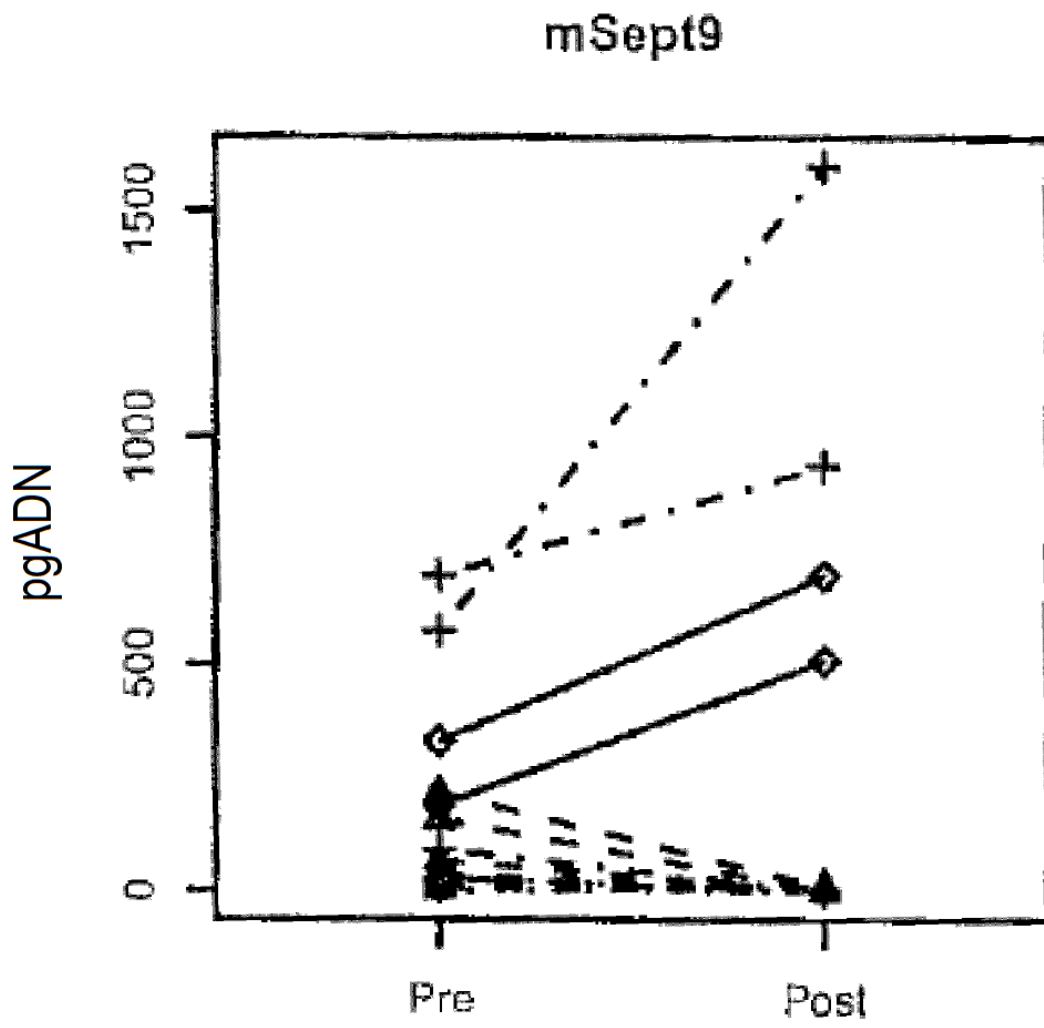


Fig. 2

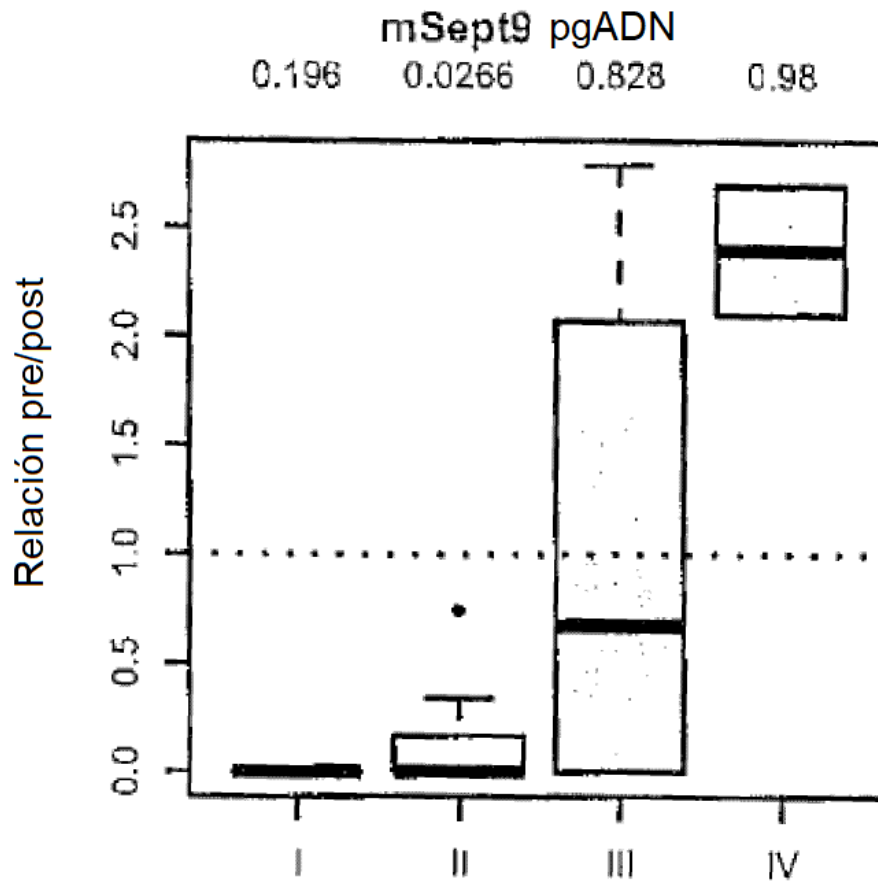


Fig. 3

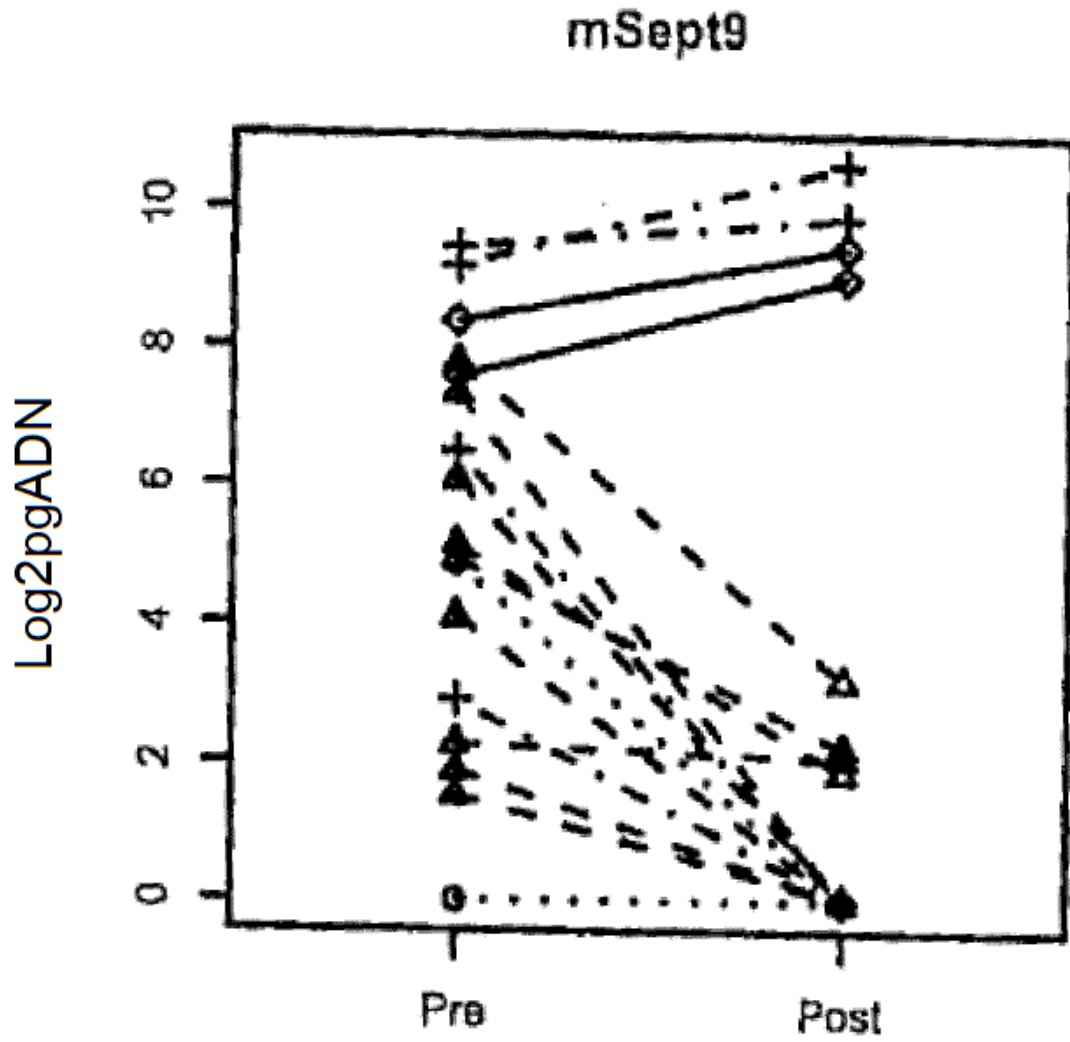


Fig. 4

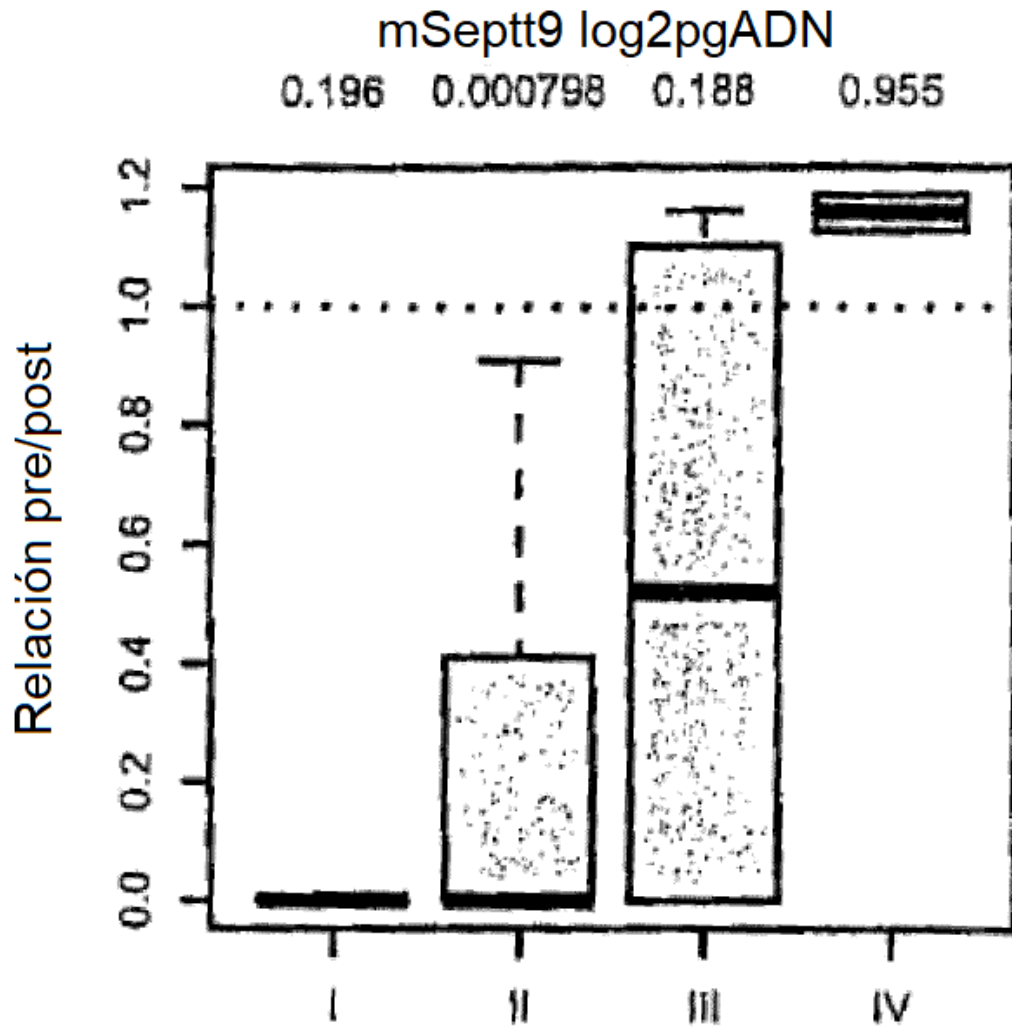


Fig. 5

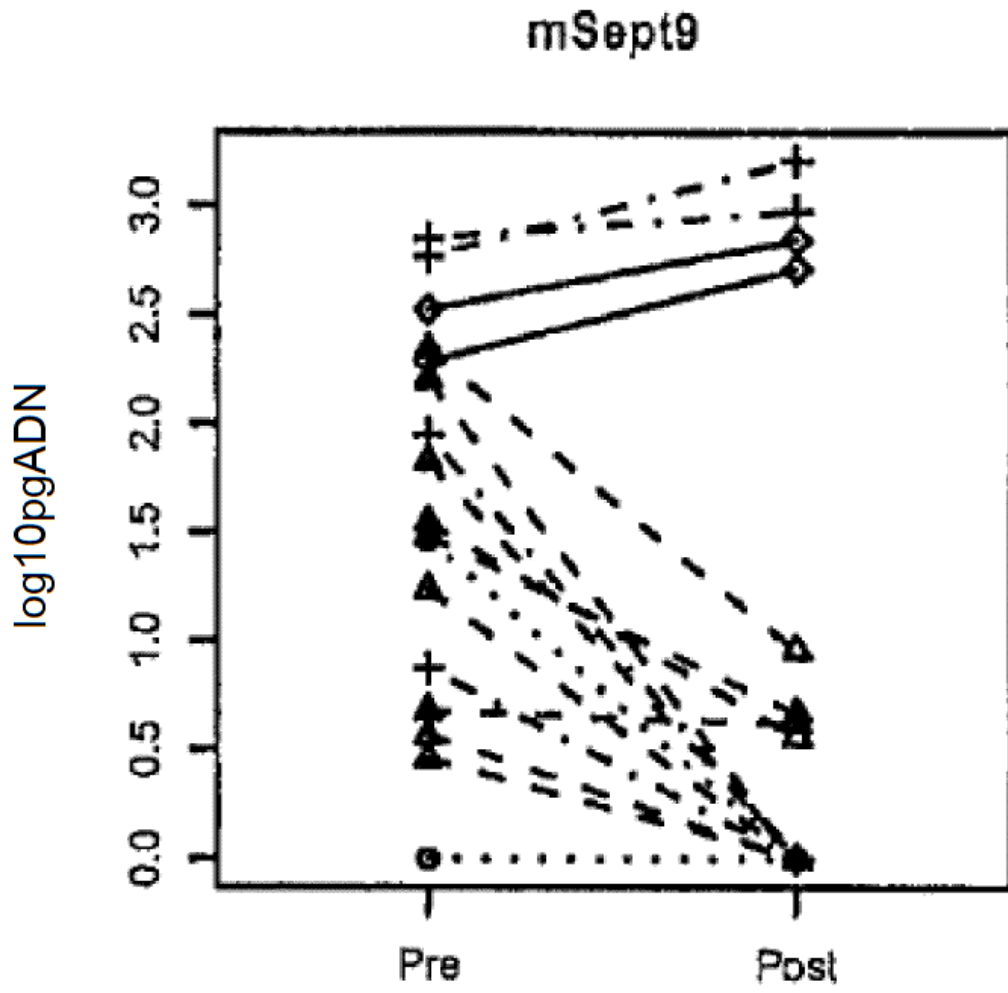


Fig. 6

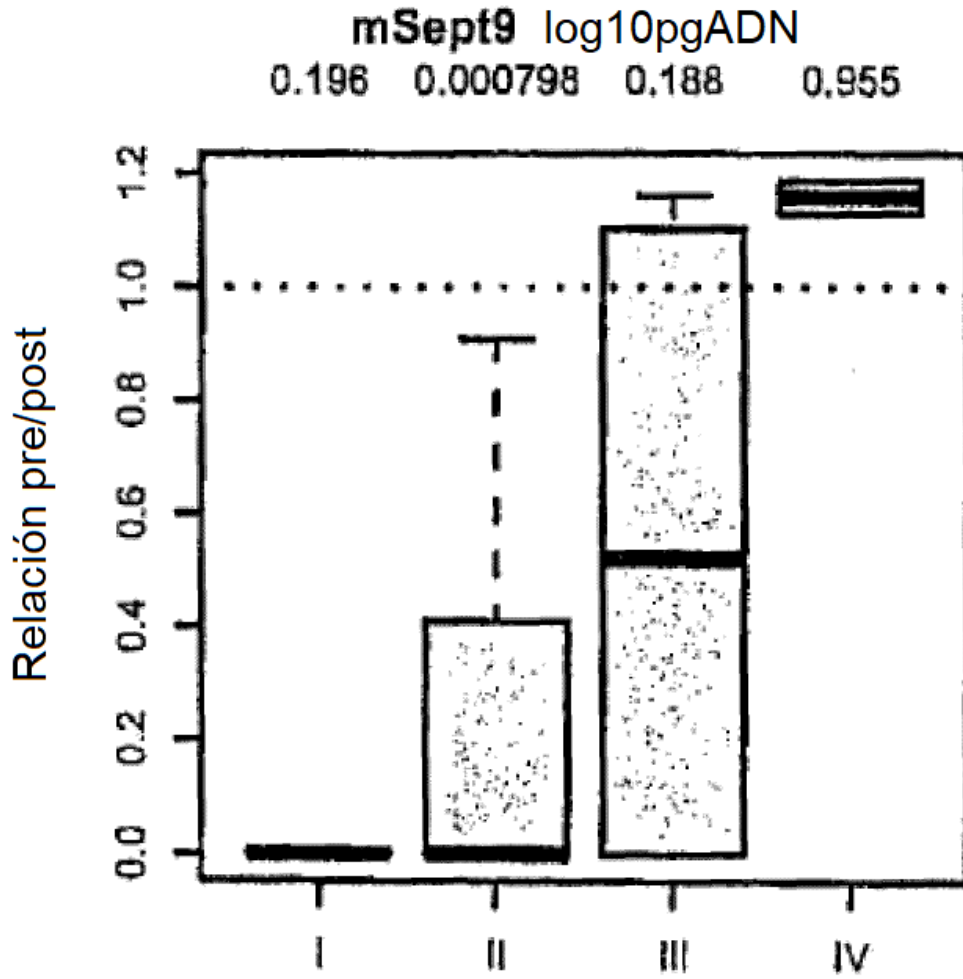


Fig. 7

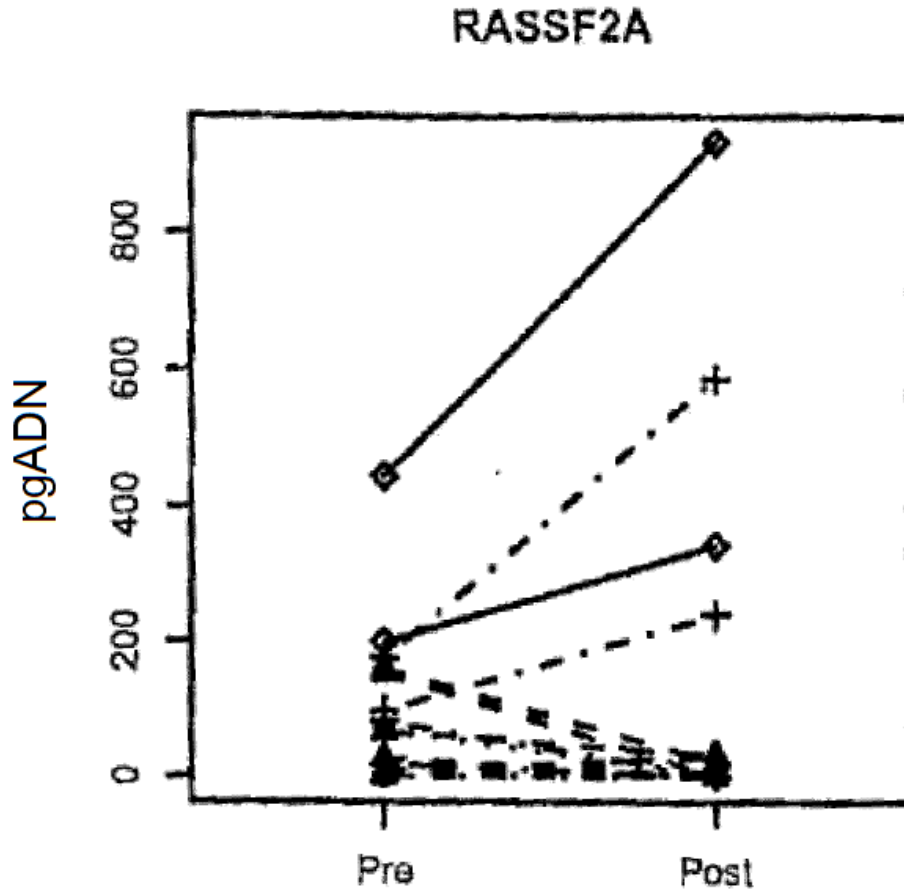


Fig. 8

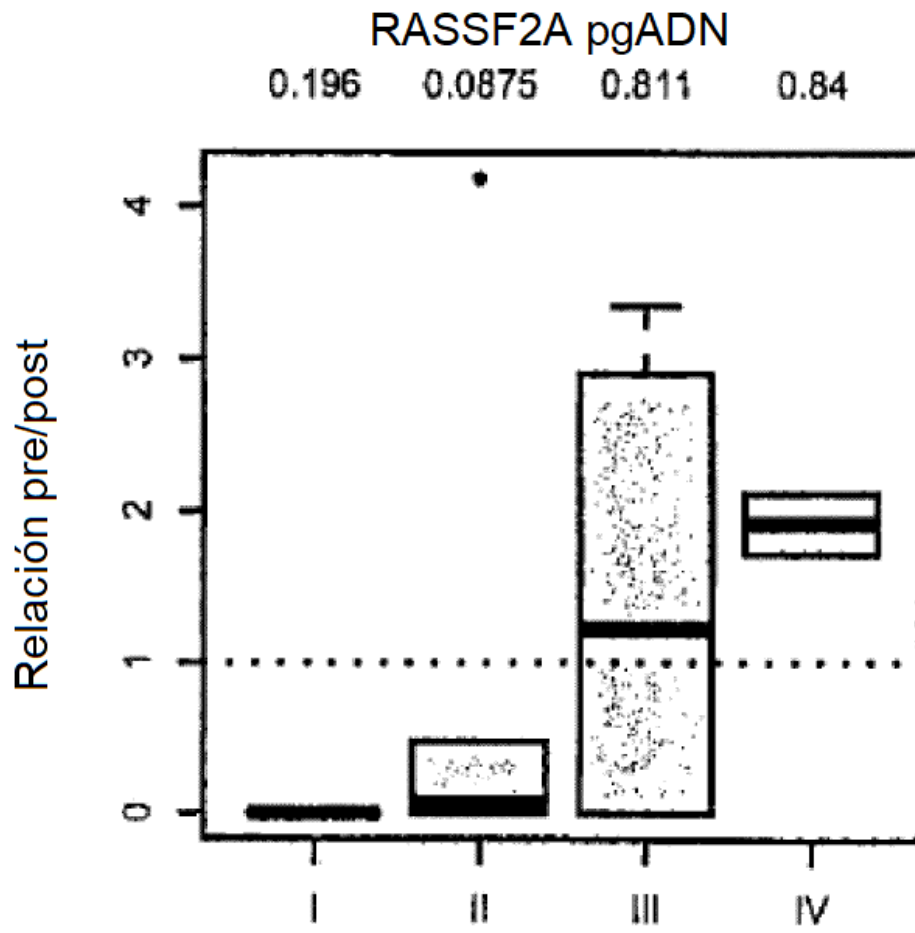


Fig. 9

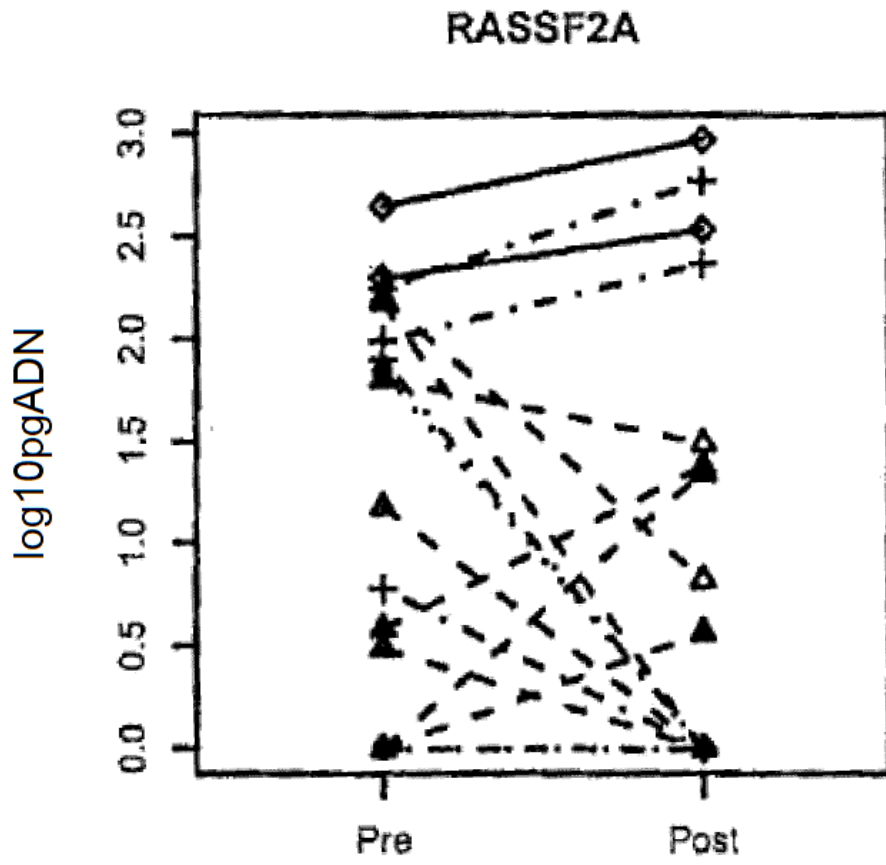


Fig. 10

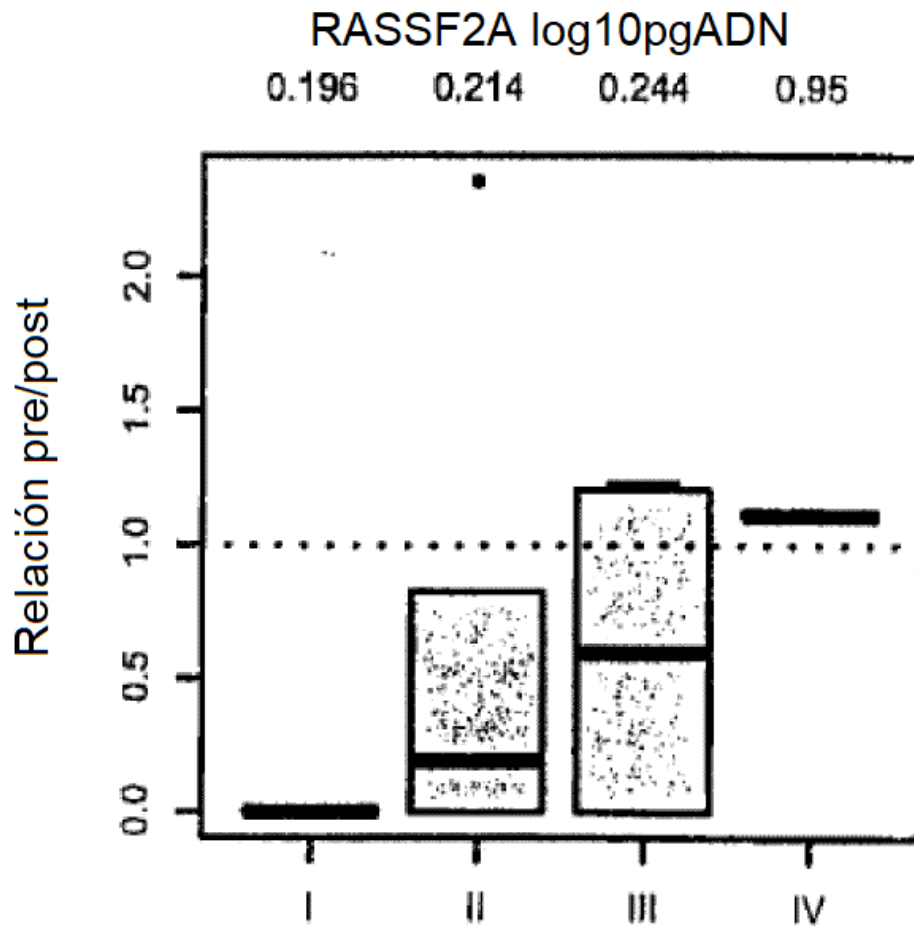


Fig. 11

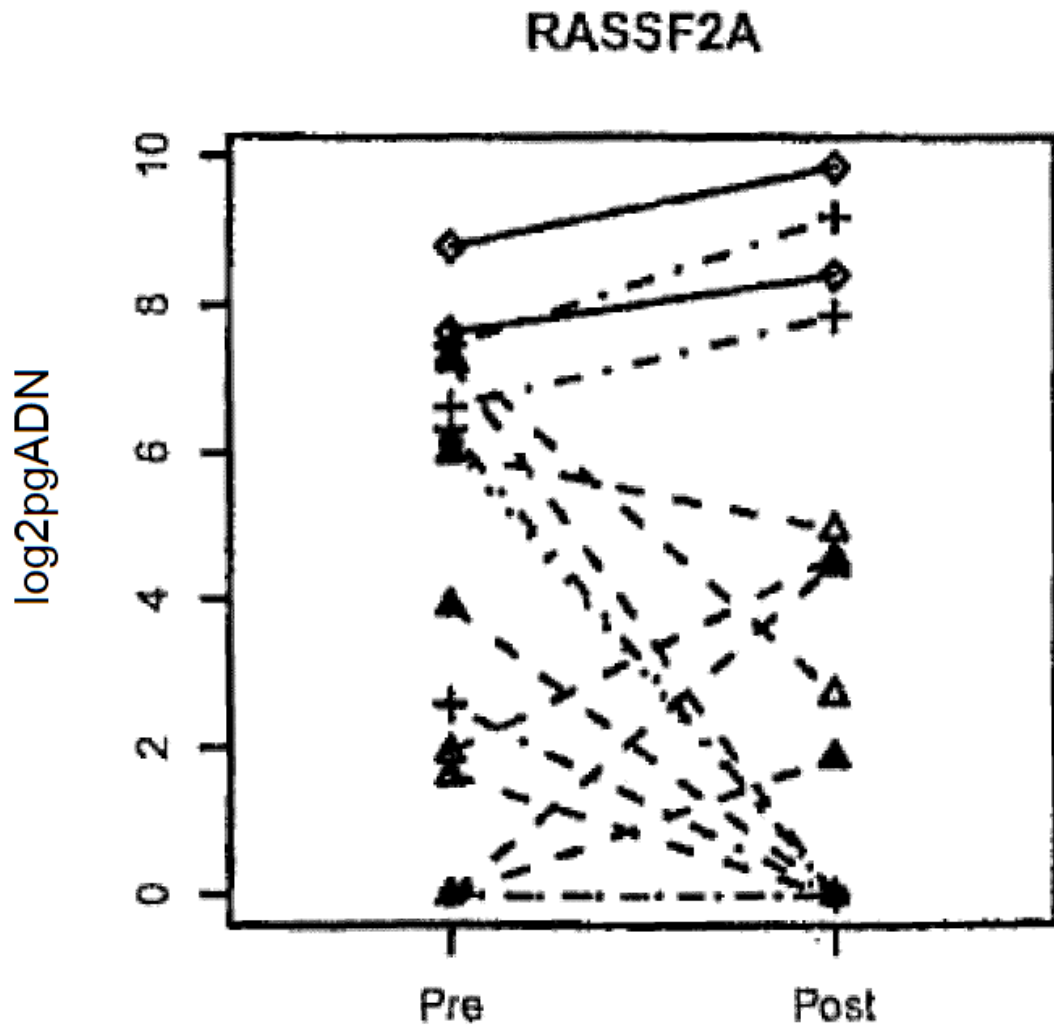


Fig. 12

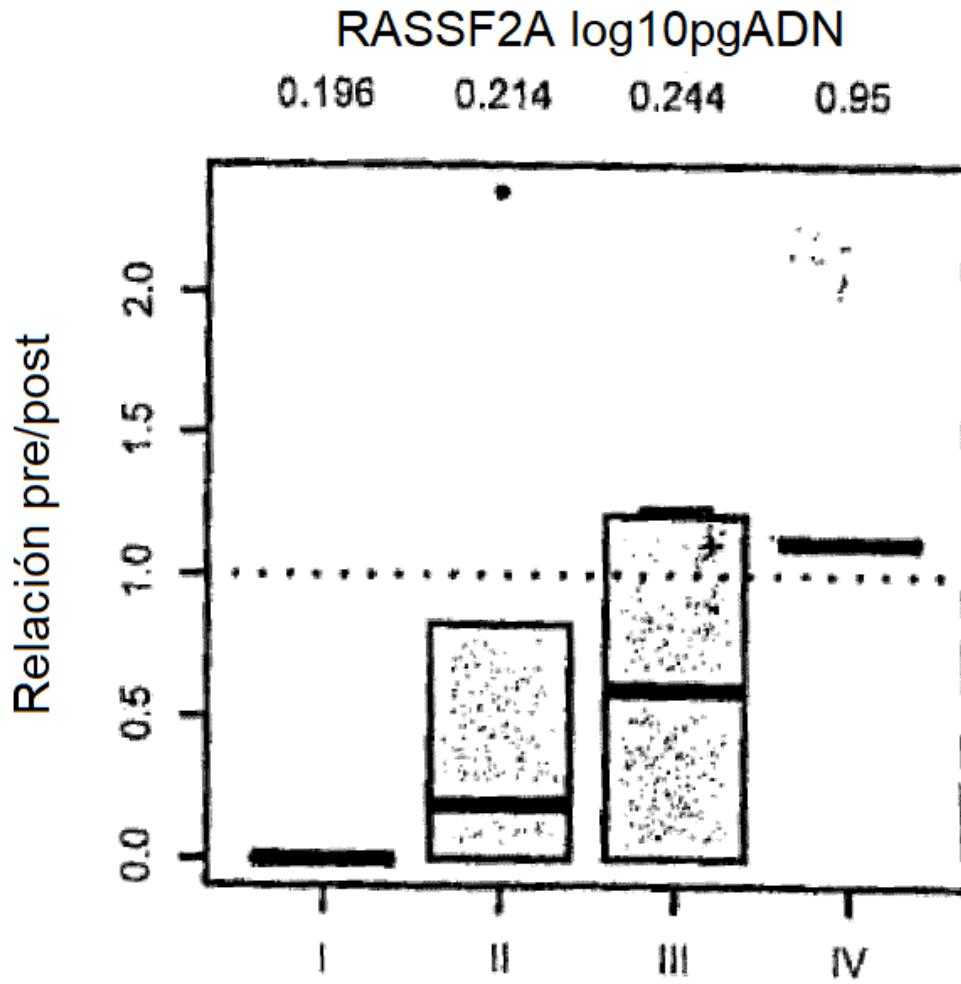
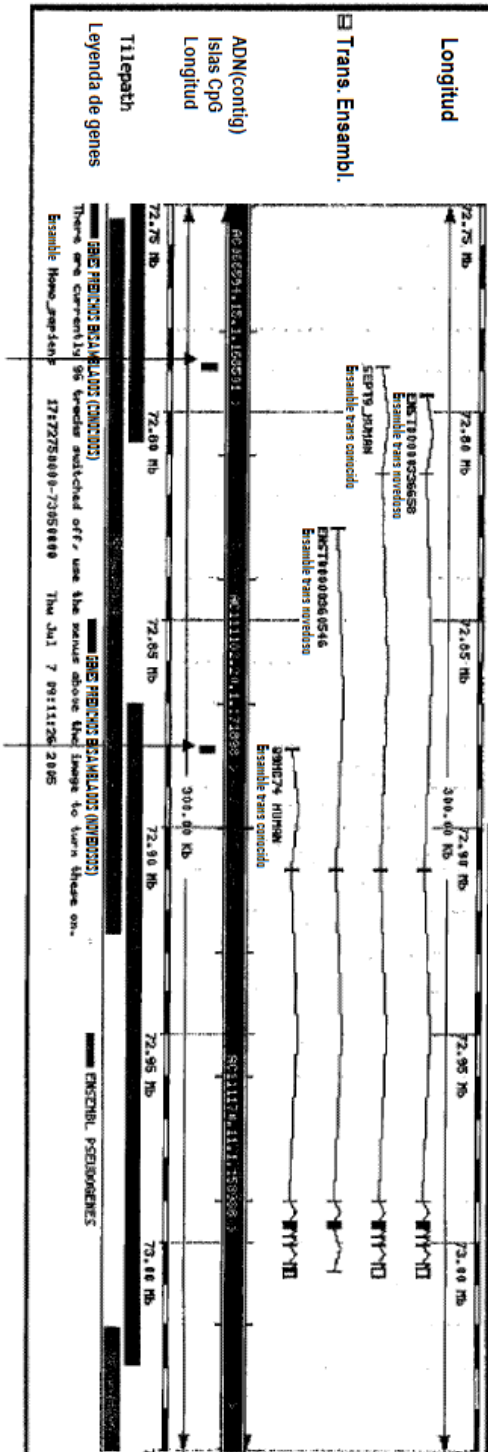


Fig. 13



SEQ ID NO: 2

SEQ ID NO: 3

Fig. 14

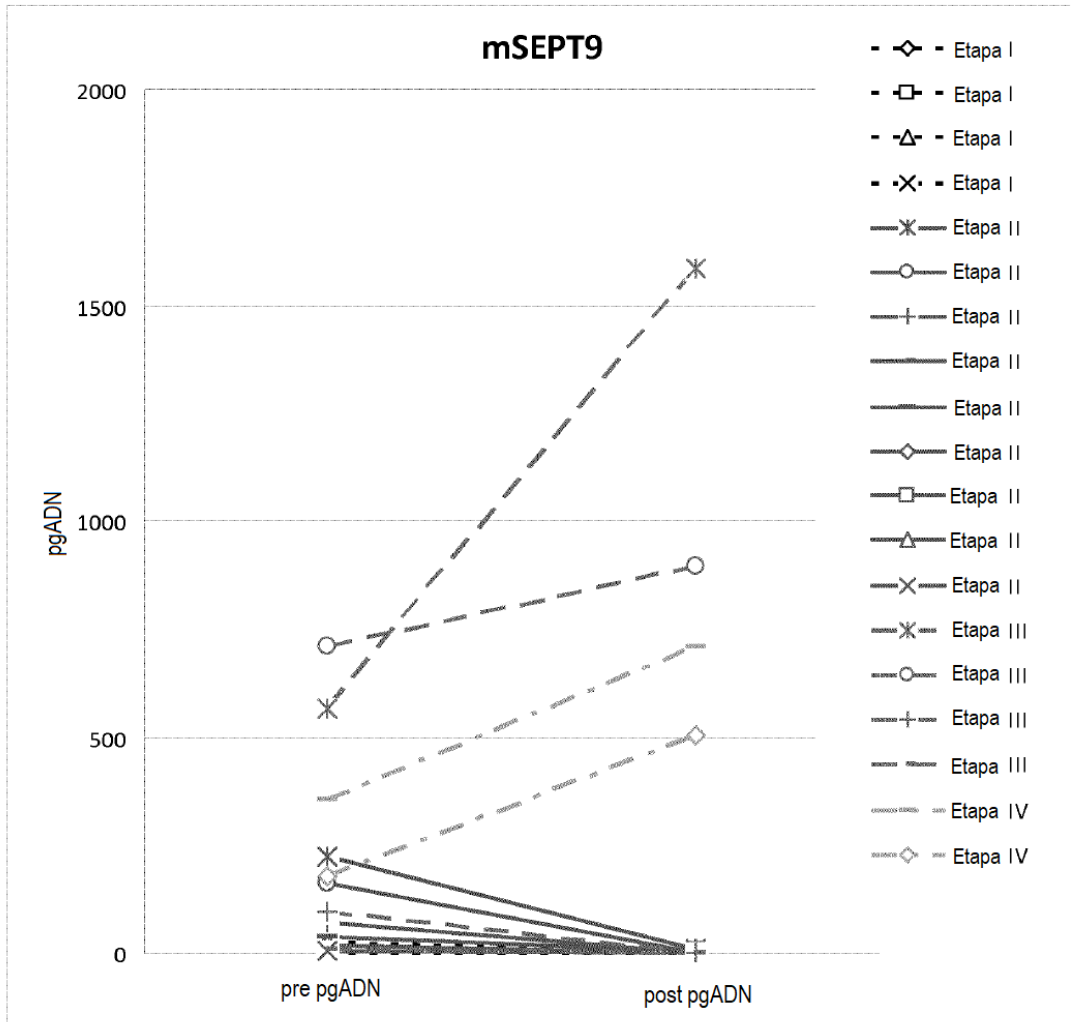


Fig. 15

