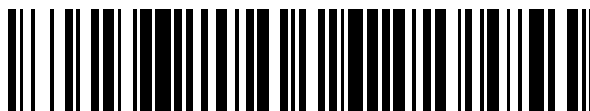


19



OFICINA ESPAÑOLA DE
PATENTES Y MARCAS

ESPAÑA



11 Número de publicación: **2 659 325**

51 Int. Cl.:

C12Q 1/68 (2008.01)

C07H 21/00 (2006.01)

12

TRADUCCIÓN DE PATENTE EUROPEA

T3

96 Fecha de presentación y número de la solicitud europea: **23.06.2004 E 10174462 (1)**

97 Fecha y número de publicación de la concesión europea: **03.01.2018 EP 2354248**

54 Título: **Métodos para el análisis de trastornos proliferativos de células colorrectales**

30 Prioridad:

23.06.2003 US 602494

23.06.2003 US 603138

06.05.2004 EP 04090175

27.02.2004 EP 04090072

03.10.2003 US 679062

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

14.03.2018

73 Titular/es:

**EPIGENOMICS AG (100.0%)
Kleine Präsidentenstrasse 1
10178 Berlin, DE**

72 Inventor/es:

**LOFTON-DAY, CATHY;
MODEL, FABIAN;
SLEDZIEWSKI, ANDREW;
RUJAN, TAMAS;
LEWIN, JÖRN y
DISTLER, JÜRGEN**

74 Agente/Representante:

SÁEZ MAESO, Ana

ES 2 659 325 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

Métodos para el análisis de trastornos proliferativos de células colorrectales

Campo de la invención

5 La presente invención se refiere a métodos que usan secuencias de ADN genómico que exhiben patrones de metilación alterados de CpG en estados de enfermedad con respecto a la normalidad. Realizaciones particulares de estos métodos de divulgación, ácidos nucleicos, matrices de ácidos nucleicos y kits útiles para detectar, o para detectar y diferenciar entre dos o más trastornos proliferativos de células colorrectales.

Antecedentes

10 Se sabe que la etiología de estados patógenos involucra patrones de metilación modificados de genes individuales o del genoma. La 5-metilcitosina, en el contexto de secuencias de dinucleótido CpG, es la base modificada covalentemente más frecuente en el ADN de las células eucariotas, y desempeña un papel en la regulación de la transcripción, la impronta genética, y la tumorigénesis. La identificación y cuantificación de los sitios 5-metilcitosina en un espécimen específico, o entre dos o más de una pluralidad de especímenes, es por tanto de considerable interés, no sólo en la investigación, sino en particular para los diagnósticos moleculares de diversas enfermedades.

15 *Correlación de la metilación aberrante del ADN con el cáncer.* La metilación aberrante del ADN dentro de 'islas' CpG se caracteriza por hiper o hipometilación de secuencias de dinucleótidos CpG que conduce a la anulación o la sobreexpresión de un amplio espectro de genes, y es una de las primeras y más comunes alteraciones encontradas, y correlacionadas con tumores malignos humanos. Además, se ha demostrado que la metilación anormal se produce en los elementos reguladores ricos en CpG en partes intrónicas y codificantes de los genes para determinados tumores. En el cáncer de colon, por ejemplo, la metilación aberrante del ADN constituye uno de las alteraciones más destacadas e inactiva muchos genes supresores de tumores tales como p14ARF, p16INK4a, THBS1, MINT2 y MINT31 y genes reparadores de la falta de correlación del ADN como hMLH1.

20 En contraste con la hipermetilación específica de genes supresores de tumores, se puede observar una hipometilación total del ADN en las células tumorales. Esta disminución en la metilación global puede ser detectada tempranamente, mucho antes del desarrollo de la formación franca de tumores. Se ha determinado una correlación entre la hipometilación y el aumento de la expresión génica para muchos oncogenes.

25 En los Estados Unidos, la incidencia anual de cáncer colorrectal es de aproximadamente 150.000, con 56.600 individuos que mueren por cáncer colorrectal cada año. El riesgo de por vida de cáncer colorrectal en la población general es de aproximadamente de 5 a 6 por ciento. A pesar de los intensos esfuerzos de los últimos años en el cribado y la detección temprana de cáncer de colon, hasta hoy en día la mayoría de los casos son diagnosticados en una etapa avanzada con metástasis regional o distante. Aunque las opciones terapéuticas incluyen cirugía y quimioterapia adyuvante o paliativa, la mayoría de los pacientes mueren a causa del avance de su cáncer a los pocos meses. Identificar los cambios moleculares que subyacen en el desarrollo del cáncer de colon pueden ayudar a desarrollar nuevas opciones de control, detección, diagnóstico y terapéuticas que podrían mejorar el mal pronóstico global de estos pacientes.

30 Las directrices actuales para detección colorrectal de acuerdo con la Sociedad Americana del Cáncer utiliza una de las cinco diferentes opciones para la detección en individuos de riesgo promedio de 50 años de edad o mayores. Estas opciones incluyen 1) pruebas de sangre oculta en las heces (FOBT) cada año, 2) sigmoidoscopia flexible cada cinco años, 3) FPBT anual más sigmoidoscopia flexible cada cinco años, 4) el enema de bario de doble contraste (DCBE) cada cinco años o 5) colonoscopia cada diez años. Aunque estos procedimientos de análisis son bien aceptados por la comunidad médica, la implementación de la detección generalizada del cáncer colorrectal no se ha realizado. La conformidad del paciente es un factor importante para un uso limitado debido a la incomodidad o inconveniencia asociada con los procedimientos. La prueba FOBT, aunque no es un procedimiento invasivo, requiere de una restricción en la dieta y otras restricciones 3-5 días antes de la prueba. Los niveles de sensibilidad de este análisis también son muy bajos para el adenocarcinoma colorrectal con gran variabilidad dependiendo del ensayo. Las mediciones de sensibilidad para la detección de adenomas es incluso menor ya que la mayoría de los adenomas no sangran. En contraste, la sensibilidad para los procedimientos más invasivos como la sigmoidoscopia y la colonoscopia es bastante más alta debido a la visualización directa del canal central del colon. Ninguno de los ensayos aleatorios han evaluado la eficacia de estas técnicas, sin embargo, a partir de los datos de los estudios de control de casos y datos del Estudio Nacional de Pólipos (US) se ha demostrado que la eliminación de pólipos adenomatosos resulta en una reducción del 76-90% en la incidencia de CRC. La sigmoidoscopia tiene la limitación de visualizar solamente el lado izquierdo del colon dejando las lesiones en el colon derecho sin detectar. Ambos procedimientos de detección son costosos, requieren de una preparación catártica y tienen mayor riesgo de morbilidad y mortalidad. Se requieren claramente mejores pruebas con mayor sensibilidad, especificidad, facilidad de uso y disminución de los costes antes de que la detección amplia y generalizada del cáncer colorrectal se convierta en rutinaria.

55 La detección temprana del cáncer colorrectal se basa generalmente en la prueba de sangre oculta en las heces (FOBT) realizada anualmente en individuos asintomáticos. Las recomendaciones actuales adaptadas por varias

- organizaciones de salud, incluida la Sociedad Americana del Cáncer, piden que las pruebas de sangre oculta en las heces comiencen a los 50 años, que se repite cada año hasta que el paciente ya no se beneficie más de este sistema de detección. Una FOBT positiva conduce a un examen por colonoscopia del intestino, un procedimiento costoso e invasivo, con una tasa de complicaciones serias de una por cada 5.000 exámenes. Sólo el 12% de los
- 5 pacientes con heces positivas para sangre son diagnosticadas con cáncer o pólipos grandes en el momento de la colonoscopia. Una cantidad de estudios muestran que la detección mediante FOBT no mejora la mortalidad relacionada con el cáncer o la supervivencia general. El cumplimiento de la prueba de sangre oculta ha sido pobre; menos del 20 por ciento de la población se ofrece o cumple con FOBT como se recomienda. Si FOBT se hace correctamente, el paciente recoge una muestra fecal de tres deposiciones consecutivas. Las muestras se obtienen
- 10 mientras el paciente se adhiere a las directrices dietéticas y evita medicamentos que se sabe que inducen sangrado gastrointestinal oculto. En realidad, los médicos con frecuencia no instruyen a los pacientes adecuadamente, los pacientes con frecuencia no logran cumplir con el protocolo, y algunos pacientes encuentran la tarea de recoger las muestras fecales difícil o desagradable, por lo tanto, el cumplimiento con la prueba anual de sangre oculta es pobre. Si la sensibilidad y especificidad de la prueba pueden ser mejorados respecto a los métodos actuales, se podría
- 15 reducir la frecuencia de las pruebas, se eliminaría la recolección de muestras consecutivas, se eliminarían las modificaciones del programa de la dieta y la medicación, y mejoraría el cumplimiento del paciente. Para agravar el problema de la conformidad, la sensibilidad y la especificidad de FOBT para detectar el cáncer de colon es pobre. La pobre especificidad de la prueba conduce a una colonoscopia innecesaria, añadiendo costos considerables para la detección del cáncer de colon.
- 20 Se ha calculado que la especificidad de la FOBT es en el mejor de los casos del 96%, con una sensibilidad del 43% (adenomas) y del 50% (carcinoma colorrectal). La sensibilidad se puede mejorar usando un inmunoensayo FOBT tal como aquel producido bajo el nombre comercial 'InSure^{MR}', con una sensibilidad mejorada del 77% (adenomas) y 88,9% (carcinoma colorrectal).
- 25 Los marcadores moleculares de una enfermedad ofrecen varias ventajas sobre otros tipos de marcadores, siendo una de las ventaja que incluso muestras de tamaños muy pequeños y/o muestras cuya arquitectura del tejido no se ha mantenido pueden ser analizadas muy eficientemente. En la última década se ha demostrado que una cantidad de genes son expresados diferencialmente entre carcinomas normales y de colon. Sin embargo, ningún marcador individual o combinación de marcadores ha demostrado ser suficiente para el diagnóstico de carcinomas de colon. Enfoques basados en ARNm de alta dimensión han demostrado recientemente ser capaces de proporcionar un
- 30 mejor medio para distinguir entre diferentes tipos de tumores y lesiones benignas y malignas. Sin embargo, su aplicación como herramienta de diagnóstico de rutina en un entorno clínico se ve impedida por la extrema inestabilidad del ARNm, los cambios de expresión que ocurren rápidamente después de ciertos desencadenantes (por ejemplo, la recolección de la muestra), y, sobre todo, la gran cantidad de ARNm necesaria para el análisis (Lipshutz, RJ y colaboradores, Nature Genetics 21: 20-24, 1999; Bowtell, DDL Nature genetics suppl. 21: 25-32, 1999), que a menudo no se puede obtener a partir de una biopsia de rutina.
- 35 Se ha sugerido el uso de marcadores biológicos para mejorar aún más la sensibilidad y especificidad de FOBT; los ejemplos de tales pruebas incluyen el ensayo de análisis de heces PreGen-Plus^{MR} disponible a través de EXACT Sciences, que tiene una sensibilidad del 20% (adenoma) y 52% (carcinoma colorrectal) y una especificidad del 95% en ambos casos. Estos ensayos prueban la presencia de 23 mutaciones del ADN asociadas con el desarrollo de neoplasias de colon. El uso de la metilación del ADN como marcadores de cáncer de colon es conocido. Por ejemplo Sabbioni y colaboradores (Molecular Diagnosis 7: 201-207, 2003) detectó hipermetilación de un grupo de genes que consiste de TPEF, HIC1, DAPK y MGMT en sangre periférica en el 98% de pacientes con carcinoma de colon. Sin embargo, esto proporciona una base adecuada para una prueba que puede ser distribuida comercialmente ya que la especificidad de tal prueba también debe ser suficientemente alta.
- 40 El modelo actual de patogénesis colorrectal favorece una progresión gradual de los adenomas, que incluye el desarrollo de displasia y finalmente signos de cáncer invasivo. Los cambios moleculares que subyacen a esta secuencia de adenoma-carcinoma incluyen alteraciones genéticas y epigenéticas de genes supresores de tumores (APC, p53, DCC), la activación de oncogenes (K-ras) y la inactivación de los genes que reparan la falta de coincidencia del ADN. Recientemente, se han revelado más cambios moleculares y defectos genéticos. Por lo tanto,
- 45 la activación de la ruta de señalización de Wnt no sólo incluye mutaciones del gen APC, sino que también puede ser el resultado de mutaciones de β -catenina. Por otra parte, las alteraciones en la ruta de señalización de TGF- β junto con sus transductores de señal SMAD4 y SMAD2 se han relacionado con el desarrollo de cáncer de colon.
- 50 A pesar de los recientes avances en la comprensión de la patogénesis de los adenomas y carcinomas de colon y sus cambios genéticos y moleculares, los cambios genéticos y epigenéticos subyacentes al desarrollo de metástasis no son tan bien comprendidos. Sin embargo, generalmente es bien aceptado que el proceso de la invasión y la proteólisis de la matriz extracelular, así como la infiltración de la membrana basal vascular implican proteínas adhesivas, tales como los miembros de la familia de receptores de la integrina, las cadherinas, la superfamilia de las inmunoglobulinas, la proteína de enlazamiento a laminina y el receptor CD44. Además de la adhesión, el proceso de formación de metástasis también incluye la inducción y regulación de la angiogénesis (VEGF, bFGF), la inducción de
- 55 la proliferación celular (EGF, HGF, IGF) y la activación de enzimas proteolíticas (MMP, TIMP, uPAR), así como la inhibición de la apoptosis (Bcl-2, Bcl-X). Más recientemente otros grupos han comparado los cambios genéticos y moleculares en las lesiones metastásicas con los cambios encontrados en los cánceres colorrectales primarios. Por
- 60

lo tanto, Kleeff y colaboradores reportaron la pérdida de DOC-2, un gen candidato supresor de tumores, tanto en cáncer colorrectal primario como metastásico. Además, Zauber y colaboradores reportaron que en su serie de 42 cánceres colorrectales las mutaciones de Ki-ras en los cánceres primarios fueron idénticas en todas las 42 lesiones metastásicas primarias y sincrónicas emparejadas. Del mismo modo, la pérdida de heterocigosidad en el locus APC era idéntico para 39 carcinomas emparejados y metástasis sincrónica. Los autores concluyeron que para los genes Ki-ras y APC los cambios genéticos en la metástasis son idénticos para el cáncer colorrectal primario. Sin embargo, otros grupos han encontrado cambios genéticos y moleculares en los cánceres de colon metastásicos, que no están presentes en los cánceres primarios. Por lo tanto, se ha reportado del desarrollo de LOH del cromosoma 3p en metástasis colorrectal. Además, usando hibridación genómica comparativa, se encontraron varias alteraciones en la metástasis del hígado que eran únicas para las lesiones metastásicos (-9q, -11q, y -17q).

Además de las mutaciones, se ha demostrado que la metilación aberrante de las islas CpG conduce al silenciamiento transcripcional de ciertos genes que han sido previamente vinculados a la patogénesis de diversos cánceres. Las islas CpG son secuencias cortas que son ricas en dinucleótidos CpG y por lo general se pueden encontrar en la región 5' de aproximadamente 50% de todos los genes humanos. La metilación de las citosinas en estas islas conduce a la pérdida de la expresión génica y ha sido reportada en la inactivación del cromosoma X y la impronta genómica.

Recientemente, varios grupos también han analizado la metilación de diversos genes en el cáncer colorrectal y reportaron el silenciamiento transcripcional mediante metilación del promotor de p16INK4, p14ARF, p15INK4b, MGMT, hMLH1, GSTP1, DAPK, CDH1, TIMP-3 y APC entre otros. Por lo tanto, aparte de la inactivación mutacional de ciertos genes, la hipermetilación de estos genes también contribuye significativamente a la patogénesis de esta enfermedad.

En los últimos años se han identificado varios genes que están metilados en el cáncer de colon por MS-APPCR. Este grupo de genes, entre otros, incluye TPEF/HPP1 que está frecuentemente metilado en los cánceres de colon y que fue identificado independientemente por dos grupos diferentes utilizando el método MS-APPCR (véase, por ejemplo, Young J, Biden KG, Simms LA, Huggard P, Karamatic R, Eyre HJ, Sutherland GR, Herath N, Barker M, Anderson GJ, Fitzpatrick DR, Ramm GA, Jass JR, Leggett BA. HPP1: un gen que codifica la proteína transmembrana comúnmente metilado en los pólipos colorrectales y cánceres. Proc Natl Acad Sci EE.UU. 98: 265 - 270, 2001).

Enfoque multifactorial. El diagnóstico del cáncer se ha basado tradicionalmente en la detección de marcadores moleculares individuales (por ejemplo, mutaciones genéticas, niveles elevados de PSA). Desafortunadamente, el cáncer es un estado de enfermedad en el que los marcadores individuales han fallado típicamente para detectar o diferenciar muchas formas de la enfermedad. Por lo tanto, los ensayos que reconocen solamente un único marcador han demostrado ser de valor predictivo limitado. Un aspecto fundamental de esta invención es que el diagnóstico de cáncer basado en metilación y la detección, el diagnóstico y el seguimiento terapéutico de este tipo de enfermedades proporcionará mejoras significativas sobre el estado de la técnica que utiliza análisis con marcadores individuales mediante el uso de una selección de marcadores múltiples. El enfoque analítico múltiple es particularmente adecuado para el diagnóstico del cáncer ya que el cáncer no es una enfermedad simple, este enfoque de "panel" multifactorial es consistente con la naturaleza heterogénea del cáncer, tanto citológica como clínicamente.

La clave para la implementación exitosa de un enfoque de panel para las pruebas de diagnóstico basadas en metilación es el diseño y el desarrollo de paneles optimizados de marcadores que pueden caracterizar y distinguir estados de enfermedad.

Desarrollo de las pruebas médicas. Dos medidas evaluativas clave de cualquier detección médica o prueba de diagnóstico son su sensibilidad y especificidad, que miden qué tan bien se desempeña la prueba para detectar con precisión a todos los individuos afectados sin excepción, y sin incluir falsamente individuos que no tienen la enfermedad objetivo (valor predictivo). Históricamente, se han criticado muchas pruebas de diagnóstico debido a la escasa sensibilidad y especificidad.

Un verdadero resultado positivo (TP) es cuando la prueba es positiva y está presente la condición. Un falso resultado positivo (FP) es cuando la prueba es positiva, pero no está presente la condición. Un verdadero resultado negativo (TN) es cuando la prueba es negativa y no está presente la condición. Un resultado falso negativo (FN) es cuando la prueba es negativa pero no está presente la condición. En este contexto: Sensibilidad = $TP/(TP + FN)$; Especificidad = $TN/(FP + TN)$; y Valor predictivo = $TP/(TP + FP)$.

La sensibilidad es una medida de la capacidad de una prueba para detectar correctamente la enfermedad objetivo en un individuo que está siendo probando. Una prueba que tiene poca sensibilidad produce una alta tasa de falsos negativos, es decir, individuos que tienen la enfermedad pero que son falsamente identificados como libres de esa enfermedad particular. El peligro potencial de un falso negativo es que el individuo enfermo permanecerá sin diagnosticar y sin tratamiento durante algún período de tiempo, durante el cual la enfermedad puede progresar hasta una etapa posterior en la que los tratamientos, si los hay, pueden ser menos eficaces. Un ejemplo de una prueba que tiene baja sensibilidad es una prueba en sangre con base en una proteína para el VIH. Este tipo de prueba

exhibe pobre sensibilidad, ya que no puede detectar la presencia del virus hasta que la enfermedad está bien establecida y el virus ha invadido el torrente sanguíneo en cantidades sustanciales. En contraste, un ejemplo de una prueba que tiene una alta sensibilidad es la detección de carga viral mediante la reacción en cadena de la polimerasa (PCR). Se logra una alta sensibilidad porque este tipo de prueba puede detectar cantidades muy pequeñas del virus. La alta sensibilidad es particularmente importante cuando las consecuencias de la falta de diagnóstico son altas.

La especificidad, por otro lado, es una medida de la capacidad de una prueba para identificar con precisión pacientes que están libres del estado de enfermedad. Una prueba de que tiene poca especificidad produce una alta tasa de falsos positivos, es decir, los individuos que son falsamente identificados por tener la enfermedad. Un inconveniente de los falsos positivos es que obligan a los pacientes a someterse a tratamientos de procedimientos médicos innecesarios con sus consiguientes riesgos, tensiones emocionales y financieras, y que pueden tener efectos adversos en la salud del paciente. Una característica de las enfermedades que hace que sea difícil el desarrollo de pruebas de diagnóstico con alta especificidad es que los mecanismos de enfermedad, particularmente en el cáncer, a menudo implican una pluralidad de genes y proteínas. Además, cierta proteínas pueden ser elevadas por razones no relacionadas con un estado de enfermedad. Un ejemplo de una prueba que tiene alta especificidad es una prueba con base en los genes que puede detectar una mutación p53. La especificidad es importante cuando el costo o riesgo asociados con procedimientos de diagnóstico adicionales o mayor intervención médica son muy altos.

Necesidad pronunciada en la técnica. Si se puede aumentar la especificidad de detección de cáncer de colon, el problema de resultados de una prueba como falsos positivos que conduce a un examen colonoscópico innecesario se reduciría lo que llevaría a un ahorro de costes y a una mayor seguridad.

En vista de la incidencia de cáncer de colon y las desventajas asociadas con los métodos actuales de detección de un trastorno proliferativo de células colorrectales, existe una necesidad sustancial en la técnica por métodos mejorados para la detección temprana de trastornos proliferativos de células del colon, en particular cáncer de colon, que se utilizan además de, o como un sustituto de las pruebas actualmente disponibles. Se sabe que el estado de metilación de ciertos genes es importante en el fenotipo de cáncer de colon (Toyota et al. PNAS, vol. 96, 1999, p. 8681-8686; Rashid et al. American Journal of Pathology, vol. 159, no. 3 2011, p. 1129-1135; WO 02/24056; van Rijnsoever et al. Gut, vol. 51, no. 6, 2002, p. 797-802; WO 03/014388), pero hasta ahora no se sabía que el NGFR estuviera hipermetilado en los trastornos proliferativos del colon.

Resumen de la invención

Varios aspectos de la presente divulgación proporcionan paneles eficientes y únicos de genes, por lo cual el análisis de metilación NGFR permite la detección de trastornos proliferativos de células del colon con un valor particularmente alto de sensibilidad, especificidad y/o predictivo. Los métodos de la invención para la prueba de cáncer colorrectal tienen particular utilidad para la detección de las poblaciones en riesgo. Los métodos de la invención tienen ventajas sobre los métodos del estado del arte (incluyendo el estándar de la industria FOBT), debido a la mejora de la sensibilidad, la especificidad y probablemente el cumplimiento por parte del paciente.

La presente invención proporciona nuevos métodos para detectar o distinguir entre trastornos proliferativos de células colorrectales. Dichos métodos se utilizan más preferiblemente para detectar o detectar y distinguir entre uno o más de los siguientes: carcinoma colorrectal, adenoma de colon, tejido inflamatorio del colon, adenomas de colon de grado 2 de displasia menores a 1 cm, adenomas de colon de grado 3 de displasia de adenomas mayores a 1 cm, tejido normal de colon, el tejido no normal de colon, fluidos corporales y tejido de cáncer que no es de colon.

En una realización la invención proporciona un método para detección y/o para detectar y distinguir entre dos o más trastornos proliferativos celulares colorrectales en un sujeto. Dicho método comprende las siguientes etapas: i) poner en contacto el ADN genómico del NGFR aislado a partir de plasma sanguíneo, suero sanguíneo, sangre entera, células sanguíneas aisladas, células aisladas de la sangre obtenida del sujeto con al menos un reactivo, o serie de reactivos que distinguen entre dinucleótidos CpG metilados y no metilados dentro de al menos una región objetivo del ADN genómico, en donde la secuencia de nucleótidos de dicha región objetivo comprende al menos una secuencia de dinucleótido CpG; y ii) detectar, o detectar y distinguir entre dos o más trastornos proliferativos celulares colorrectales proporcionados con una sensibilidad mayor o igual a 80% y una especificidad mayor o igual a 80%.

Preferiblemente, la sensibilidad es de aproximadamente 75% hasta aproximadamente 96%, o de aproximadamente 80% hasta aproximadamente 90%, o de aproximadamente 80% hasta aproximadamente 85%. Preferiblemente, la especificidad es de aproximadamente 75% hasta aproximadamente 96%, o de aproximadamente 80% hasta aproximadamente 90%, o de aproximadamente 80% hasta aproximadamente 85%.

Los métodos actuales usados para detectar y diagnosticar trastornos de proliferación celular colorrectal incluyen colonoscopia, sigmoidoscopia, y cáncer de colon de sangre oculta en las heces. En comparación con estos métodos, la invención divulgada es mucho menos invasiva que la colonoscopia, e igual si no más sensible que la sigmoidoscopia y FOBT. El desarrollo de un ensayo de fluido corporal representa una clara ventaja técnica sobre los

métodos actuales conocidos en la técnica en que se anticipa que la conformidad del paciente para una prueba basada en un solo fluido corporal será más alta que el análisis por triplicado de las heces actualmente recomendado para FOBT.

5 Una realización particular del método divulgado comprende el uso del NGFR como marcador para la diferenciación, detección y distinción de los trastornos proliferativos de células colorrectales.

Dicho uso del gen puede ser posible por medio de cualquier análisis de la expresión del gen, por medio de análisis de la expresión de ARNm o análisis de la expresión de proteínas. Sin embargo, en la realización más preferida de la invención, la detección, diferenciación y distinción de los trastornos proliferativos de células colorrectales es posible por medio de análisis del estado de metilación.

10 La divulgación proporciona un método para el análisis de muestras biológicas para detectar las características asociadas con el desarrollo de trastornos proliferativos de células colorrectales, del método divulgado caracterizado porque ácidos nucleicos o un fragmentos del mismo, de acuerdo con la SEQ ID NO: 7 se pone en contacto con un reactivo o serie de reactivos capaces de distinguir entre los dinucleótidos CpG metilados y no metilados dentro de la secuencia genómica, o secuencias de interés.

15 El método tiene utilidad para el diagnóstico, tratamiento y seguimiento mejorado de trastornos proliferativos de células colorrectales, más concretamente, al permitir la mejor identificación y diferenciación divulgada entre las subclases de dicho trastorno. El método presenta mejoras con respecto al estado de la técnica ya que permite una clasificación muy específica de trastornos proliferativos de células colorrectales, permitiendo de este modo un tratamiento mejorado e informado de los pacientes.

20 Preferiblemente, se selecciona la fuente de la muestra de ensayo del grupo que consiste de células o líneas celulares, portaobjetos histológicos, biopsias, tejidos embebidos en parafina, fluidos corporales, eyaculado, heces, orina, sangre, y sus combinaciones. Preferiblemente, se selecciona la fuente entre el grupo que consiste de heces, plasma sanguíneo, suero sanguíneo, sangre entera, células aisladas de la sangre, células aisladas de la sangre obtenida del sujeto.

25 Específicamente, la presente divulgación proporciona un método para la detección de trastornos proliferativos de células colorrectales, que comprende: obtener una muestra biológica que comprende ácido(s) nucleico(s) genómico(s); poner en contacto el(los) ácido(s) nucleico(s), o un fragmento de los mismos, con un reactivo o una pluralidad de reactivos suficientes para distinguir entre las secuencia de dinucleótidos CpG metiladas y no metiladas dentro de una secuencia objetivo del ácido nucleico objetivo, en donde la secuencia objetivo comprende, o se hibrida en condiciones rigurosas con, una secuencia que comprende al menos 16 nucleótidos contiguos de la SEQ ID NO: 30 7, comprendiendo dichos nucleótidos contiguos al menos una secuencia del dinucleótido CpG; y determinar, basándose al menos en parte en dicha distinción, el estado de metilación de al menos una secuencia de dinucleótido CpG objetivo, o un promedio, o un valor que refleja un estado promedio de metilación de una pluralidad de secuencias de dinucleótidos CpG objetivo. Preferiblemente, la distinción entre las secuencias de dinucleótido CpG 35 metiladas y no metiladas dentro de la secuencia objetivo comprende una conversión o no conversión que depende del estado de metilación de al menos una de tales secuencias del dinucleótido CpG a la correspondiente secuencia del dinucleótido convertida o no convertida dentro de una secuencia seleccionada del grupo que consiste de las SEQ ID NOS: 316, 317, 432 y 433, y las regiones contiguas de la misma correspondientes a la secuencia objetivo.

40 Las realizaciones adicionales proporcionan un método para la detección de trastornos proliferativos de células colorrectales, que comprende: obtener una muestra biológica con ADN genómico del sujeto, extraer el ADN genómico; tratar el ADN genómico, o un fragmento del mismo, con uno o más reactivos para convertir las bases de citosina no metilada de la posición 5 en uracilo o en otra base que sea detectable en forma diferente a la citosina en términos de las 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 45 contigua de al menos 9 nucleótidos de longitud que sea complementaria a, o que hibrida bajo condiciones moderadamente rigurosas o rigurosas con una secuencia seleccionada del grupo que consiste de las SEQ ID NOS: 316, 317, 432 y 433 y complementos de las mismas, en donde el ADN tratado o el fragmento del mismo o bien se amplifica para producir un amplificado, o no se amplifica; y determinar, con base en la presencia o ausencia, o en una propiedad de NGFR dicho amplificado, del estado de metilación divulgado de NGFR al menos una secuencia 50 del dinucleótido CpG en una secuencia de acuerdo con la SEQ ID NO: 7 o un promedio, o un valor que refleja un estado de metilación promedio de una pluralidad de secuencias del dinucleótido CpG de las mismas. Preferiblemente, al menos una de tales moléculas de ácido nucleico que hibridan o molécula de ácido nucleico peptídico está unida a una fase sólida. Preferiblemente, la determinación comprende el uso de al menos un método seleccionado del grupo que consiste de: hibridar al menos una molécula de ácido nucleico que comprende una 55 secuencia contigua de al menos 9 nucleótidos de longitud que es complementaria, o se hibrida en condiciones moderadamente rigurosas o rigurosas con una secuencia seleccionada del grupo que consiste de las SEQ ID NOS: 316, 317, 432 y 433, y complementos de las mismas; hibridar al menos una molécula de ácido nucleico, unida a una fase sólida, que comprende una secuencia contigua de al menos 9 nucleótidos de longitud que es complementaria, o se hibrida en condiciones moderadamente rigurosas o rigurosas con una secuencia seleccionada del grupo que 60 consiste en las SEQ ID NOS: 316, 317, 432 y 433, y complementos de las mismas; la hibridación de al menos una

5 molécula de ácido nucleico que comprende una secuencia contigua de al menos 9 nucleótidos de longitud que sea complementaria, o se hibrida bajo condiciones moderadamente rigurosas o rigurosas con una secuencia seleccionada de entre el grupo que consiste en las SEQ ID NOS: 316, 317, 432 y 433, y complementos de las mismas, y la extensión de al menos una de tales moléculas hibridadas de ácido nucleico por al menos una base de nucleótido; y la secuenciación del amplificado.

10 Otras realizaciones proporcionan un método para el análisis de trastornos proliferativos de células colorrectales, que comprende: obtener una muestra que tiene ADN genómico del sujeto; extracción del ADN genómico divulgado; poner en contacto del ADN genómico divulgado, o un fragmento del mismo, que comprende una secuencia de acuerdo con la SEQ ID NO: 7 o una secuencia que hibrida en condiciones rigurosas con el mismo, con una o más enzimas de restricción sensibles a la metilación, en donde el ADN genómico es o bien digerido por las mismas, para producir fragmentos de digestión, o no es digerido por las mismas; y determinar, con base en la presencia o la ausencia, o en una propiedad de al menos uno de tales fragmentos del estado de metilación divulgado de al menos una secuencia del dinucleótido CpG de dicha secuencia genómica, o un promedio, o un valor que refleja un estado de metilación promedio de una pluralidad de secuencias del dinucleótido CpG de las mismas. Preferiblemente, el ADN genómico digerido o no digerido se amplifica antes de dicha determinación.

15 Las realizaciones adicionales proporcionan el uso de un ácido nucleico derivado de la SEQ ID NO: 7 en la detección de trastornos proliferativos de células de colon.

Breve descripción de los dibujos

20 Las Figuras 1, 5, 9, 16, 20, muestran matrices ordenadas de los datos obtenidos de acuerdo a los Ejemplos 1, y de acuerdo con las diferencias de metilación de CpG entre las dos clases de tejidos, usando un algoritmo adecuado. Las figuras se muestran en escala de grises, en donde las posiciones más significativas de CpG están en la parte inferior de la matriz con disminución decreciente hacia la parte superior. Negro indica metilación total en un posición dada de CpG, blanco representa sin metilación en la posición particular, con grados de metilación representados en color gris, desde claro (baja proporción de metilación) hasta oscuro (alta proporción de metilación). Cada fila representa una posición específica de CpG dentro de un gen y cada columna muestra el perfil de metilación para los diferentes CpG para una muestra. Los valores p para las posiciones individuales de CpG se muestran en el lado derecho. Los valores p son las probabilidades de que la distribución observada ocurra por casualidad en el conjunto de datos.

30 Las Figuras 2, 6, 10, 17, 21, 25, 29 muestran los resultados de las pruebas LogReg no corregidas con múltiples variables para cada comparación. Cada región genómica individual de interés se representa como un punto, la línea punteada representa el punto de corte para la tasa de falso descubrimiento del 25%.

35 Las Figuras 3, 7, 11, 22, 26, muestran las matrices de datos ordenadas, obtenidas de acuerdo con los Ejemplos 1, de la precisión de la máquina de soporte lineal GeneWise a través de validaciones entre las dos clases de tejidos, para los marcadores de mejor desempeño. Las figuras se muestran en escala de grises, en donde las posiciones más significativas de CpG están en la parte inferior de la matriz con disminución decreciente hacia la parte superior. Negro indica metilación total en un posición dada de CpG, blanco representa sin metilación en la posición particular, con grados de metilación representados en color gris, desde claro (baja proporción de metilación) hasta oscuro (alta proporción de metilación). Cada fila representa una posición específica de CpG dentro de un gen y cada columna muestra el perfil de metilación para los diferentes CpG para una muestra. Los valores de precisión para cada región genómica individual de interés se muestran en el lado derecho.

40 Las Figuras 4, 8, 12, 23, 27, 31 y 35 muestran la precisión de las máquinas de vectores de soporte lineal GeneWise a través de la validación de todas las regiones genómicas de cada clasificación. La precisión de cada región genómica se representa como cuadrados negros, la especificidad como diamantes sin relleno, y la sensibilidad como cuadrados sin relleno. La precisión, medida en el eje X muestra la fracción de muestras clasificadas correctamente.

45 La Figura 74 muestra la amplificación por PCR divulgada de las muestras de acuerdo con el ensayo 3 del ejemplo 14, respectivamente. El eje X muestra el número de ciclo de la reacción en cadena de la polimerasa, el eje Y muestra la intensidad de fluorescencia sobre el fondo.

Descripción detallada de la invención

Definiciones:

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

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

- 5 El término "estado de metilación" o "estatus de la metilación" se refiere a la presencia o ausencia de 5-metilcitosina ("5-mCyt") en uno o en una pluralidad de dinucleótidos CpG dentro de una secuencia de ADN. El estado de metilación en uno o más sitios particulares de metilación de CpG (que tienen cada uno dos secuencias del dinucleótido CpG CpG) dentro de una secuencia de ADN incluyen "no metilado", "totalmente metilado" y "semimetilado."
- El término "semimetilación" se refiere al estado de metilación de un sitio de metilación palindrómico de CpG, donde sólo una única citosina está metilada en una de las dos secuencias del dinucleótido CpG del sitio de metilación palindrómico de CpG (por ejemplo, 5'-CC^MGG-3 '(cadena superior): 3'-CCGG-5' (cadena inferior)).
- 10 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 de funcionamiento del receptor (ROC). La curva ROC es un gráfico de la tasa positiva verdadera contra la tasa de falsos positivos para los diferentes puntos de corte posibles de una prueba diagnóstica. Muestra el compromiso entre sensibilidad y especificidad dependiendo del punto de corte seleccionado (cualquier aumento en la sensibilidad vendrá acompañado por una disminución en la especificidad). El área bajo una curva ROC (AUC) es una medida de la precisión de una prueba de diagnóstico (cuanto mayor sea el área mejor, el óptimo es 1, una prueba al azar tendría una curva ROC recostada sobre la diagonal con un área de 0,5 de NGFR; para la referencia: J. P. Egan. Signal Detection Theory and ROC Analysis, Academic Press, Nueva York, 1975).
- 15 El término "hipermetilación" se refiere al estado de metilación promedio que corresponde a un aumento de la presencia de 5-mCyt en uno o en una pluralidad de dinucleótidos CpG dentro de una secuencia de ADN de una muestra de prueba de ADN, respecto a la cantidad de 5-mCyt encontrada en los dinucleótidos CpG correspondientes dentro de una muestra normal de ADN de control.
- 20 El término "hipometilación" se refiere al estado de metilación promedio que corresponde a una disminución de la presencia de 5-mCyt en uno o en una pluralidad de dinucleótidos CpG dentro de una secuencia de ADN de una muestra de prueba de ADN, respecto a la cantidad de 5-mCyt encontrada en los dinucleótidos CpG correspondientes dentro de una muestra normal de ADN de control.
- 25 El término "microarreglos" se refiere en términos generales a ambos "microarreglos de ADN," y 'chip(s) de ADN', como se reconoce en la técnica, abarca todos los soportes sólidos reconocidos en la técnica, y abarca todos los métodos para fijar moléculas de ácido nucleico a los mismos o la síntesis de ácidos nucleicos sobre lo mismos.
- 30 "Parámetros genéticos" son mutaciones y polimorfismos de genes y secuencias requeridos adicionalmente para su regulación. Para ser designado como mutaciones son, en particular, inserciones, supresiones, mutaciones puntuales, inversiones y polimorfismos y, particularmente preferidos, SNP (polimorfismos de un solo nucleótido).
- "Parámetros epigenéticos" son, en particular, metilaciones de citosina. Otros parámetros epigenéticos incluyen, por ejemplo, la acetilación de histonas que, sin embargo, no se puede analizar directamente usando el método descrito pero que, a su vez, se correlacionan con la metilación del ADN.
- 35 El término "reactivo de bisulfito" se refiere a un reactivo que comprende bisulfito, disulfito, hidrógeno sulfito o combinaciones de los mismos, útil como se divulga aquí para distinguir entre secuencias de dinucleótidos CpG metilados y no metilados.
- El término "ensayo de metilación" se refiere a cualquier ensayo para la determinación del estado de metilación de una o más secuencias de dinucleótidos CpG dentro de una secuencia de ADN.
- 40 El término "MS.AP-PCR" (reacción en cadena de la polimerasa cebada arbitrariamente sensible a la metilación) se refiere a la tecnología reconocida en la técnica que permite un barrido global del genoma usando cebadores ricos en CG para enfocarse en las regiones que más probablemente contienen dinucleótidos CpG, y descrito por Gonzalzo y colaboradores, Cancer Research 57: 594-599, 1997.
- 45 El término "MethyLight^{MR}" se refiere a la técnica de PCR en tiempo real basada en fluorescencia reconocida en la técnica, descrita por Eads y colaboradores, Cancer Res. 59: 2302 - 2306 mil, 1999.
- El término ensayo "HeavyMethyl^{MR}", en la realización del mismo implementado en el presente documento, se refiere a un ensayo, en el que sondas de bloqueo específicas de la metilación (también denominadas aquí como bloqueadoras) que cubren posiciones de CpG entre o cubiertas por los cebadores de amplificación, permiten la amplificación selectiva específica de la metilación de una muestra de ácido nucleico.
- 50 El término ensayo "HeavyMethyl^{MR} MethyLight^{MR}", en la realización del mismo implementada en el presente documento, se refiere a un ensayo HeavyMethyl^{MR} MethyLight^{MR}, que es una variación del ensayo MethyLight^{MR}, en donde el ensayo MethyLight^{MR} se combina con sondas de bloqueo específicas de la metilación que cubren las posiciones de CpG entre los cebadores de amplificación.

El término "Ms-SNuPE" (extensión del cebador de un solo nucleótido sensible a la metilación) se refiere al ensayo reconocido en el arte descrito por Gonzalzo y Jones, *Nucleic Acids Res.* 25: 2529-2531, 1997.

5 El término "MSP" (PCR específica de la metilación) se refiere al ensayo de metilación reconocido en la técnica descrito por Herman y colaboradores *Proc. Natl. Acad. Sci. EE.UU.* 93: 9821 - 9826, 1996, y en la patente de los Estados Unidos No. 5.786.146.

El término "COBRA" (análisis de restricción combinada con bisulfito) se refiere al ensayo de metilación reconocido en la técnica descrito por Xiong y Laird, *Nucleic Acids Res.* 25: 2532 - 2534, 1997.

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

10 El término "hibridación" se debe entender como un vínculo de un oligonucleótido con una secuencia complementaria a lo largo de las líneas de los emparejamientos de bases de Watson-Crick en el ADN de la muestra, que forma una estructura dúplex.

"Condiciones de hibridación rigurosas", tal como se definen en el presente documento, implican la hibridación a 68°C en 5x SSC/solución de Denhardt 5x/1,0% de SDS, y el lavado en 0,2x SSC/0,1% de SDS a temperatura ambiente, o 15 implicar el equivalente del mismo reconocido en la técnica (por ejemplo, condiciones en las que se lleva a cabo una hibridación a 60°C en regulador 2,5 x SSC, seguido por varias etapas de lavado a 37°C en una concentración baja de regulador, y se mantiene estable). Las condiciones moderadamente rigurosas, como se define aquí, involucrar la inclusión del lavado en 3x SSC a 42°C, o su equivalente reconocido en la técnica. Los parámetros de concentración de sal y de temperatura se pueden variar para lograr el nivel óptimo de identidad entre la sonda y el ácido nucleico 20 objetivo. La orientación con respecto a tales condiciones está disponible en la técnica, por ejemplo, por Sambrook y colaboradores, 1989, *Molecular Cloning, A Laboratory Manual*, Cold Spring Harbor Press, Nueva York; y Ausubel y colaboradores (eds.), 1995, *Current Protocols in Molecular Biology*, (John Wiley & Sons, Nueva York) en la Unidad 2.10.

25 Los términos "SEQ ID NO de la matriz", "SEQ ID NO de la matriz compuesta", o "secuencia de la matriz compuesta" se refieren a una secuencia, hipotética o no, que consiste en un compuesto lineal de cabeza a cola (5' a 3') de todas las secuencias contiguas individuales de una matriz del sujeto (por ejemplo, un compuesto de cabeza a cola de las SEQ ID NOS: 1 - 71, en ese orden).

30 Los términos "nodo de la SEQ ID NO de la matriz", "nodo de la SEQ ID NO de la matriz compuesta", o "nodo de la secuencia de la matriz compuesta" se refieran a una unión entre cualquiera dos secuencias contiguas individuales de la "SEQ ID NO de la matriz", la "SEQ ID NO de la matriz compuesta", o la "secuencia de la matriz compuesta".

En referencia a las secuencias de la matriz compuesta, la frase "nucleótidos contiguos" se refiere a una región de secuencia contigua de cualquier secuencia contigua individual de la matriz compuesta, pero no incluye una región de la secuencia de la matriz compuesta que incluye un "nodo", como se define aquí más arriba.

Compendio:

35 Se describen aquí marcadores genéticos moleculares que tienen nueva utilidad para el análisis de patrones de metilación asociados con el desarrollo de trastornos proliferativos de células colorrectales. Dichos marcadores pueden ser utilizados para detectar o distinguir entre los trastornos proliferativos de células colorrectales, proporcionando así medios mejorados para la clasificación y el tratamiento de dichos trastornos.

40 *La modificación del ADN con bisulfito es una herramienta reconocida en la técnica utilizada para evaluar el estado de metilación de CpG.* La 5-metilcitosina es la modificación más frecuente de la base covalente en el ADN de las células eucariotas. Desempeña un papel, por ejemplo, en la regulación de la transcripción, en la impronta genética, y en la tumorigénesis. Por lo tanto, la identificación de 5-metilcitosina como un componente de la información genética es de considerable interés. Sin embargo, las posiciones de la 5-metilcitosina no se pueden identificar por 45 secuenciación, porque la 5-metilcitosina tiene el mismo comportamiento de apareamiento de bases que la citosina. Por otra parte, la información epigenética transportada por la 5-metilcitosina se pierde completamente, por ejemplo, durante la amplificación por PCR.

50 El método más frecuentemente utilizado para el análisis del ADN por la presencia de 5-metilcitosina se basa en el reacción específica del bisulfito con la citosina por medio de la cual, tras la subsiguiente hidrólisis alcalina, la citosina se convierte en uracilo que corresponde a la timina en su comportamiento de apareamiento de bases. Significativamente, sin embargo, la 5-metilcitosina permanece sin modificar bajo estas condiciones. Por consiguiente, el ADN original se convierte de tal manera que la metilcitosina, que originalmente no podría 55 distinguirse de la citosina por su comportamiento de hibridación, ahora puede ser detectada como la única citosina restante utilizando técnicas estándar de biología molecular reconocidas en la técnica, por ejemplo, por amplificación e hibridación, o por secuenciación. Todas estas técnicas se basan en las propiedades diferenciales de apareamiento de bases, que ahora pueden ser totalmente explotadas.

El estado del arte, en términos de sensibilidad, se define mediante un método que comprende encerrar el ADN que se va a analizar en una matriz de agarosa, evitando así la difusión y renaturalización del ADN (el bisulfito sólo reacciona con ADN monocatenario), y la sustitución de todas las etapas de precipitación y purificación con diálisis rápida (Olek A, y colaboradores, A modified and improved method for bisulfite based cytosine methylation analysis, Nucleic Acids Res. 24: 5064-6, 1996). Por lo tanto, es posible analizar las células individuales para el estado de metilación, ilustrando la utilidad y sensibilidad del método. Una visión general de los métodos reconocidos en el arte para detectar 5-metilcitosina es proporcionada por Rein, T., y colaboradores, Nucleic Acids Res., 26: 2.255, 1998.

La técnica del bisulfito, salvo algunas excepciones (por ejemplo, Zeschnigk M, y colaboradores, Eur J Hum Genet. 5: 94 - 98, 1997), solo se usa actualmente en investigación. En todos los casos, se amplifican fragmentos específicos cortos de un gen conocido después del tratamiento con bisulfito, y, o bien secuenciados completamente (Olek y Walter, Nat Genet. 1997 17: 275 - 6, 1997), sometidos a una o más reacciones de extensión del cebador (Gonzalzo y Jones, Nucleic Acids Res, 25: 2529 - 31, 1997; el documento WO 95/00669, la patente de los Estados Unidos No. 6.251.594) para analizar las posiciones individuales de citosina, o tratado por digestión enzimática (Xiong y Laird, Nucleic Acids Res., 25: 2532 - 4, 1997). La detección por hibridación también ha sido descrita en la técnica (Olek y colaboradores, WO 99/28498). Además, se ha descrito el uso de la técnica del bisulfito para la detección de metilación con respecto a los genes individuales (Grigg y Clark, Bioessays, 16: 431 - 6, 1994; Zeschnigk M, y colaboradores, Hum Mol Genet, 6: 387-95, 1997; Feil R, y colaboradores, Nucleic Acids Res, 22: 695 -, 1994; Martin V, y colaboradores, Gene, 157: 261 - 4, 1995; los documentos WO 9746705 y WO 9515373).

La presente divulgación proporciona el uso de la técnica del bisulfito, en combinación con uno o más ensayos de metilación, para la determinación del estado de metilación de secuencias del dinucleótido CpG dentro de una secuencia de acuerdo con la SEQ ID NO: 7. De acuerdo con la presente divulgación esta determinación tiene una utilidad diagnóstica y de pronóstico.

Procedimientos del ensayo de metilación. Se conocen en el arte varios procedimientos de ensayo de metilación, y se pueden utilizar 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. Tales ensayos implican, entre otras técnicas, la secuenciación de ADN del ADN tratado con bisulfito, PCR (para la amplificación específica de la secuencia), análisis de transferencias tipo Southern, y el uso de enzimas de restricción sensibles a la metilación.

Por ejemplo, se ha simplificado la secuenciación genómica para el análisis de los patrones de metilación del ADN y la distribución de la 5-metilcitosina mediante el uso del tratamiento con bisulfito (Frommer y colaboradores, Proc Natl Acad Sci EE.UU. 89: 1827 - 1831, 1992). Además, se utiliza la digestión con enzimas de restricción de los productos de la PCR amplificados a partir del ADN convertido con bisulfito, por ejemplo, el método descrito por Sadri y Hornsby (Nucl. Acids Res. 24: 5058 - 5059, 1996), o COBRA (análisis de restricción combinado con bisulfito) (Xiong y Laird, Nucleic Acids Res. 25: 2532 - 2534, 1997).

COBRA. El análisis COBRA^{MR} es un ensayo de metilación cuantitativo útil para determinar los niveles de metilación del ADN en los loci de genes específicos en cantidades pequeñas de ADN genómico (Xiong y Laird, Nucleic Acids Res. 25: 2532 - 2534, 1997). En resumen, la digestión con enzimas de restricción se utiliza para revelar las diferencias de secuencia que dependen de la metilación en los productos de la PCR de ADN tratado con bisulfito de sodio. Se introducen primero las diferencias de la secuencia que dependen de la metilación en el ADN genómico mediante tratamiento estándar con bisulfito de acuerdo con el procedimiento descrito por Frommer y colaboradores (Proc Natl Acad Sci EE.UU. 89: 1827 - 1831, 1992). Se lleva a cabo luego la amplificación por PCR del ADN convertido con bisulfito utilizando cebadores específicos para las islas CpG de interés, seguido por la digestión con endonucleasas de restricción, electroforesis en gel, y la detección mediante sondas de hibridación específicas marcadas. Los niveles de metilación en la muestra original de ADN están representados por las cantidades relativas del producto PCR digerido y no digerido de una forma linealmente cuantitativa a través de un amplio espectro de niveles de metilación del ADN. Además, esta técnica puede ser aplicada de forma confiable al ADN obtenido a partir de muestras de tejido microseccionadas embebidas en parafina.

Los reactivos típicos (por ejemplo, como se pueden encontrar en un kit típico basado en COBRA^{MR}) para el análisis COBRA^{MR} pueden incluir, pero no se limitan a: cebadores de PCR para un gen específico (o una secuencia de ADN tratada con bisulfito o una isla CpG); una enzima de restricción y regulador apropiado; oligo de hibridación en el gen; oligo de hibridación de control; un kit de marcación de quinasa para la sonda oligo; y nucleótidos marcados. Además, los reactivos de conversión con bisulfito pueden incluir: regulador de desnaturalización de ADN; regulador de sulfonación; reactivos o kits de recuperación del ADN (por ejemplo, precipitación, ultrafiltración, columna de afinidad); regulador de desulfonación; y componentes de recuperación del ADN.

Preferiblemente, ensayos tales como las reacciones "MethylLight^{MR}" (técnica de PCR en tiempo real basada en fluorescencia) (Eads y colaboradores, Cancer Res. 59: 2302 - 2306, 1999), Ms-SNuPETM (extensión del cebador de un solo nucleótido sensible a la metilación) (Gonzalzo y Jones, Nucleic Acids Res 25: 2529 - 2531, 1997), PCR específica para metilación ("MSP"; Herman y colaboradores, Proc. Natl. Acad. Sci. EE.UU. 93: 9821 - 9826, 1996; patente de los Estados Unidos No. 5.786.146), y amplificación de la isla CpG metilada ("MCA"; Toyota y colaboradores, Cancer Res. 59: 2307 - 12, 1999) se usan solos o en combinación con otro de estos métodos.

MethyLight^{MR}. El ensayo *MethyLight*^{MR} es un ensayo de metilación cuantitativa de alto rendimiento que utiliza tecnología PCR en tiempo real con base en fluorescencia (*TaqMan*TM) que no requiere manipulaciones adicionales después de la etapa de PCR (Eads y colaboradores, *Cancer Res.* 59: 2302 - 2306, 1999). En resumen, el proceso *MethyLight*^{MR} comienza con una muestra mixta de ADN genómico que se convierte, en una reacción con bisulfito de sodio, en una combinación mixta de diferencias de secuencia que dependen de la metilación de acuerdo con procedimientos estándar (el proceso con bisulfito convierte los residuos de citosina no metilados en uracilo). La PCR basada en fluorescencia se realiza a continuación, ya sea en una reacción PCR "no sesgada" (con cebadores que no se superpongan en los sitios de metilación conocidos de CpG), o en una reacción "sesgada" (con cebadores de PCR que se superponen en los dinucleótidos CpG conocidos). La discriminación de la secuencia puede ocurrir ya sea a nivel del proceso de amplificación o a nivel del proceso de detección por fluorescencia, o ambos.

El ensayo *MethyLight*^{MR} puede ser usado como una prueba cuantitativa para los patrones de metilación en la muestra de ADN genómico, en donde la discriminación de la secuencia se presenta al nivel de la hibridación de la sonda. En esta versión cuantitativa, la reacción PCR proporciona la amplificación no sesgada en presencia de una sonda fluorescente que se superpone a un sitio particular de metilación putativa. Se proporciona un control no sesgado para la cantidad de ADN de entrada mediante una reacción en la que ni los cebadores, ni la sonda recubren ninguno de los dinucleótidos CpG. Alternativamente, se logra una prueba cualitativa para la metilación genómica mediante sondeo de la combinación PCR sesgada, ya sea con oligonucleótidos de control que no "cubren" sitios de metilación conocidos (una versión con base en fluorescencia de la técnica "MSP"), o con los sitios de metilación potenciales que cubren los oligonucleótidos.

El proceso *MethyLight*^{MR} puede ser utilizado con una sonda "*TaqMan*[®]" en el proceso de amplificación. Por ejemplo, se trata ADN genómico bicatenario con bisulfito de sodio y se sometió a uno de los dos conjuntos de reacciones PCR usando sondas *TaqMan*[®]; por ejemplo, ya sea con cebadores sesgados y la sonda *TaqMan*[®] o cebadores no sesgados y la sonda *TaqMan*[®]. Los sonda *TaqMan*[®] está doblemente marcada con moléculas "reporteras" e "inactivadoras" fluorescentes, y se diseña para ser específica para una región con contenido relativamente alto de GC de manera que se funde aproximadamente a una temperatura 10°C más alta en el ciclo de PCR que los cebadores directos o inversos. Esto permite que la sonda *TaqMan*[®] permanezca hibridada completamente durante la etapa de hibridación/extensión de la PCR. A medida que la *Taq* polimerasa sintetiza enzimáticamente una nueva cadena durante la PCR, eventualmente alcanza la sonda *TaqMan*[®] hibridada. La actividad 5' a 3' endonucleasa de la *Taq* polimerasa desplazará entonces la sonda *TaqMan*[®] digiriéndola para liberar la molécula reportera fluorescente para detección cuantitativa de su señal ahora no inactivada utilizando un sistema de detección fluorescente en tiempo real.

Los reactivos típicos (por ejemplo, como los que se pueden encontrar en un kit típico con base en *MethyLight*^{MR}) para el análisis *MethyLight*^{MR} pueden incluir, pero no se limitan a: cebadores de PCR para un gen específico (o secuencia de ADN tratada con bisulfito o isla CpG); sondas *TaqMan*[®]; reguladores optimizados para PCR y desoxinucleótidos; y *Taq* polimerasa.

Ms-SNuPE. La técnica *Ms-SNuPE*^{MR} es un método cuantitativo para evaluar diferencias de metilación en sitios específicos CpG con base en el tratamiento con bisulfito del ADN, seguido por la extensión del cebador de un solo nucleótido (Gonzalzo y Jones, *Nucleic Acids Res.* 25: 2529 - 2531, 1997). En resumen, se hace reaccionar el ADN genómico con bisulfito de sodio para convertir la citosina no metilada en uracilo, dejando la 5-metilcitosina sin cambios. La amplificación de la secuencia objetivo deseada es luego realizada usando cebadores de PCR específicos para el ADN convertido con bisulfito, y se aísla el producto resultante y se utiliza como plantilla 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 microseccionadas), y se evita la utilización de enzimas de restricción para determinar el estado de metilación en los sitios CpG.

Los reactivos típicos (por ejemplo, como se pueden encontrar en un kit típico con base en *Ms-SNuPE*^{MR}) para el análisis con *Ms-SNuPE*^{MR} pueden incluir, pero no se limitan a: cebadores de PCR para un gen específico (o secuencia de ADN tratada con bisulfito o isla CpG); reguladores optimizados para PCR y desoxinucleótidos; kit de extracción en gel; cebadores de control positivo; cebadores para *Ms-SNuPE*^{MR} para el gen específico; regulador de reacción (para la reacción *Ms-SNuPE*); y nucleótidos marcados. Además, los reactivos de conversión con bisulfito pueden incluir: regulador de desnaturalización de ADN; regulador de sulfonación; reactivos o kit de recuperación de ADN (por ejemplo, precipitación, ultrafiltración, columna de afinidad); regulador de desulfonación; y componentes de recuperación de ADN.

MSP. La *MSP* (PCR específica para 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 y colaboradores, *Proc. Natl. Acad. Sci. EE.UU.* 93: 9821 - 9826, 1996; patente de los Estados Unidos No. 5.786.146). En resumen, el ADN se modifica mediante la conversión con bisulfito de sodio de todas las citosinas no metiladas, pero no las citosinas metiladas en uracilo, y posteriormente amplificadas con cebadores específicos para ADN metilado versus no metilado. *MSP* requiere solamente pequeñas cantidades de ADN, es sensible a 0,1% de alelos metilados de un locus dado de una isla CpG, y se puede realizar en ADN extraído de muestras incluidas en parafina. Los reactivos típicos (por ejemplo, como se pueden encontrar en un kit típico basado en *MSP*) para el análisis con *MSP* pueden incluir, pero no se limitan a: cebadores de PCR metilados y no metilados

para un gen específico (o secuencia de ADN tratada con bisulfito o isla CpG), reguladores optimizados de PCR y desoxinucleótidos, y sondas específicas.

5 MCA. La técnica de MCA es un método que se puede utilizar para la detección de patrones de metilación alterados en ADN genómico, y para aislar secuencias específicas asociadas con estos cambios (Toyota y colaboradores, Cancer Res. 59: 2307 - 12, 1999). En resumen, las enzimas de restricción con diferentes sensibilidades a la metilación de citosina en sus sitios de reconocimiento se usan para digerir los ADN genómicos de los tumores primarios, líneas celulares, y tejidos normales antes de la amplificación por PCR cebada arbitrariamente. Los fragmentos que muestran metilación diferencial se clonan y secuencian después de la resolución de los productos de la PCR en geles de poliacrilamida de alta resolución. Los fragmentos clonados se utilizan luego como sondas para el análisis Southern para confirmar la metilación diferencial de estas regiones. Los reactivos típicos (por ejemplo, como se pueden encontrar en un kit típico con base en MCA) para el análisis MCA puede incluir, pero no se limitan a: cebadores de PCR para el ADN genómico de cebado arbitrario; reguladores de PCR y nucleótidos, enzimas de restricción y reguladores apropiados; oligos o sondas de hibridación de genes; oligos o sondas de hibridación de control.

15 Se determinó que las secuencias genómicas de acuerdo con la SEQ ID NO: 7, y las variantes tratadas de los mismos de origen no natural de acuerdo con las SEQ ID NOS: 316, 317, 432 y 433 tienen nueva utilidad para la detección, clasificación y/o el tratamiento divulgados de trastornos proliferativos de células colorrectales.

20 La divulgación proporciona un método para detectar y/o para detectar y distinguir entre dos o más trastornos proliferativos de células de colon en un sujeto. Dicho método comprende las siguientes etapas: i) poner en contacto el ADN genómico aislado de fluidos corporales obtenidos del sujeto con al menos un reactivo, o serie de reactivos que distinguen entre dinucleótidos CpG metilados y no metilados dentro de al menos una región objetivo del ADN genómico, en donde dichos nucleótidos contiguos comprenden al menos una secuencia del dinucleótido CpG; y ii) detectar, o detectar y distinguir entre dos o más trastornos proliferativos de células del colon que proporciona una sensibilidad mayor o igual al 80% y una especificidad mayor o igual al 80%.

25 Preferiblemente, la sensibilidad es de aproximadamente 75% hasta aproximadamente 96%, o de aproximadamente 80% hasta aproximadamente 90%, o de aproximadamente 80% hasta aproximadamente 85%. Preferiblemente, la especificidad es de aproximadamente 75% hasta aproximadamente 96%, o de aproximadamente 80% hasta aproximadamente 90%, o de aproximadamente 80% hasta aproximadamente 85%.

30 El ADN genómico puede ser aislado por cualquier medio estándar en la técnica, incluyendo el uso de kits comercialmente disponibles. En resumen, en donde el ADN de interés está encapsulado por una membrana celular, la muestra biológica debe ser rota y lisada por medios enzimáticos, químicos o mecánicos. La solución de ADN puede ser luego limpiada de proteínas y otros contaminantes, por ejemplo, mediante digestión con proteínasa K. A continuación se recupera el ADN genómico de la solución. Esto puede llevarse a cabo por medio de una variedad de métodos que incluyen precipitación por saturación salina, extracción orgánica o enlazamiento del ADN a un soporte en fase sólida. La elección del método se verá afectada por varios factores incluyendo tiempo, costo y la cantidad requerida de ADN. Los fluidos corporales son la fuente preferida de ADN; se prefieren particularmente el plasma sanguíneo, suero sanguíneo, sangre entera, células sanguíneas aisladas y células aisladas de la sangre.

40 La muestra de ADN genómico se trata entonces de tal manera que las bases de citosina no metiladas en la posición 5' se convierten en uracilo, timina, u otra base que sea muy diferente a la citosina en términos de comportamiento de hibridación. Esto se entiende como "tratamiento" en el presente documento.

El tratamiento descrito anteriormente del ADN genómico se lleva a cabo preferiblemente con bisulfito (sulfito de hidrógeno, disulfito) y la posterior hidrólisis alcalina que da como resultado una conversión de nucleobases de citosina no metiladas en uracilo u otra base que es diferente a la citosina en términos del comportamiento de apareamiento de bases.

45 Se analiza a continuación el ADN tratado con el fin de determinar el estado de metilación de una o más secuencias del gen objetivo (antes del tratamiento) asociadas con el desarrollo de carcinoma colorrectal. Se prefiere particularmente que la región objetivo comprenda, o se hibride en condiciones rigurosas con al menos 16 nucleótidos contiguos del gen NGFR. Se prefiere además, que se analicen las secuencias de dichos genes en la Tabla 3 como se describe en el listado de secuencia acompañante. El método de análisis se puede seleccionar a partir de aquellos conocidos en la técnica, incluyendo los que se enumeran en este documento. Se prefieren particularmente MethyLight, MSP y el uso de oligonucleótidos de bloqueo como se describirá en el presente documento. Se prefiere además que cualquiera de los oligonucleótidos utilizados en este tipo de análisis (incluyendo cebadores, oligonucleótidos de bloqueo y sondas de detección) deben ser complementarios inversos, idénticos, o hibridar en condiciones rigurosas o altamente rigurosas con al menos un segmento de 16 pares de bases de largo de las secuencias de bases de una o más de las SEQ ID NO: (IDBISEQFIRST) hasta la SEQ ID NO: y (IDBISEQLAST) y secuencias complementarias de las mismas.

La metilación aberrante, más preferiblemente hipermetilación de DUX4 se asocian con la presencia del carcinoma colorrectal.

El análisis de una o la pluralidad de las secuencias permite por primera vez detectar, o detectar y distinguir entre dos o más trastornos proliferativos de células del colon con una sensibilidad mayor que o igual a 80% y una especificidad mayor que o igual a 80%. La sensibilidad se calcula como: (neoplasia de colon detectada/neoplasia de colon total); y la especificidad se calcula como (negativos no detectados/negativos totales).

- 5 Preferiblemente, la sensibilidad es de aproximadamente 75% hasta aproximadamente 96%, o de aproximadamente 80% hasta aproximadamente 90%, o de aproximadamente 80% hasta aproximadamente 85%. Preferiblemente, la especificidad es de aproximadamente 75% hasta aproximadamente 96%, o de aproximadamente 80% hasta aproximadamente 90%, o de aproximadamente 80% hasta aproximadamente 85%.

- 10 La neoplasia de colon se puede definir como todos los tumores malignos de colon o tumores malignos de colon y grandes (adenomas > 1 cm), o subconjuntos de los mismos. Negativos pueden definirse como cualquier enfermedad distinta de tumores malignos de colon y adenomas, o individuos saludables.

Se divulga el uso de NGFR 4 como marcadores para la diferenciación, detección y distinción de trastornos proliferativos de células de colon.

- 15 Dicho uso del gen puede ser posible por medio de cualquier análisis de la expresión del gen, por medio de análisis de la expresión de ARNm o análisis de la expresión de proteínas. Sin embargo, como se divulga particularmente en este documento, la detección, diferenciación y distinción de los trastornos proliferativos de células de colon es posible por medio del análisis del estado de metilación de y sus elementos promotores o reguladores. En el presente documento se describen los métodos para el análisis de metilación de genes.

Los niveles aberrantes de NGFR de la expresión de ARNm se asocian con carcinoma colorrectal.

- 20 En consecuencia, se pueden asociar un aumento o disminución de los niveles de expresión de dichos genes o secuencias con el desarrollo de carcinoma colorrectal y otros trastornos proliferativos de células colorrectales.

- 25 Para detectar la presencia de ARNm que codifica un gen o secuencia genómica en un sistema de detección para el cáncer de colon, se obtiene una muestra de un paciente. La muestra puede ser una muestra de biopsia de tejido o una muestra de sangre, plasma, suero o similares. La muestra puede ser tratada para extraer los ácidos nucleicos contenidos en la misma. El ácido nucleico resultante de la muestra se somete a electroforesis en gel u otras técnicas de separación. La detección implica poner en contacto los ácidos nucleicos y, en particular, el ARNm de la muestra con una secuencia de ADN que sirve como sonda para formar dúplex híbridos. La rigurosidad de la hibridación se determina por una cantidad de factores durante la hibridación y durante el procedimiento de lavado, incluyendo la temperatura, fuerza iónica, duración y concentración de formamida. Estos factores se describen, por ejemplo, en
- 30 Sambrook y colaboradores (Molecular Cloning: A Laboratory Manual, 2ª ed., 1989). La detección del dúplex resultante se logra por lo general mediante el uso de sondas marcadas. Alternativamente, la sonda puede estar sin marcar, pero puede ser detectable por el enlazamiento específico con un ligando que está marcado, ya sea directa o indirectamente. Las etiquetas y los métodos adecuados para marcación de las sondas y ligandos son conocidos en la técnica, e incluyen, por ejemplo, marcadores radiactivos que pueden ser incorporados por métodos conocidos (por
- 35 ejemplo, traducción de la muestra o tratamiento con quinasa), biotina, grupos fluorescentes, grupos quimioluminiscentes (por ejemplo, dioxetanos, particularmente dioxetanos activados), enzimas, anticuerpos, y similares.

- 40 Con el fin de aumentar la sensibilidad de la detección en una muestra de ARNm transcrita a partir del gen o la secuencia genómica, se puede usar la técnica de transcripción inversa/reacción en cadena de polimerización para amplificar ADNc transcrito a partir del ARNm. El método de transcripción inversa/PCR es bien conocido en la técnica (por ejemplo, véase Watson y Fleming, más arriba).

- 45 El método de transcripción inversa/PCR se puede llevar a cabo de la siguiente manera. Se aísla el ARN celular total, por ejemplo, por el método estándar de isotiocianato de guanidinio y se transcribe en forma inversa el ARN total. El método de transcripción inversa implica la síntesis de ADN en una plantilla de ARN utilizando una enzima transcriptasa inversa y un cebador terminal 3'. Normalmente, el cebador contiene una secuencia de oligo(dT). El ADNc así producido se amplifica luego usando el método de la PCR y cebadores específicos EYA4. (Belyavsky y colaboradores, Nucl Acid Res 17: 2919 - 2932, 1989; Krug y Berger, Methods in Enzymology, Academic Press, NY, Vol.152, páginas 316 - 325, 1987).

- 50 La presente invención también se puede describir en ciertas realizaciones como el uso de un kit para su uso en la detección de un estado de enfermedad de cáncer de colon a través de pruebas de una muestra biológica. Un kit representativo puede comprender uno o más segmentos de ácido nucleico que se hibridan selectivamente con el ARNm y una contenedor para cada uno de los uno o más segmentos de ácido nucleico. En ciertas realizaciones, los segmentos de ácido nucleico pueden combinarse en un solo tubo. En realizaciones adicionales, los segmentos de ácido nucleico también pueden incluir un par de cebadores para amplificar el ARNm objetivo. Tales kits también
- 55 pueden incluir cualquiera de los reguladores, soluciones, disolventes, enzimas, nucleótidos, u otros componentes para las reacciones de hibridación, amplificación o detección. Los componentes preferidos del kit incluyen reactivos para PCR de transcripción inversa, hibridación *in situ*, análisis de Northern y/o RPA.

La presente invención proporciona además métodos para detectar la presencia del polipéptido codificado por NGFR en una muestra obtenida de un paciente.

Los niveles aberrantes de expresión del polipéptido de los polipéptidos codificados de acuerdo con la Tabla 3 están asociados con carcinoma colorrectal.

- 5 Por consiguiente, la sobreexpresión o subexpresión de dichos polipéptidos puede ser asociada con el desarrollo de carcinoma colorrectal y otros trastornos proliferativos de células colorrectales.

10 Cualquier método conocido en la técnica para la detección de proteínas puede ser utilizado. Tales métodos incluyen, pero no se limitan a, inmunodifusión, inmunoelectroforesis, métodos inmunoquímicos, ensayos ligando-aglutinante, técnicas de inmunohistoquímica, ensayos de aglutinación y de complemento (por ejemplo, véase Basic and Clinical Immunology, Sites and Terr, eds., Appleton & Lange, Norwalk, Conn. paginas 217 - 262, 1991). Se prefieren los métodos de inmunoensayo aglutinante - ligando que incluyen hacer reaccionar anticuerpos con un epítipo o epítipos y desplazar en forma constitutiva una proteína marcada o un derivado de la misma.

Ciertas realizaciones de la presente divulgación comprenden el uso de anticuerpos específicos para el polipéptido codificado por NGFR.

15 Tales anticuerpos pueden ser útiles para aplicaciones de diagnóstico y pronóstico en la detección del estado de enfermedad, mediante la comparación de los niveles de expresión de los marcadores de la enfermedad de colon de un paciente para expresión de los mismos marcadores en individuos normales. En ciertas realizaciones, la producción de anticuerpos monoclonales o policlonales puede ser inducida por el uso del polipéptido codificado como antígeno. Tales anticuerpos pueden a su vez ser usados para detectar las proteínas expresadas como
20 marcadores para estados de enfermedad humana. Los niveles de tales proteínas presentes en la sangre periférica o muestra de tejido de un paciente pueden ser cuantificados por métodos convencionales. El enlazamiento anticuerpo-proteína puede detectarse y cuantificarse mediante una variedad de medios conocidos en la técnica, tales como la marcación con ligandos fluorescentes o radiactivos. La invención comprende además el uso de kits para llevar a cabo los procedimientos antes mencionados, en los que dichos kits contienen anticuerpos específicos para los
25 polipéptidos investigados.

Numerosos inmunoensayos competitivos y no competitivos de enlazamiento de proteína son bien conocidos en la técnica. Los anticuerpos empleados en tales ensayos pueden estar sin marcar, por ejemplo tal como se utiliza en pruebas de aglutinación, o etiquetados para uso en una amplia variedad de métodos de ensayo. Las etiquetas que pueden usarse incluyen radionúclidos, enzimas, compuestos fluorescentes, quimioluminiscentes, sustratos o
30 cofactores enzimáticos, inhibidores de enzimas, partículas, colorantes y similares para uso en radioinmunoensayos (RIA), inmunoensayos enzimáticos, por ejemplo, ensayo inmunoabsorbente ligado a enzimas (ELISA), inmunoensayos fluorescentes y similares. Los anticuerpos monoclonales o policlonales o epítipos de los mismos pueden elaborarse para uso en inmunoensayos mediante cualquiera de una serie de métodos conocidos en la técnica.

35 Un enfoque para preparar anticuerpos para una proteína es la selección y preparación de una secuencia de aminoácidos de la totalidad o parte de la proteína, sintetizando químicamente la secuencia e inyectarla en un animal apropiado, normalmente 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). Los métodos para la preparación de los polipéptidos o epítipos de los mismos incluyen, pero no se limitan a
40 técnicas de síntesis química, de ADN recombinante o aislamiento de muestras biológicas.

Las realizaciones particulares de la presente invención proporcionan una nueva aplicación del análisis de los niveles de metilación y/o los patrones dentro de dichas secuencias que permite una detección precisa, caracterización y/o el tratamiento de trastornos proliferativos de células colorrectales. La detección temprana de trastornos de proliferación de células colorrectales está directamente relacionada con el pronóstico de la enfermedad y el método divulgado le
45 permite por lo tanto al médico y al paciente tomar decisiones de tratamientos mejores y más informadas.

Mejoras adicionales

La presente divulgación proporciona nuevos usos para secuencias genómicas de acuerdo con la SEQ ID NO: 7. Realizaciones adicionales proporcionan oligonucleótidos y/o oligómeros de PNA para el análisis de los patrones de metilación de citosina dentro de la SEQ ID NO: 7.

50 La divulgación proporciona ácidos nucleicos tratados, derivados de la SEQ ID NO 7 genómica, en donde el tratamiento es adecuado para convertir al menos una base de citosina no metilada de la secuencia de ADN genómico en uracilo u otra base que sea diferente en forma detectable a la citosina en términos de hibridación. Las secuencias genómicas en cuestión pueden comprender uno, o más, posiciones de CpG metiladas consecutivas o aleatorias. Dicho tratamiento comprende preferiblemente el uso de un reactivo seleccionado del grupo que consiste
55 de bisulfito, sulfito de hidrógeno, disulfito, y combinaciones de los mismos. En un aspecto preferido, el objetivo comprende el análisis de un ácido nucleico no natural modificado que comprende una secuencia de al menos 16 bases de nucleótidos contiguos de longitud de una secuencia seleccionada del grupo que consiste de las SEQ ID

NOS: 316, 317, 432 y 433, en donde dicha secuencia comprende al menos un dinucleótido CpG, TpA o CpA y las secuencias complementarias de los mismos. Las secuencias de las SEQ ID NOS: 316, 317, 432 y 433 proporcionan versiones modificadas de origen natural del ácido nucleico de acuerdo con la SEQ ID NO: 7, en donde 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 de la siguiente manera. Para cada ADN genómico de cadena sentido, por ejemplo, la SEQ ID NO: 1, se divulgan cuatro versiones convertidas. Una primera versión en donde "C" → "T", pero "CpG" sigue siendo "CpG" (es decir, corresponde al caso en el que, para la secuencia genómica, todos los residuos "C" de las secuencias de dinucleótidos CpG están metilados y por lo tanto no se convierten); una segunda versión divulga el complemento de la secuencia de ADN genómico divulgada (es decir, la cadena antisentido), en donde "C" → "T", pero "CpG" sigue siendo "CpG" (es decir, corresponde al caso donde, para todos los residuos "C" de las secuencias de dinucleótidos CpG están metilados y por tanto no se convierten). Las secuencias convertidas sobremetiladas de la SEQ ID NO: 7 corresponden a las SEQ ID NOS: 316 y 317. Se proporciona una tercera versión convertida químicamente de cada una de las secuencias genómicas, en donde "C" → "T" para todos los residuos "C", incluidas aquellas de las secuencias de dinucleótidos "CpG" (es decir, corresponde al caso en que, para las secuencias genómicas, todos los residuos "C" de las secuencias de dinucleótidos CpG están no metilados); una versión final convertida químicamente de cada secuencia, divulga el complemento de la secuencia divulgada de ADN genómico (es decir, cadena antisentido), en donde "C" → "T" para todos los residuos "C", incluidos aquellos de las secuencias del dinucleótido "CpG" (es decir, corresponde al caso en el que, para el complemento (cadena antisentido) de cada secuencia genómica, todos los residuos "C" de las secuencias de dinucleótidos CpG están no metilados). Las secuencias convertidas 'sobremetiladas' de la SEQ ID NO: 7 corresponden a las SEQ ID NOS: 432 y 433.

En una realización alternativa preferida, dicho análisis comprende el uso de un oligonucleótido u oligómero para la detección del estado de metilación de la citosina dentro del ADN genómico o tratado (modificado químicamente), de acuerdo con las SEQ ID NOS: 316, 317, 432 y 433. Dichos oligonucleótido u oligómero que comprende una secuencia de ácido nucleico que tiene una longitud de por lo menos nueve (9) nucleótidos que se hibrida, bajo condiciones moderadamente rigurosas o rigurosas (como se define aquí más arriba), con una secuencia de ácido nucleico tratada de acuerdo con las SEQ ID NOS: 316, 317, 432 y 433 y/o secuencias complementarias a las mismas, o con una secuencia genómica de acuerdo con la SEQ ID NO: 7 y/o secuencias complementarias a la misma.

Por lo tanto, la presente divulgación incluye moléculas de ácido nucleico (por ejemplo, oligonucleótidos y moléculas de ácido nucleico peptídico (PNA) (PNA-oligómeros)) que se hibridan bajo condiciones de hibridación moderadamente rigurosas y/o rigurosas con la totalidad o una porción de las secuencias SEQ ID NOS: 316, 317, 432 y 433, o con los complementos de las mismas. La porción que hibrida de los ácidos nucleicos de hibridación es típicamente de al menos 9, 15, 20, 25, 30 o 35 nucleótidos de longitud. Sin embargo, moléculas más largas tienen utilidad.

Preferiblemente, la porción de hibridación de los ácidos nucleicos de hibridación de la invención es al menos 95%, o al menos 98%, o 100% idéntica a la secuencia, o a una porción de la misma de las SEQ ID NOS: 7 o 316, 317, 432 y 433, o los complementos de las mismas.

Los ácidos nucleicos que hibridan del tipo descrito en el presente documento se puede utilizar, por ejemplo, como un cebador (por ejemplo, un cebador para PCR), o una sonda o cebador de diagnóstico y/o de pronóstico. Preferiblemente, la hibridación de la sonda de oligonucleótido con una muestra de ácido nucleico se lleva a cabo bajo condiciones rigurosas y la sonda es 100% idéntica a la secuencia objetivo. El dúplex de ácido nucleico o la estabilidad del híbrido se expresa como la temperatura de fusión o T_m, que es la temperatura a la cual se disocia una sonda de un ADN objetivo. Esta temperatura de fusión se utiliza para definir las condiciones de rigurosidad requeridas.

Para las secuencias objetivo que están relacionadas y son sustancialmente idénticas a la secuencia correspondiente de la SEQ ID NO: 7 (tal como las variantes alélicas y SNP), en lugar de idénticas, es útil establecer primero la temperatura más baja a la cual solamente se produce la hibridación homóloga con una concentración particular de sal (por ejemplo, SSC o SSPE). Luego, asumiendo que 1% de falta de correspondencia resulta en una disminución de 1°C en la T_m, la temperatura del lavado final en la reacción de hibridación se reduce en consecuencia (por ejemplo, si se buscan secuencias que tengan > 95% de identidad con la sonda, la temperatura final de lavado se reduce en 5°C). En la práctica, el cambio en la T_m puede estar de entre 0,5°C y 1,5°C por 1% de falta de correspondencia.

Preferiblemente, el conjunto se limita a aquellos oligómeros que comprenden al menos un dinucleótido CpG, TPG o CPA.

Se describen para cada una de las SEQ ID NOS: 7, 316, 317, 432 y 433 (sentido y antisentido), múltiples conjuntos que se superponen consecutivamente de oligonucleótidos u oligonucleótidos modificados de longitud X, donde, por ejemplo, X = 9, 10, 17, 20, 22, 23, 25, 27, 30 o 35 nucleótidos.

Los oligonucleótidos u oligómeros constituyen herramientas eficaces útiles para averiguar los parámetros genéticos y epigenéticos de la secuencia genómica correspondiente a la SEQ ID NO: 7. Los conjuntos preferidos de tales oligonucleótidos u oligonucleótidos modificados de longitud X son aquellos conjuntos que se superponen consecutivamente de oligómeros correspondientes a las SEQ ID NOS: 7, 316, 317, 432 y 433 (y los complementos de los mismos). Preferiblemente, dichos oligómeros comprenden al menos un dinucleótido CpG, TpG o CPA.

Los oligonucleótidos u oligómeros particularmente preferidos son aquellos en los que la citosina de las secuencias de dinucleótido CpG (o del correspondiente dinucleótido TPG o CPA convertido) está dentro del tercio medio del oligonucleótido; es decir, donde el oligonucleótido tiene, por ejemplo, 13 bases de longitud, el dinucleótido CpG, TpG o CPA está posicionado dentro del quinto al noveno nucleótido desde el extremo 5'.

Los oligonucleótidos también pueden ser modificados mediante el enlazamiento químico del oligonucleótido con una o más fracciones o conjugados para mejorar la actividad, estabilidad o detección del oligonucleótido. Tales fracciones o conjugados incluyen cromóforos, fluoróforos, lípidos tales como colesterol, ácido cólico, tioéter, cadenas alifáticas, fosfolípidos, poliaminas, polietilenglicol (PEG), fracciones palmitilo, y otros como se divulga, por ejemplo, en las patentes de los Estados Unidos Nos. 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 pueden también existir en la forma de un PNA (ácido nucleico peptídico) que tenga propiedades de apareamiento particularmente preferidas. Por lo tanto, el oligonucleótido puede incluir otros grupos anexos tales como péptidos, y puede incluir agentes de escisión activados por hibridación (Krol y colaboradores, *BioTechniques* 6: 958 - 976, 1988) o agentes de intercalamiento (Zon, *Pharm. Res.* 5: 539 - 549, 1988). Para tal fin, se puede conjugar el oligonucleótido con otra molécula, por ejemplo, un cromóforo, fluoróforo, péptido, agente de entrecruzamiento activado por hibridación, agente de transporte, agente de escisión activado por hibridación, etc.

El oligonucleótido puede comprender también al menos una fracción base y/o un azúcar modificado reconocido en la técnica, o pueden comprender un esqueleto principal modificado o enlace internucleosídico no natural.

Los oligonucleótidos u oligómeros se utilizan típicamente en 'conjuntos', que contienen al menos un oligómero para el análisis de cada uno de los dinucleótidos CpG de secuencias genómicas SEQ ID NO: 7 y secuencias complementarias de los mismos, o al correspondiente dinucleótido CpG, TpG o CPA dentro de una secuencia de los ácidos nucleicos tratados de acuerdo con las SEQ ID NOS: 304 a SEQ ID NO: 535 y las secuencias complementarias de las mismas. Sin embargo, se prevé que por factores económicos u otros factores, puede ser preferible analizar una selección limitada de los dinucleótidos CpG dentro de dichas secuencias, y el contenido del conjunto de oligonucleótidos se altera en consecuencia.

Por lo tanto, en realizaciones particulares, la presente divulgación proporciona un conjunto de al menos dos (2) (oligonucleótidos y/o PNA-oligómeros) útiles para detectar el estado de metilación de la citosina en el ADN genómico tratado (SEQ ID NOS: 316, 317, 432 y 433, o en ADN genómico (SEQ ID NO: 7 y las secuencias complementarias de la misma). Estas sondas permiten el diagnóstico, la clasificación y/o terapia de los parámetros genéticos y epigenéticos de los trastornos proliferativos de células colorrectales. El conjunto de oligómeros puede ser utilizado también para detectar polimorfismos de un solo nucleótido (SNP) en el ADN genómico tratado (SEQ ID NOS: 316, 317, 432 y 433 o en el ADN genómico (SEQ ID NO: 7 y secuencias complementarias de las mismas).

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

En realizaciones adicionales, la presente divulgación proporciona un conjunto de al menos dos (2) oligonucleótidos que se utilizan como oligonucleótidos 'cebadores' para amplificar secuencias de ADN de una de las SEQ ID NOS: 7, 316, 317, 432 y 433 y secuencias complementarias de las mismas, o segmentos de las mismas.

Se prevé que los oligonucleótidos pueden constituir todo o parte de una "matriz" o "chip de ADN" (es decir, un arreglo de diferentes oligonucleótidos y/u oligómeros de PNA unidos a una fase sólida). Tal matriz de diferentes secuencias de oligonucleótidos y/o PNA-oligómeros se pueden caracterizar, por ejemplo, porque están dispuestas sobre la fase sólida en la forma de un retículo 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 así como plásticos tales como nailon, que puede existir en la forma de pellos o también como matrices de resina. Una visión general del estado de la técnica en la fabricación de matrices de oligómeros puede obtenerse a partir de una edición especial de la revista *Nature Genetics* (*Nature Genetics Supplement*, volumen 21, enero de 1999, y de la literatura citada allí). Las sondas marcadas en forma fluorescente se utilizan frecuentemente para la exploración de matrices de ADN inmovilizadas. La simple unión de colorantes Cy3 y Cy5 al extremo 5'-OH de la sonda específica son particularmente adecuados para etiquetas de fluorescencia. La detección de la fluorescencia de las sondas hibridadas puede llevarse a cabo, por ejemplo, a través de un microscopio confocal. Los colorantes Cy3 y Cy5, además de muchos otros, están comercialmente disponibles.

También se anticipa que los oligonucleótidos, o secuencias particulares de los mismos, pueden constituir la totalidad o parte de una "matriz virtual" en donde se utilizan los oligonucleótidos, o secuencias particulares de los mismos, por ejemplo, como 'especificadores' como parte de, o en combinación con una población diversa de sondas marcadas

únicas para analizar una mezcla compleja de analitos. Tal método, se describe por ejemplo en la solicitud de patente de los Estados Unidos No. 2003/0013091. En tales métodos, se generan suficientes etiquetas para que cada ácido nucleico en la mezcla compleja (es decir, cada analito) se puede unir de forma única por medio de una etiqueta única y por lo tanto detectado (se hace recuento directo de cada etiqueta, dando como resultado una lectura digital de cada especie molecular en la mezcla).

Se prefiere particularmente que los oligómeros de acuerdo con la invención se utilicen para al menos uno de: detección de; la detección y diferenciación entre dos o más subclases de; diagnóstico de; pronóstico de; tratamiento de; seguimiento de; y tratamiento y seguimiento de trastornos proliferativos de células colorrectales. Esto es posible mediante el uso de dichos conjuntos para la detección o la detección y diferenciación de una o más de las siguientes clases de tejidos: carcinoma colorrectal, adenoma de colon, tejido inflamatorio del colon, adenomas de colon con displasia grado 2 menores de 1 cm, adenomas de colon con displasia grado 3 mayores de 1 cm, tejido normal de colon, tejido sano que no es de colon y tejido canceroso que no es de colon.

Se prefieren particularmente aquellos conjuntos de oligómeros relacionados con la SEQ ID NO: 7 (véase Tabla 2) que comprenden al menos dos oligonucleótidos seleccionados de uno de los siguientes conjuntos de oligonucleótidos:

SEQ ID NOS: 770-777; y

Al menos uno entre el tejido de carcinoma colorrectal o adenomas de colon se puede distinguir de al menos un tejido seleccionado del grupo que consiste de tejido inflamatorio de colon y tejido normal de colon. Esto se logra mediante el análisis del estado de metilación de al menos una secuencia objetivo que comprende, o que hibrida bajo condiciones rigurosas con al menos 16 nucleótidos contiguos de la SEQ ID NO: 7 o un complemento de la misma. Esto se logra preferiblemente mediante el uso de un conjunto que consta de al menos un oligonucleótido, y más preferiblemente al menos dos seleccionados de uno de los grupos que consiste en, o mediante el uso de un conjunto que comprende al menos dos oligonucleótidos seleccionados de uno de los grupos que consisten en:

SEQ ID NOS: 770-777

El carcinoma colorrectal se puede distinguir de al menos un tejido seleccionado a partir del grupo que consiste en tejido sano que no es de colon, linfocitos de sangre periférica y el cáncer que no es de colon. En una forma de realización esto se logra mediante el análisis del estado de metilación de al menos una secuencia objetivo que comprende, o que hibrida bajo condiciones rigurosas con al menos 16 nucleótidos contiguos de la SEQ ID NO: 7. Esto se logra preferiblemente mediante el uso de un conjunto que consta de al menos un oligonucleótido, y más preferiblemente al menos dos oligonucleótidos seleccionados de uno de los grupos que consisten en:

SEQ ID NOS: 770-777

El carcinoma colorrectal se puede distinguir de al menos un tejido seleccionado a partir del grupo que consiste de tejido inflamatorio colon, tejido normal de colon, tejido sano que no es de colon, linfocitos de sangre periférica, adenomas de colon y tejido canceroso que no es de colon. Esto se logra mediante el análisis del estado de metilación de al menos una secuencia objetivo que comprende, o se hibrida bajo condiciones rigurosas con al menos 16 nucleótidos contiguos de una SEQ ID NO: 7 o un complemento de la misma. Esto se logra preferiblemente mediante el uso de un conjunto que consta de al menos un oligonucleótido, y más preferiblemente al menos dos mediante el uso de un conjunto de oligómeros que comprende al menos dos oligonucleótidos seleccionados de uno de los grupos que consisten en:

SEQ ID NOS: 770-777

Al menos uno del tejido de carcinoma colorrectal o adenomas de colon se distingue de al menos un tejido seleccionado del grupo que consiste de tejido inflamatorio de colon y el tejido normal de colon. Esta se logra mediante el análisis del estado de metilación de al menos una secuencia objetivo que comprende, o que hibrida bajo condiciones rigurosas con al menos 16 nucleótidos contiguos de la SEQ ID NO: 7 o un complemento de la misma. Esto se logra preferiblemente mediante el uso de un conjunto que consta de al menos un oligonucleótido, y más preferiblemente al menos dos oligómeros que comprenden al menos dos oligonucleótidos seleccionados de uno de los grupos que consisten en:

SEQ ID NOS: 770-777

El tejido de carcinoma colorrectal se puede distinguir de al menos uno de tejido inflamatorio de colon y tejido normal de colon. Esto se logra mediante el análisis del estado de metilación de al menos una secuencia objetivo que comprende, o que hibrida bajo condiciones rigurosas con al menos 16 nucleótidos contiguos de la SEQ ID NO: 7 o un complemento de la misma. Esto se logra preferiblemente mediante el uso de un conjunto que consiste de al menos un oligonucleótido, y más preferiblemente al menos dos oligómeros que comprende al menos dos oligonucleótidos seleccionados de uno de los grupos que consisten en:

SEQ ID NOS: 770-777

- Al menos uno de tejido de carcinoma colorrectal, o adenomas de colon se distingue de al menos un tejido seleccionado del grupo que consiste de tejido inflamatorio del colon, tejido normal de colon, tejido sano que no es de colon, linfocitos de sangre periférica, y tejido de cáncer que no es de colon. Esto se logra mediante el análisis del estado de metilación de al menos una secuencia objetivo que comprende, o que hibrida bajo condiciones rigurosas con al menos 16 nucleótidos contiguos de la SEQ ID NO: 7 o un complemento de la misma. Esto se logra preferiblemente mediante el uso de un conjunto que consiste de al menos un oligonucleótido, y más preferiblemente al menos dos oligómeros que comprende al menos dos oligonucleótidos seleccionados de uno de los grupos que consisten en:
- SEQ ID NOS: 770-777
- 10 Los tejidos procedentes del colon se pueden distinguir de los tejidos que no se originan en el colon mediante el uso de un conjunto de oligómeros que comprende al menos dos oligonucleótidos seleccionados de uno de los grupos que consiste en:
- SEQ ID NOS: 770-777
- 15 Se describe un método para averiguar los parámetros genéticos y/o epigenéticos de las secuencias genómicas de acuerdo con la SEQ ID NO: 7 dentro de un sujeto mediante el análisis de la metilación de citosina y polimorfismos de un solo nucleótido. Dicho método comprende poner en contacto un ácido nucleico que comprende una o más de la SEQ ID NO: 7 en una muestra biológica obtenida a partir de dicho sujeto con al menos un reactivo o una serie de reactivos, en donde dicho reactivo o serie de reactivos, distingue entre dinucleótidos CpG metilados y no metilados dentro del ácido nucleico objetivo.
- 20 Preferiblemente, dicho método comprende las siguientes etapas: En la primera etapa, se obtiene una muestra del tejido a analizar. La fuente puede ser cualquier fuente adecuada, tal como líneas celulares, cortes histológicos, biopsias, tejidos incluidos en parafina, fluidos corporales, heces, efluente colónico, orina, plasma sanguíneo, suero sanguíneo, sangre entera, células sanguíneas aisladas, células aisladas de la sangre y todas las combinaciones posibles de los mismos. Se prefiere que dichas fuentes de ADN sean las heces o fluidos corporales seleccionados del grupo que consiste de efluente colónico, orina, plasma sanguíneo, suero sanguíneo, sangre entera, células sanguíneas aisladas, células aisladas de la sangre.
- 25 El ADN genómico se aísla luego a partir de la muestra. El ADN genómico puede ser aislado por cualquier medio estándar en la técnica, incluyendo el uso de kits disponibles comercialmente. En resumen, cuando el ADN de interés está encapsulado en una membrana celular, la muestra biológica debe ser rota y lisada por un medio enzimático, químico o mecánico. La solución de ADN puede ser luego limpiada de proteínas y otros contaminantes, por ejemplo, por digestión con proteinasa K. El ADN genómico se recupera luego de la solución. Esto puede llevarse a cabo por medio de una variedad de métodos, incluyendo precipitación por saturación salina, extracción orgánica o enlazamiento del ADN a un soporte de fase sólida. La elección del método se verá afectada por varios factores, incluyendo el tiempo, el costo y cantidad necesaria de ADN.
- 30 Una vez se han extraído los ácidos nucleicos, se usa el ADN genómico bicatenario en el análisis.
- En la segunda etapa del método, se trata la muestra de ADN genómico de una manera tal que las bases de citosina que no están metiladas en la posición 5' se convierten en uracilo, timina, u otra base que sea diferente a la citosina en términos de comportamiento de hibridación. Esto se entiende aquí como "pretratamiento" o "tratamiento".
- 40 El tratamiento descrito anteriormente del ADN genómico se lleva a cabo preferiblemente con bisulfito (sulfito de hidrógeno, disulfito) y posterior hidrólisis alcalina que da como resultado la conversión de nucleobases de citosina no metiladas en uracilo o en otra base que sea diferente a la citosina en términos del comportamiento de apareamiento de bases.
- 45 En la tercera etapa del método, se amplifican fragmentos del ADN tratado, usando conjuntos de oligonucleótidos cebadores divulgados aquí, y una enzima de amplificación. La amplificación de varios segmentos de ADN puede llevarse a cabo simultáneamente en uno y el mismo recipiente de reacción. Típicamente, la amplificación se lleva a cabo utilizando una reacción en cadena de la polimerasa (PCR). El conjunto de oligonucleótidos cebadores incluye al menos dos oligonucleótidos cuyas secuencias son cada una complementarias inversas, idénticas, o hibridan bajo condiciones rigurosas o altamente rigurosas con un segmento de al menos de 16 pares de bases de largo de las secuencias de bases de una de las SEQ ID NO: 316, 317, 432 y 433y secuencias complementarias de las mismas.
- 50 Alternativamente el estado de metilación de las posiciones preseleccionadas de CpG dentro de las secuencias de ácido nucleico que comprende la SEQ ID NO: 7 se pueden detectar mediante el uso de oligonucleótidos del cebador específico de metilación. Esta técnica (MSP) ha sido descrita en la patente de los Estados Unidos No. 6.265.171 de Herman. El uso de cebadores específicos del estado de metilación para la amplificación del ADN tratado con bisulfito permite la diferenciación entre ácidos nucleicos metilados y no metilados. Los pares cebadores para MSP contienen al menos un cebador que se hibrida con un dinucleótido CpG tratado con bisulfito. Por lo tanto, la secuencia de dichos cebadores comprende al menos un dinucleótido CpG. Los cebadores para MSP específicos para el ADN no metilado contienen una "T" en la posición de la posición C en el CpG. Preferiblemente, por lo tanto, se requiere que
- 55

la secuencia de bases de dichos cebadores contenga una secuencia que tenga una longitud de al menos 9 nucleótidos que se hibrida con una secuencia de ácido nucleico tratada de acuerdo con una de las SEQ ID NOS: 316, 317, 432 y 433 y las secuencias complementarias de las mismas, en donde la secuencia de bases de dichos oligómeros comprende al menos un dinucleótido CpG.

- 5 Una realización adicional preferida del método comprende el uso de oligonucleótidos bloqueadores. El uso de tales oligonucleótidos bloqueadores ha sido descrito por Yu y colaboradores, *BioTechniques* 23: 714 - 720, 1997. Los oligonucleótidos de la sonda de bloqueo se hibridan con el ácido nucleico tratado con bisulfito al mismo tiempo con los cebadores de PCR. La amplificación por PCR del ácido nucleico se termina en la posición 5' de la sonda de bloqueo, de tal manera que la amplificación de un ácido nucleico se suprime cuando está presente la secuencia complementaria a la sonda de bloqueo. Las sondas pueden diseñarse para hibridar con el ácido nucleico tratado con bisulfito de una manera específica del 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.

Para los métodos de PCR utilizando oligonucleótidos bloqueantes, la ruptura eficiente de la amplificación mediada por polimerasa requiere que los oligonucleótidos bloqueadores no sean alargados por la polimerasa. Preferiblemente, esto se logra a través del uso de los bloqueadores que son 3'-desoxi oligonucleótidos, u oligonucleótidos que forman derivados en la posición 3' con un grupo diferente a un grupo hidroxilo "libre". Por ejemplo, los oligonucleótidos 3'-O-acetilo son representativos de una clase preferida de molécula bloqueadora.

Adicionalmente, la descomposición mediada por polimerasa de los oligonucleótidos bloqueadores debe ser impedida. Preferiblemente, tal impedimento comprende o bien el uso de una polimerasa que carece de actividad exonucleasa 5' - 3', o el uso de oligonucleótidos bloqueadores modificados que tienen, por ejemplo, puentes tioato en los terminales 5' de los mismos que vuelven a la molécula bloqueadora resistente a la nucleasa. Aplicaciones particulares pueden no requerir de tales modificaciones en 5' del bloqueador. Por ejemplo, si los sitios de enlazamiento del cebador y del bloqueador se superponen, impidiendo así el enlazamiento del cebador (por ejemplo, con exceso de bloqueador), se impedirá sustancialmente la degradación del oligonucleótido bloqueador. Esto es debido a que la polimerasa no extenderá el cebador hacia, y a través (en la dirección 5'-3) de un proceso bloqueador que da lugar normalmente a la degradación del oligonucleótido bloqueador hibridado.

- 30 Una realización particularmente preferida de bloqueador/PCR, para los propósitos de la presente invención y tal como se implementa en la presente invención, comprende el uso de oligómeros de ácido nucleico peptídico (PNA) como oligonucleótidos de bloqueo. Tales oligómeros bloqueadores de PNA son idealmente adecuados, ya que ni se descomponen ni tampoco se extienden por la polimerasa.

Preferiblemente, por lo tanto, se requiere que la secuencia de bases de dichos oligonucleótidos de bloqueo contenga una secuencia que tenga una longitud de al menos 9 nucleótidos que hibride con una secuencia de ácido nucleico tratada de acuerdo con una de las SEQ ID NOS: 316, 317, 432 y 433 y las secuencias complementarias de las mismas, en donde la secuencia de bases de dichos oligonucleótidos comprende al menos un dinucleótido CpG, TpG o CPA.

Los fragmentos obtenidos por medio de la amplificación pueden portar un marcador directa o indirectamente detectable. Se prefieren las etiquetas en forma de marcadores de fluorescencia, radionucleidos o fragmentos separables de moléculas que tienen una masa típica que puede ser detectada en un espectrómetro de masas. Donde dichos marcadores son marcadores de masa, se prefiere que los amplificados marcados tengan una sola carga neta positiva o negativa, permitiendo ser detectados mejor en el espectrómetro de masas. La detección puede llevarse a cabo y ser visualizada, por ejemplo, por medio de desorción de la matriz asistida por láser/espectrometría de masas por ionización (MALDI) o usando espectrometría de masas por electrodispersión (ESI).

La espectrometría de masas por desorción/ionización láser asistida de la matriz (MALDI-TOF) es un desarrollo muy eficiente para el análisis de biomoléculas (Karas y Hillenkamp, *Anal Chem.*, 60: 2299 - 301, 1988). Un analito está incluido en una matriz absorbente de luz. La matriz es evaporada por 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 and Future Trends*, 1: 147 - 57, 1995). La sensibilidad con respecto al análisis de ácido nucleico es aproximadamente 100 veces menor que para los péptidos, y disminuye desproporcionadamente al aumentar el tamaño del fragmento. Por otra parte, para los ácidos nucleicos que tienen una estructura principal con múltiples cargas negativas, el proceso de ionización a través de la matriz es considerablemente menos eficiente. En espectrometría MALDI-TOF, la selección de la matriz desempeña un papel eminentemente importante. Para la desorción de péptidos, se han encontrado varias matrices muy eficaces que producen una cristalización muy fina. En la actualidad existen varias matrices sensibles para ADN, sin embargo, la diferencia de sensibilidad entre los péptidos y los ácidos nucleicos no se ha

- reducido. Esta diferencia en la sensibilidad puede reducirse, sin embargo, modificando químicamente el ADN de tal manera que se haga más similar a un péptido. Por ejemplo, los ácidos nucleicos de fosfortioato, en los que se sustituyen los fosfatos habituales de la estructura principal con tiofosfatos, se puede convertir en un ADN de carga neutra usando química de alquilación sencilla (Gut & Beck, *Nucleic Acids Res.* 23: 1367 - 73, 1995). El acoplamiento de una etiqueta de carga con este ADN modificado produce como resultado un aumento de la sensibilidad de MALDI-TOF al mismo nivel que el encontrado para los péptidos. Una ventaja adicional de etiquetado con carga es la mayor estabilidad del análisis contra las impurezas, que hace que la detección de sustratos no modificados sea considerablemente más difícil.
- En la cuarta etapa del método, los amplificadores obtenidos durante la tercera etapa del método se analizan con el fin de determinar el estado de metilación de los dinucleótidos CpG antes del tratamiento.
- En realizaciones en las que los amplificadores fueron obtenidos por medio de la amplificación por MSP, la presencia o ausencia de un amplificador es en sí misma indicativa del estado de metilación de las posiciones de CpG cubiertas por el cebador, según las secuencias de bases de dicho cebador.
- Los amplificadores obtenidos tanto a través de PCR estándar como específica de metilación pueden analizarse además por medio de métodos basados en la hibridación tales como, pero sin limitarse a, tecnología de matriz y tecnologías con base en una sonda así como por medio de técnicas tales como secuenciación y extensión dirigida al molde.
- En una realización del método, 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 usadas durante la hibridación está compuesto preferiblemente por al menos 2 oligonucleótidos u oligómeros de PNA; en el proceso, los amplificadores sirven como sondas que se hibridan con oligonucleótidos previamente enlazados a una fase sólida; los fragmentos no hibridados se eliminan posteriormente; dichos oligonucleótidos contienen al menos una secuencia de bases que tiene una longitud de al 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 al menos un dinucleótido CpG, TpG o CPA.
- En una realización preferida, dicho dinucleótido está presente en el tercio central del oligómero. Por ejemplo, en donde el oligómero comprende un dinucleótido CpG, dicho dinucleótido es preferiblemente el quinto a noveno nucleótido del extremo 5' final de 13 mer. Existe un oligonucleótido para el análisis de cada dinucleótido CpG dentro de la secuencia de acuerdo a las SEQ ID NOS: 7, y las posiciones equivalentes dentro de las SEQ ID NOS: 316, 317, 432 y 433. Dichos oligonucleótidos también pueden estar presentes en forma de ácidos nucleicos peptídicos. Los amplificadores no hibridados son entonces eliminados. Se detectan luego los amplificadores hibridados. En este contexto, se prefiere que las etiquetas asociadas a los amplificadores sean identificables en cada posición de la fase sólida en la que se localiza una secuencia de oligonucleótidos.
- En otra forma de realización adicional del método, el estado de metilación genómica de las posiciones de CpG puede ser comprobado por medio de sondas de oligonucleótidos que se hibridan con el ADN tratado con bisulfito concurrentemente con los cebadores de amplificación de PCR (en donde dichos cebadores pueden ser o bien específicos de la metilación o estándar).
- Una realización particularmente preferida de este método es el uso de PCR cuantitativa en tiempo real basada en fluorescencia (Heid y colaboradores, *Genome Res.* 6: 986 - 994, 1996; véase también la patente de los Estados Unidos No. 6.331.393) empleando una sonda de oligonucleótidos fluorescente doblemente marcada (PCR con TaqMan^{MR}, utilizando un sistema de detección de secuencias ABI Prism 7700, Perkin Elmer Applied Biosystems, Foster City, California). La reacción PCR con TaqMan^{MR} emplea el uso de un oligonucleótido de interrogación no extendible, llamado sonda TaqMan^{MR}, que, en realizaciones preferidas, está diseñado para hibridar con una secuencia rica en GpC localizada entre los cebadores de amplificación directo e inverso. La sonda TaqMan^{MR} comprende además una "fracción reportera" fluorescente y una "fracción inactivadora" unidas covalentemente a fracciones enlazadoras (por ejemplo, fosforamiditas) unidas a los nucleótidos del oligonucleótido TaqMan^{MR}. Para el análisis de metilación dentro de los ácidos nucleicos después del tratamiento con bisulfito, se requiere que la sonda sea específica para metilación, tal como se describe en la patente de los Estados Unidos No. 6.331.393, también conocido como el ensayo MethylLight^{MR}. Las variaciones sobre la metodología de detección TaqMan^{MR} que también son adecuadas para uso con la invención descrita incluyen el uso de tecnología de doble sonda (Lightcycler^{MR}) o cebadores de amplificación fluorescentes (tecnología Sunrise^{MR}). Estas dos técnicas se puede adaptar de una manera adecuada para uso con ADN tratado con bisulfito, y por otra parte para el análisis de metilación dentro de dinucleótidos CpG.
- Otro método adecuado para el uso de oligonucleótidos de sonda para la evaluación de la metilación mediante el análisis de ácidos nucleicos tratados con bisulfito. En una realización adicional preferida del método, la quinta etapa del método comprende el uso de la extensión del oligonucleótido dirigida al molde, tal como MS-SNuPE según lo descrito por Gonzalgo y Jones, *Nucleic Acids Res.* 25: 2529 - 2531, 1997.

ES 2 659 325 T3

En aún una realización adicional del método, la quinta etapa del método comprende la secuenciación y posterior análisis de la secuencia del amplificado generado en la tercera etapa del método (Sanger F., y colaboradores, Proc Natl Acad Sci EE.UU. 74: 5463 - 5467, 1977).

Mejor modo

5 En la realización más preferida del método, los ácidos nucleicos genómicos se aíslan y se tratan de acuerdo con las tres primeras etapas del método descrito anteriormente, a saber:

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

b) extraer o bien aislar el ADN genómico;

10 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 del mismo en uracilo o en otra base que sea detectablemente en forma distinta a la citosina en términos de propiedades de hibridación; y en donde

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

15 e) la detección de los amplificados se lleva a cabo por medio de una sonda de detección en tiempo real, como se describe más arriba.

Preferiblemente, cuando la amplificación posterior de d) se lleva a cabo por medio de cebadores específicos de metilación, como se ha descrito anteriormente, dichos cebadores específicos de metilación comprenden una secuencia que tiene una longitud de al menos 9 nucleótidos que se hibrida con una secuencia de ácido nucleico tratado de acuerdo con una de las SEQ ID NOS: 316, 317, 432 y 433 y secuencias complementarias de las mismas, en donde la secuencia de bases de dichos oligómeros comprende al menos un dinucleótido CpG.

20 La etapa e) del método, a saber, la detección de los amplificados específicos indicativos del estado de metilación de una o más posiciones de CpG de acuerdo con la SEQ ID NO: 7 se lleva a cabo por medio de métodos de detección en tiempo real como se ha descrito anteriormente, y en donde la secuencia de dichas sondas de hibridación se selecciona de las secuencias especificadas a continuación para la detección de SEQ ID NO: 7, se pueden usar los siguientes oligonucleótidos como se detalla en el listado de secuencias para un análisis combinado MSP en tiempo real:

Ensayos de detección con una única sonda Taqman en tiempo real:

SEQ ID NO: 7

30 Cebador izquierdo: 4649, 4652, 4655, 4659, 4661, 4663, 4664, 4665, 4668, 4671, 4674, 4675, 4676, 4678, 4680, 4683, 4686, 4690, 4696, 4700, 4703, 4704, 4706, 4709, 4711, 4714, 4715, 4717, 4718, 4719, 4720, 4721, 4726, 4727, 4730, 4732, 4738, 4742, 4745, 4749, 4750, 4753, 4755, 4759, 4763, 4768, 4769, 4772, 4773, 4776, 4778, 4779, 4782, 4784, 4789, 4790, 4794, 4797, 4801, 4805, 4807, 4813, 4814, 4819, 4821, 4822, 4827, 4829, 4833, 4834, 4835, 4837, 4838, 4841, 4842, 4843, 4844, 4847, 4849, 4850, 4852, 4853, 4859, 4860, 4861, 4865, 4867, 4868, 4869, 4870, 4873, 4876, 4877, 4878, 4879, 4883, 4885, 4889, 4891, 4892, 4894, 4895, 4897, 4898, 4903, 4906, 4911, 4912, 4918, 4919, 4920, 4924, 4927, 4929, 4932, 4934, 4941, 4942, 4945, 4948, 4949, 4950,

40 Cebador derecho: 4650, 4653, 4656, 4658, 4660, 4662, 4666, 4667, 4669, 4670, 4672, 4677, 4681, 4684, 4685, 4687, 4688, 4689, 4691, 4693, 4694, 4695, 4697, 4699, 4701, 4702, 4705, 4707, 4708, 4716, 4722, 4724, 4728, 4731, 4733, 4735, 4736, 4737, 4739, 4741, 4744, 4746, 4748, 4751, 4754, 4756, 4758, 4760, 4761, 4764, 4766, 4767, 4770, 4771, 4774, 4777, 4780, 4783, 4785, 4786, 4787, 4788, 4791, 4792, 4793, 4795, 4798, 4800, 4802, 4804, 4806, 4808, 4810, 4811, 4812, 4815, 4816, 4817, 4818, 4820, 4823, 4824, 4825, 4828, 4830, 4832, 4836, 4839, 4840, 4845, 4846, 4848, 4851, 4854, 4855, 4856, 4857, 4858, 4862, 4864, 4871, 4872, 4874, 4875, 4881, 4882, 4884, 4886, 4887, 4890, 4893, 4896, 4899, 4900, 4901, 4902, 4904, 4905, 4907, 4908, 4909, 4910, 4913, 4915, 4917, 4921, 4922, 4923, 4925, 4926, 4328, 4930, 4935, 4936, 4937, 4938, 4940, 4943, 4944, 4946, 4947, 4951, 4952,

45 Detección: 4651, 4654, 4657, 4673, 4679, 4682, 4692, 4698, 4710, 4712, 4713, 4723, 4725, 4729, 4734, 4740, 4743, 4747, 4752, 4757, 4762, 4765., 4775, 4781, 4796, 4799, 4803, 4809, 4826, 4831, 4863, 4866, 4880, 4888, 4914, 4916, 4931, 4933, 4939,

SEQ ID NO: 7

50 Cebador izquierdo: 12006, 12011, 12015, 12016, 12017, 12021, 12022, 12023, 12024, 12025, 12026, 12027, 12031, 12034, 12042, 12043, 12045, 12049, 12050, 12051, 12054, 12062, 12063, 12064, 12066, 12067, 12068, 12070, 12072, 12076, 12082, 12085, 12086, 12089, 12090, 12093, 12094, 12095, 12096, 12097, 12098, 12101, 12103, 12107, 12108, 12111, 12112, 12114, 12118, 12119, 12120, 12128,

Cebador derecho: 12007, 12010, 12012, 12020, 12028, 12032, 12033, 12035, 12038, 12039, 12044, 12046, 12052, 12055, 12056, 12057, 12058, 12059, 12060, 12061, 12065, 12069, 12071, 12073, 12077, 12080, 12081, 12084, 12087, 12088, 12091, 12099, 12100, 12102, 12104, 12109, 12110, 12113, 12115, 12121, 12122, 12123, 12124, 12125, 12127, 12129,

5 Detección: 12008, 12013, 12018, 12029, 12036, 12040, 12047, 12074, 12078, 12083, 12105, 12116,

Anchor: 12009, 12014, 12019, 12030, 12037, 12041, 12048, 12053, 12075, 12079, 12036, 12092, 12106, 12117, 12126,

10 En una realización más preferida alternativa del método, la amplificación posterior de d) se lleva a cabo en presencia de oligonucleótidos de bloqueo, como se describe más arriba. Dichos oligonucleótidos de bloqueo que comprenden una secuencia que tiene una longitud de al menos 9 nucleótidos que hibrida con una secuencia tratada de ácido nucleico de acuerdo con una de las SEQ ID NOS: 316, 317, 432 o 433 y las secuencias complementarias de las mismas, en donde la secuencia de bases de dichos oligómeros comprende al menos un dinucleótido CpG, TpG o CPA. Etapa e) del método, a saber, la detección de los amplificadores específicos indicativos del estado de metilación de una o más posiciones de CpG de acuerdo con la SEQ ID NO: 7 se lleva a cabo por medio de métodos de
15 detección en tiempo real como se describió anteriormente.

La etapa e) del método, a saber, la detección de los amplificadores específicos indicativos del estado de metilación de una o más posiciones de CpG de acuerdo con la SEQ ID NO: 7 se lleva a cabo por medio de métodos de detección en tiempo real como se describió anteriormente, y en el que la secuencia de dichas sondas de hibridación se selecciona del grupo que consiste en las SEC ID NOS: 1308 y 1309. los siguientes oligonucleótidos como se detalla en la lista de secuencias pueden usarse para un análisis combinado de Bloqueo de oligonucleótido-tiempo real: Ensayos de detección de sonda doble Lightcycler:

SEQ ID NO: 7

Cebador izquierdo: 1307, 1311,

25 Cebador derecho: 1306, 1312, 1313, 1314, 1323, 1326, 1329, 1331, 1333, 1335, 1336, Blocker: 1310, 1315, 1316, 1317, 1318, 1319, 1320, 1321, 1322, 1324, 1325, 1327, 1328, 1330, 1332, 1334, 1337, 1338,

Detección: 1308,

Ancla: 1309,

Las realizaciones adicionales de la invención proporcionan un método para el análisis del estado de metilación de ADN genómico como se describe en el presente documento (SEQ ID NO: 7, y complementos de la misma) sin la
30 necesidad de tratamiento previo.

En la primera etapa de tales realizaciones adicionales, la muestra de ADN genómico se aísla del tejido o de fuentes celulares. Preferiblemente, tales fuentes incluyen líneas celulares, cortes histológicos, fluidos corporales, o tejido embebido en parafina. En la segunda etapa, se extrae el ADN genómico. La extracción puede ser por medios que son estándar para un experto en la técnica, incluyendo, pero sin limitarse al uso de lisados con detergente, sonificación y agitación tipo vórtice con perlas de vidrio.
35

Una vez que se han extraído los ácidos nucleicos, se usa el ADN bicatenario genómico en el análisis.

El ADN puede escindirse antes del tratamiento, y esto puede hacerse por cualquier medio estándar en el estado de la técnica, en particular, con endonucleasas de restricción sensibles a la metilación.

40 En la tercera etapa, se digiere luego el ADN con una o más enzimas de restricción sensibles a la metilación. La digestión se lleva a cabo de tal manera que la hidrólisis del ADN en el sitio de restricción es informativa del estado de metilación de un dinucleótido CpG específico.

En la cuarta etapa, que es opcional, pero realización, se amplifican los fragmentos de restricción. Esto se lleva a cabo preferiblemente utilizando una reacción en cadena de la polimerasa, y dichos amplificadores pueden portar marcadores detectables adecuados como se discutió anteriormente, a saber, etiquetas de fluoróforo, radionucleidos y marcadores de masa.
45

En la quinta etapa se detectan los amplificadores. La detección puede ser por cualquier medio estándar en la técnica, por ejemplo, pero sin limitarse a, análisis por electroforesis en gel, análisis de hibridación, incorporación de etiquetas detectables dentro de los productos de PCR, análisis de una matriz de ADN, análisis MALDI o ESI.

50 Después de la determinación del estado de metilación de los ácidos nucleicos genómicos, se deduce la presencia, ausencia o subclase del trastorno proliferativo de células colorrectales con base en el estado de metilación de al menos una secuencia del dinucleótido CpG de la SEQ ID NO: 7, o un promedio, o un valor que refleja un estado de metilación promedio de una pluralidad de secuencias del dinucleótido CpG de la SEQ ID NO: 7.

Ensayos de diagnóstico para los trastornos proliferativos de células colorrectales

5 Se describe un diagnóstico de los eventos que son desfavorables para pacientes o individuos en los que se pueden usar como marcadores parámetros genéticos y/o epigenéticos importantes dentro de la SEQ ID NO: 7. Dichos parámetros obtenidos como se describe en el presente documento se pueden comparar con otro conjunto de parámetros genéticos y/o epigenéticos, sirviendo las diferencias como base para un diagnóstico y/o pronóstico de eventos que son desfavorables para los pacientes o individuos.

10 Más específicamente, se describe la detección de las poblaciones en riesgo para la detección temprana de carcinomas colorrectales. Otras realizaciones del método pueden usarse también como alternativas para la detección citológica para la diferenciación de los carcinomas colorrectales de otros trastornos proliferativos de células del colon, por ejemplo, pólipos del colon.

15 Específicamente, se describen ensayos diagnósticos de cáncer basados en la medición de metilación diferencial de una o más secuencias de dinucleótidos CpG de la SEQ ID NO: 7, o de las subregiones de los mismos que comprenden tal secuencia del dinucleótido CpG. Típicamente, tales ensayos implican la obtención de una muestra de tejido de un tejido de prueba, realizar un ensayo para medir el estado de metilación de al menos una o más secuencias del dinucleótido CpG de la SEQ ID NO: 7 derivado de la muestra de tejido, en relación con una muestra de control, o un estándar conocido y hacer un diagnóstico o pronóstico basado en ella.

20 En realizaciones preferidas particulares, se usan oligómeros para evaluar el estado de metilación del dinucleótido CpG, tal como aquellos basados en las SEQ ID NOS: 7, 316, 317, 432 y 433, o las matrices de los mismos, así como en kits basados en ellos y útiles para el diagnóstico y/o el pronóstico de los trastornos proliferativos de células colorrectales.

Kits

25 Por otra parte, un aspecto adicional de la presente invención es el uso de un kit que comprende, por ejemplo: un reactivo que contiene bisulfito; un conjunto de oligonucleótidos cebadores que contiene al menos dos oligonucleótidos cuyas secuencias corresponden en cada caso, son complementarias, o se hibridan en condiciones rigurosas o altamente rigurosas con un segmento de 16 bases de largo de la secuencias SEQ ID NOS: 7, 316, 317, 432 y 433; oligonucleótidos y/o oligómeros de PNA; así como instrucciones para llevar a cabo y evaluar el método descrito. En una realización preferida adicional, dicho kit puede comprender además reactivos estándar para realizar un análisis de metilación específico de la posición de CpG, en donde dicho análisis comprende una o más de las siguientes técnicas: MS-SNuPE, MSP, MethyLight^{MR}, HeavyMethyl^{MR}, COBRA, y secuenciación de ácido nucleico. Sin embargo, un kit según las líneas de la presente invención también puede contener sólo una parte de los componentes antes mencionados.

Aunque la presente invención ha sido descrita con especificidad de acuerdo con ciertas de sus formas preferidas de realización, los siguientes ejemplos sirven solamente para ilustrar la invención y no están destinados a limitar la invención, que se define por las reivindicaciones adjuntas.

35 **Ejemplos**

40 Se recibieron las muestras de tejido, ya sea como ADN genómico extraído o de tejido congelado. Se extrajeron las muestras de ADN utilizando regulador de lisis de Qiagen y el kit de separación magnética de Roche para el aislamiento del ADN genómico. Las muestras de ADN fueron también extraídas usando columnas Tip-100 de Qiagen Genomic, así como el dispositivo MagnaPure y reactivos de Roche. Todas las muestras se cuantificaron utilizando técnicas espectrofotométricas o fluorométricas y en geles de agarosa para un subconjunto de muestras.

Tratamiento con bisulfito y mPCR

45 El ADN genómico total de todas las muestras fue tratado con bisulfito para la conversión de citosinas no metiladas en uracilo. Las citosinas metiladas permanecieron conservadas. El tratamiento con bisulfito se realizó con modificaciones menores según el protocolo descrito en Olek y colaboradores (1996). Con el fin de evitar el procesamiento de todas las muestras con el mismo fondo biológico todas lo que resulta en una desviación potencial del proceso en los datos más adelante, las muestras se agruparon al azar en lotes de procesamiento. Para el tratamiento con bisulfito se crearon lotes de 50 muestras al azar para el sexo, el diagnóstico y el tejido. Por muestra de ADN se realizaron dos reacciones independientes con bisulfito. Después de la bisulfitación se usaron 10 ng de cada muestra de ADN en posteriores reacciones mPCR que contienen 6-8 pares de cebadores.

50 Cada reacción contenía lo siguiente:

0,4 mM de cada dNTP

1 Unidad de Taq polimerasa

2,5 µl de regulador para PCR

MgCl₂ 3,5 mM

Conjunto de cebadores 80 nM (12 - 16 cebadores)

11,25 ng de ADN (tratado con bisulfito)

Más detalles de los cebadores se muestran en la Tabla 1.

- 5 Se llevaron a cabo cuarenta ciclos de la siguiente manera: desnaturalización a 95°C durante 15 min, seguido de hibridación a 55°C durante 45 s, alargamiento del cebador a 65°C durante 2 min. Se llevó a cabo un alargamiento final a 65°C durante 10 min.

1.1.2 Hibridación

- 10 Todos los productos PCR de cada muestra individual fueron luego hibridados en portaobjetos de vidrio que portan un par de oligonucleótidos inmovilizados para cada posición de CpG bajo análisis. Cada uno de estos oligonucleótidos de detección fue diseñado para hibridarse con la secuencia convertida con bisulfito alrededor de un sitio de CpG que era o bien originalmente no metilada (TG) o metilada (CG). Véase la Tabla 2 para más detalles de todos los oligonucleótidos de hibridación utilizados (tanto informativos como no informativos). Se seleccionaron las condiciones de hibridación para permitir la detección de las diferencias de un solo nucleótido entre las variantes de TG y CG.

Se diluyó un volumen de 5 µl de cada producto de la PCR multiplex en regulador 10 x SSARC (10 x SSARC: 230 ml 20 x SSC, 180 ml de solución de lauroil sarcosinato de sodio al 20%, diluir hasta 1000 ml con dH₂O). Se hibridó luego la mezcla de reacción con los oligonucleótidos de detección de la siguiente manera. Desnaturalización a 95°C, enfriar a 10°C, hibridación a 42°C durante la noche seguido de lavado con 10 x SSARC y dH₂O a 42°C.

- 20 Más detalles de los oligonucleótidos de hibridación se muestran en la Tabla 2.

Las señales fluorescentes de cada oligonucleótido hibridado se detectaron utilizando el escáner y software GenePix. Las razones para las dos señales (del oligonucleótido CG y el oligonucleótido TG utilizados para analizar cada posición de CpG) se calcularon con base en la comparación de la intensidad de las señales fluorescentes.

- 25 Las muestras fueron procesadas en lotes de 80 muestras al azar para la determinación de sexo, diagnóstico, tejido, y el lote de bisulfito. Para cada muestra de ADN tratada con bisulfito se realizaron 2 hibridaciones. Esto significa que para cada muestra se procesaron un total de 4 chips.

Métodos de análisis de datos

Análisis de los datos del chip:

A partir de las relaciones de metilación con respecto a las intensidades de hibridación sin procesar;

- 30 Se determina la relación del logaritmo de la metilación ($\log(CG/TG)$) en cada posición de CpG de acuerdo con una fuente de información de procesamiento previo estandarizado que incluye las siguientes etapas:

Para cada punto se resta la meobjetivo de la intensidad del píxel de fondo de la meobjetivo de la intensidad del píxel en primer plano (esta da una buena estimación de las intensidades de hibridación corregidas por el fondo):

- 35 Tanto para los oligonucleótidos de detección de CG como de TG de cada posición de CpG se toma la meobjetivo corregida del fondo de la 4 intensidades redundantes del punto;

Para cada chip y cada posición de CpG se calcula la relación $\log(CG/TG)$;

Para cada muestra se toma la meobjetivo de las intensidades del $\log(CG/TG)$ sobre las repeticiones redundantes del chip.

- 40 Esta relación tiene la propiedad de que el ruido de hibridación tiene una varianza aproximadamente constante en todo el intervalo de posibles tasas de metilación (Huber y colaboradores, 2002).

Análisis del componente principal

- 45 El análisis del componente principal (PCA) proyecta vectores de medición (por ejemplo, datos del chip, perfiles de metilación en varios CpG, etc.) sobre un nuevo sistema de coordenadas. Los nuevos ejes de coordenadas se conocen como componentes principales. El primer componente principal abarca la dirección de la mayor varianza de los datos. Posteriormente, se ordenan los componentes por la disminución de la varianza y son ortogonales entre sí. Diferentes posiciones de CpG contribuyen con diferentes pesos a la extensión de la nube de datos a lo largo de los diferentes componentes. PCA es una técnica no supervisada, es decir, que no tiene en cuenta las etiquetas de los puntos de datos (para más detalles, véase por ejemplo, Ripley (1996)).

5 PCA se usa típicamente para proyectar los datos de alta dimensión (en nuestro caso los datos de la matriz de metilación) en subespacios dimensionales menores con el fin de visualizar o extraer características con alta varianza de los datos. En el presente informe se utilizan 2 proyecciones dimensionales para el control estadístico de calidad de los datos. Se investigó el efecto de diferentes parámetros del proceso sobre los datos del chip y se excluyó que el cambio de los parámetros del proceso causen grandes alteraciones en los valores de la medición.

Se utiliza una versión robusta de PCA para detectar los chips atípicos individuales y excluirlos de otros análisis (Model y colaboradores, 2002).

Prueba de la hipótesis

10 La tarea principal es identificar los marcadores que muestran diferencias significativas en el grado promedio de metilación entre dos clases. Se detecta una diferencia significativa cuando la hipótesis nula de que la metilación promedio de las dos clases es idéntica puede ser rechazada con $p < 0,05$. Debido a que se aplica esta prueba a todo un conjunto de marcadores potenciales, se tienen que corregir los valores p para múltiples pruebas. Esto se hizo mediante la aplicación del método de tasa de falso descubrimiento (FDR) (Dudoit y colaboradores, 2002).

15 Para probar la hipótesis nula de que los niveles de metilación en las dos clases son idénticos se utilizó la prueba de relación de probabilidad para los modelos de regresión logística (Venables y Ripley, 2002). El modelo de regresión logística para un solo marcador es una combinación lineal de las mediciones de metilación de todas las posiciones de CpG en la respectiva región genómica de interés (ROI). Un valor p significativo para un marcador significa que esta ROI tiene cierta correlación sistemática con la cuestión de interés dada por las dos clases. Sin embargo, al menos formalmente no hace ninguna declaración sobre el poder predictivo real del marcador.

20 Predicción de la clase por aprendizaje supervisado

Con el fin de dar una estimación confiable de lo bien que el conjunto de CpG de un marcador seleccionado puede diferenciar entre diferentes clases de tejidos, se puede determinar su precisión en la predicción por la clasificación. Para ello se calcula una función de predicción con base en el perfil de metilación usando un determinado conjunto de muestras de tejido con etiqueta de clase. Esta etapa es llamada entrenamiento y explota el conocimiento previo representado por las etiquetas de datos. La precisión de la predicción de esa función es luego probada mediante validación cruzada o en un conjunto de muestras independientes. Como método de elección, se utiliza el algoritmo de máquina del vector de soporte (SVM) (Duda (2001), Christiannini (2000)) para aprender la función de predicción. Si no se indica lo contrario, para este reporte, se establece que el riesgo asociado con clasificaciones de falsos positivos o falsos negativos es igual en relación con los tamaños de la clase respectiva. De ello se desprende que el algoritmo de aprendizaje obtiene una función de predicción de la clase con el objetivo de optimizar la precisión sobre un conjunto independiente de muestras de pruebas. Por lo tanto, se puede esperar que la sensibilidad y especificidad del clasificador resultante sea aproximadamente igual.

Estimación del desempeño de la predicción de la clase de tejido: validación cruzada

35 Con un tamaño limitado de la muestra, el método de validación cruzada proporciona una estimación eficaz y confiable para la precisión de la predicción de una función discriminadora y por lo tanto, además de la importancia de los marcadores, se proporcionan estimaciones de la precisión, sensibilidad y especificidad de la validación cruzada. Para cada tarea de clasificación, se dividieron las muestras en 5 grupos de aproximadamente igual tamaño. A continuación, se entrenó el algoritmo de aprendizaje sobre 4 de estos 5 grupos de muestras. El predictor obtenido por este método fue luego probado en el grupo restante de muestras de prueba independientes. El número de clasificaciones correctas positivas y negativas se contó sobre 5 corridas para el algoritmo de aprendizaje para todas las opciones posibles del grupo de prueba independiente sin necesidad de utilizar ningún conocimiento obtenido de las corridas anteriores. Este procedimiento se repitió hasta en 10 permutaciones aleatorias de la muestra establecida. Tenga en cuenta que el procedimiento de validación cruzada anteriormente descrito evalúa la precisión, sensibilidad y especificidad utilizando prácticamente todas las combinaciones posibles de entrenamiento y grupos de prueba independientes. Esto proporciona por lo tanto, una mejor estimación del desempeño de la predicción que simplemente divide las muestras en un conjunto de muestras de entrenamiento y un conjunto de pruebas independientes.

Resultados

50 Para los resultados mostrados en las Figuras 1-12, 16, 17, 19-27, 29, 31 y 35, véase la descripción de las figuras más arriba.

Colon normal versus cáncer colorrectal

En la primera comparación, se compararon 102 muestras de carcinoma colorrectal con 73 muestras de colon normal, incluyendo los pólipos de colon y trastornos inflamatorias del colon.

55 La Figura 1 muestra los resultados de las pruebas multivariadas de los 12 marcadores de mejor desempeño utilizando la prueba LogReg conservadora corregida de Bonferroni.

La Figura 2 muestra los resultados de la prueba LogReg multivariados no corregidos para cada comparación. Cada región genómica individual de interés se representa como un punto, la línea de puntos representa el punto de corte para la tasa de falso descubrimiento del 25%.

La Figura 3 muestra la precisión de los 12 marcadores de mejor desempeño.

- 5 La Figura 4 muestra la precisión de la validación cruzada de máquina del vector de soporte lineal GeneWise para todas las regiones genómicas de cada clasificación.

Inter alia, el marcador genómico de acuerdo con la SEQ ID NO: 7 se evaluó como significativo:

Otros tejidos versus cáncer colorrectal

- 10 En esta clasificación se compararon 73 muestras de carcinoma colorrectal con otra 'clase de tejido' que consiste en 140 muestras de carcinomas no colorrectales, linfocitos de sangre periférica y otros tejidos normales de origen no colorrectal. Por tanto, estos marcadores permiten la detección de células de carcinoma colorrectal, por ejemplo, en fluidos corporales tales como suero.

La Figura 5 muestra los resultados de las pruebas multivariadas de los 12 marcadores de mejor desempeño utilizando la prueba LogReg conservadora corregida de Bonferroni.

- 15 La Figura 6 muestra los resultados de la prueba LogReg multivariada no corregida para cada comparación. Cada región genómica individual de interés se representa como un punto, la línea de puntos representa el punto de corte para la tasa de falso descubrimiento del 25%.

La Figura 7 muestra la precisión de los 12 marcadores de mejor desempeño.

- 20 La Figura 8 muestra la precisión de la validación cruzada de máquina del vector de soporte lineal GeneWise para todas las regiones genómicas de cada clasificación.

Inter alia, el marcador genómico de acuerdo con la SEQ ID NO: 7 se evaluó como significativo:

Colon normal y otros tejidos versus cáncer de colon

- 25 En esta clasificación se compararon 73 muestras de carcinoma colorrectal con 242 muestras de colon normal y de 'otro tejido'. La clase de colon normal consistía en colon sano, pólipos de colon y muestras de tejido de colon de trastorno inflamatorio, los 'otros tejidos' consistían de muestras de carcinomas no colorrectales, linfocitos de sangre periférica y otros tejidos normales de origen no colorrectal.

La Figura 9 muestra los resultados de la prueba multivariada de los 12 marcadores de mejor desempeño utilizando la prueba LogReg conservadora corregida de Bonferroni.

- 30 La Figura 10 muestra los resultados de la prueba LogReg multivariada no corregida para cada comparación. Cada región genómica individual de interés se representa como un punto, la línea de puntos representa el punto de corte para la tasa de falso descubrimiento del 25%.

La Figura 11 muestra la precisión de los 12 marcadores de mejor desempeño.

La Figura 12 muestra la precisión de la validación cruzada de máquina del vector de soporte lineal GeneWise para todas las regiones genómicas de cada clasificación.

- 35 *Inter alia*, el marcador genómico de acuerdo con la SEQ ID NO: 7 se evaluó como significativo.

Inter alia, el marcador genómico de acuerdo con la SEQ ID NO: 7 se evaluó como significativo.

Colon normal versus trastorno proliferativo de células colorrectales

- 40 En esta clasificación se compararon 124 muestras de trastorno proliferativo de células colorrectales (que consta de pólipos de colon y carcinoma colorrectal) con 51 muestras de 'colon normal' que consisten tanto de muestras de colon sano como de tejido de colon de trastornos inflamatorios.

La Figura 16 muestra los resultados de la prueba multivariada de los 12 marcadores de mejor desempeño utilizando la prueba LogReg conservadora corregida de Bonferroni.

- 45 La Figura 17 muestra los resultados de la prueba LogReg multivariada no corregida para cada comparación. Cada región genómica individual de interés se representa como un punto, la línea de puntos representa el punto de corte para la tasa de falso descubrimiento del 25%.

La Figura 19 muestra la precisión de la validación cruzada de máquina del vector de soporte lineal GeneWise para todas las regiones genómicas de cada clasificación.

Inter alia, el marcador genómico de acuerdo con la SEQ ID NO: 7 se evaluó como significativo.

Colon normal versus cáncer colorrectal

En esta clasificación se compararon 73 muestras de carcinoma colorrectal con 51 muestras de 'colon normal' que consisten tanto de muestras de colon sano como de tejido de colon de trastornos inflamatorios.

- 5 La Figura 20 muestra los resultados de la prueba multivariada de los 12 marcadores de mejor desempeño utilizando la prueba LogReg conservadora corregida de Bonferroni.

La Figura 21 muestra los resultados de la prueba LogReg multivariada no corregida para cada comparación. Cada región genómica individual de interés se representa como un punto, la línea de puntos representa el punto de corte para la tasa de falso descubrimiento del 25%.

- 10 La Figura 22 muestra la precisión de los 12 marcadores de mejor desempeño.

La Figura 23 muestra la precisión de la validación cruzada de máquina del vector de soporte lineal GeneWise para todas las regiones genómicas de cada clasificación.

Inter alia, el marcador genómico de acuerdo con la SEQ ID NO: 7 se evaluó como significativo.

Colon normal y otros tejidos versus trastorno proliferativo de células colorrectales

- 15 En esta clasificación se compararon 124 muestras de trastorno proliferativo de células colorrectales (que consiste de pólipos de colon y carcinoma colorrectal) con una clase que consiste de muestras de 'colon normal' y de 'otro tejido'. Las muestras de colon normal consistían tanto de muestras de colon sano como de tejido de colon de trastornos inflamatorios, las muestras de 'otros tejidos' consistían de muestras de carcinomas no colorrectales, linfocitos de sangre periférica y otros tejidos normales de origen no colorrectal.

- 20 La Figura 24 muestra los resultados de la prueba multivariada de los 12 marcadores de mejor desempeño utilizando la prueba LogReg conservadora corregida de Bonferroni.

La Figura 25 muestra los resultados de la prueba LogReg multivariada no corregida para cada comparación. Cada región genómica individual de interés se representa como un punto, la línea de puntos representa el punto de corte para la tasa de falso descubrimiento del 25%.

- 25 La Figura 26 muestra la precisión de los 12 marcadores de mejor desempeño.

La Figura 27 muestra la precisión de la validación cruzada de máquina del vector de soporte lineal GeneWise para todas las regiones genómicas de cada clasificación.

Inter alia, el marcador genómico de acuerdo con la SEQ ID NO: 7 se evaluó como significativo.

Otro tejido versus tejido del colon

- 30 La siguiente comparación se llevó a cabo con el fin de identificar marcadores capaces de discernir niveles elevados de ADN de colon flotante libre, especialmente en fluidos corporales como un marcador del progreso del tumor. En esta clasificación la clase 'tejido de colon' consistió en muestras de carcinoma colorrectal, pólipos de colon, tejido de colon de trastornos inflamatorios y tejido de colon sano. La clase 'otro tejido' consistió en muestras de carcinomas no colorrectales, linfocitos de sangre periférica y otros tejidos normales de origen no colorrectal.

- 35 La Figura 29 muestra los resultados de la prueba LogReg multivariada no corregida para cada comparación. Cada región genómica individual de interés se representa como un punto, la línea de puntos representa el punto de corte para la tasa de falso descubrimiento del 25%.

La Figura 31 muestra la precisión de la validación cruzada de máquina del vector de soporte lineal GeneWise para todas las regiones genómicas de cada clasificación.

- 40 *Inter alia*, el marcador genómico de acuerdo con la SEQ ID NO: 7 se evaluó como significativo.

Tejido normal versus tejido de trastorno proliferativo celular

En esta clasificación se evaluó el panel de genes por su capacidad para discriminar con precisión muestras de trastorno proliferativo celular tanto de carcinoma colorrectal, pólipos de colon y cánceres de origen que no es de colon de 'tejidos normales', a saber, muestras sanas de colon, tejido de colon de trastornos inflamatorios, linfocitos de sangre periférica, otros tejidos normales de origen no colorrectal.

- 45 La Figura 33 muestra los resultados de la prueba LogReg multivariada no corregida para cada comparación. Cada región genómica individual de interés se representa como un punto, la línea de puntos representa el punto de corte para la tasa de falso descubrimiento del 25%.

La Figura 35 muestra la precisión de la validación cruzada de máquina del vector de soporte lineal GeneWise para todas las regiones genómicas de cada clasificación.

Inter alia, el marcador genómico de acuerdo con la SEQ ID NO: 7 se evaluó como significativo.

Ejemplo 14:

5 14

Análisis por MSP de los genes de acuerdo con la Tabla 6 (a continuación).

En el siguiente análisis, se analizaron el estado de metilación de una selección de los genes de acuerdo con la Tabla 3 por medio de la amplificación específica de la metilación utilizando los cebadores de acuerdo con la Tabla 6 (a continuación).

10 El estudio se realizó en aproximadamente 140 muestras de carcinoma de colon, mama e hígado, tejido normal (linfocitos de sangre periférica, colon sano y tejido sano adyacente a carcinoma de colon), pólipos de colon y otras enfermedades de colon. La clase positiva consistía de cáncer de colon y pólipos de colon. La clase negativa era PBL (linfocitos de sangre periférica), colon normal, colon-NAT y colon inflamatorio. Para el AUC se incluyeron también valores entre paréntesis de cáncer de mama y cáncer de hígado (véase la tabla 7, a continuación) en la clase negativa.

15 Se analizó el ADN genómico utilizando la técnica de MSP después de la conversión con bisulfito. El ADN genómico total de todas las muestras fue tratado con bisulfito convirtiendo citosinas no metiladas en uracilo. Las citosinas metiladas permanecieron conservadas. Se realizó el tratamiento con bisulfito con modificaciones menores de acuerdo con el protocolo descrito en Olek y colaboradores (1996).

20 Se amplificó luego la secuencia de interés, por medio de cebadores específicos de metilación, se detectó luego el amplificado por medio de las sondas Taqman específicas para metilación.

Tabla 6: Oligonucleótidos para MSP Taqman

| | |
|---|-------------------------------|
| 11 | Número del ensayo |
| PRECURSOR DEL MIEMBRO 16 DE LA SUPERFAMILIA DEL RECEPTOR DEL FACTOR DE NECROSIS TUMORAL | Gen/Ubicación genómica |
| aggcgcttttggcg | Secuencia del cebador directo |
| atcgcgcttttagcgcg | Sonda |
| ctacaacctaacgacgct | Secuencia del cebador inverso |
| Figura 74 | Curva de amplificación |

Condiciones de reacción para el programa de PCR Taqman:

25 Desnaturalización a 95°C durante 10 minutos.

50 ciclos: desnaturalización a 95°C durante 15 segundos.

Hibridación a 62°C durante 1 minuto. Excepto el Ensayo 15, que tiene una temperatura de hibridación de 60°C.

Las curvas de amplificación para cada ensayo se muestran en las figuras 72 a 86 (de acuerdo con la Tabla 6).

30 El desempeño técnico de una serie de ensayos alternativos fue validado mediante pruebas de cada uno de los siguientes utilizando ADN de espermatozoos como plantilla:

SEQ ID NO: 7 del gen (ensayo HeavyMethyl^{MR})

| | | | | |
|---|--|--|--|--|
| Cebador: | | | | |
| Tgagagagagagggtgaaa (SEQ ID NO: 14554) | | | | |
| Tctaaataacaaaatacctccatt (SEQ ID NO: 14555) | | | | |

| | | | | |
|--|-------------|--------|----------|-----------|
| sondas: | | | | |
| CGaccCGccaacCGac-fluo (SEQ ID NO: 14556) | | | | |
| LCred640-CGcCGaaaCGCGctc-p (SEQ ID NO: 14557) | | | | |
| bloqueador: | | | | |
| ccattaccaacacaacccaccaaccaa-p (SEQ ID NO: 14558) | | | | |
| | | | | |
| Programa LightCycler: | | | | |
| activación: | 95°C | 10min | | |
| | | | | |
| 55 ciclos: | 95°C | 10 seg | (20°C/s) | |
| | 56°C | 30 seg | (20°C/s) | detección |
| | 72°C | 10 seg | (20°C/s) | |
| | | | | |
| Curva de fundición: | 95°C | 10 seg | 20 | |
| | 40°C | 10 seg | 20 | |
| | 70°C | 0 seg | 0,1 | |
| | | | | |
| enfriamiento: | 40°C | 5 seg | | |

Resultados

La sensibilidad y la especificidad se calcularon con SVM y validación cruzada 10 veces

Tabla 7

| Gen/Ubicación genómica | AUC | Sensibilidad | Especificidad |
|---|-------------|--------------|---------------|
| PRECURSOR DEL MIEMBRO 16 DE LA SUPERFAMILIA DEL RECEPTOR DEL FACTOR DE NECROSIS TUMORAL | 0.82 (0.82) | 0,74 | 0,90 |

5

Ejemplo 15

Análisis HeavyMethyl.

A continuación, se analizó la metilación de las secuencias de genes/genómicas, entre otros, de acuerdo con Gene SEQ ID Nos: 7, en 15 muestras de cáncer colorrectal (denominadas "colon" en la Tabla 7) y ocho muestras de linfocitos de sangre periférica denominadas "PBL" en la Tabla 7).

10

El ADN genómico total de todas las muestras fue tratado con bisulfito convirtiendo citosinas no metiladas en uracilo. Las citosinas metiladas permanecieron conservadas. El tratamiento con bisulfito se realizó con modificaciones menores de acuerdo con el protocolo descrito en Olek et al. (1996).

15

La secuencia de interés se amplificó entonces por medio de cebadores específicos para ADN tratado con bisulfito y un oligonucleótido bloqueante (para suprimir la amplificación del ADN no metilado). El terminal 3'OH del oligonucleótido bloqueante se "protegió" mediante un grupo fosfato para evitar que la polimerasa extendiera el cebador durante la reacción de PCR. El amplificado luego se detecta por medio de sondas LightCycler™ específicas de metilación, en donde una sonda se marcó con 5'rd640 y tenía un terminal 3'OH protegido y el otro se marcó con 3'Fluoresceína.

ES 2 659 325 T3

SEQ ID NO:7 genómica

Cebadores: ggttgggatggtgt(SEQ ID NO: 14615) & tctaaatacaaaaatcctccatt (SEQ ID NO: 14616)

Oligonucleótidos de bloqueo: ccattaccaacacaaccaccaaccaa (SEQ ID NO: 14617)

Cebadores: ggtcgcggtgagagagagag (Fluorescein) & (SEQ ID NO: 14618)

5 tgaaattagagcgcgtttcgg (red640) (SEQ ID NO: 14619)

Las reacciones se realizaron en un volumen total de 20 µl utilizando un dispositivo LightCycler (Roche Diagnostics). La mezcla de reacción de PCR en tiempo real contenía 10 µl de ADN molde, 2 µl de mezcla de reacción FastStart LightCycler para sondas de hibridación (Roche Diagnostics, Penzberg),

Tabla 7: Resultados de ensayos HeavyMethyl

| Tejido | Puntos de cruce | | Puntos de cruce | | Concentración de ADN calculada sin diluir (pg/10ml) |
|--------|---------------------|---------------------|---------------------|---------------------|---|
| | SEQ ID NO: Genómico | SEQ ID NO: Genómico | SEQ ID NO: Genómico | SEQ ID NO: Genómico | |
| | | | (sin diluir) | (diluida) | |
| Colon | 36,73 | 38,22 | 39,58 | | 5,855 |
| Colon | 33,1 | >51 | | | 386,9 |
| Colon | 39,8 | 42,84 | | | 57,5 |
| Colon | 39,74 | 38,75 | 32,54 | 33,89 | 482,6 |
| Colon | | >51 | | | 132,55 |
| Colon | | 38,82 | | | 29,955 |
| Colon | 32,08 | 33,9 | 33,43 | 35,43 | 816 |
| Colon | 37,03 | 36,91 | | | 284,35 |
| Colon | 38,07 | 46,54 | | | 0 |
| Colon | 35,22 | 37,81 | 36,8 | 37,03 | 298,35 |
| Colon | 33,66 | 36,19 | 33,23 | 34,01 | 1355 |
| Colon | 36,78 | 37,46 | 40,71 | | 879 |
| Colon | | 37,23 | | | 57,5 |
| Colon | | | | | 1669 |
| Colon | 34,88 | 34,71 | 34,21 | 34,49 | 880,5 |
| PBL | | | | | 716,5 |
| PBL | | | | | 796 |
| PBL | | | | | 584,5 |
| PBL | 38,55 | | | | 1813 |
| PBL | | | | | 5470 |
| PBL | | 49,04 | | | 761 |
| PBL | | | | | 625 |
| PBL | | 39,75 | | | 9835 |

ES 2 659 325 T3

| | | | | | |
|---------------|-------|-------|-------|-------|-------|
| M 100pg | 36,34 | 37,29 | 34,95 | 34,51 | 583,5 |
| M 100pg | 36,06 | 37,86 | 34,64 | 34,09 | 428,3 |
| uMRoche 100ng | | 34,48 | | | |
| uMPhi 100ng | | | | | |
| agua | | | | | |

Las cifras en negrita indican aquellas clasificadas como positivas porque las curvas de amplificación eran planas.

Ejemplo 16

5 Análisis en suero de los genes de acuerdo con la SEQ ID No. 7.

Los ensayos descritos anteriormente en el Ejemplo 14 (MSP) se aplicaron luego a un conjunto de muestras de suero que consiste en 32 muestras de suero de carcinoma colorrectal y se compararon con un conjunto que constaba de 54 muestras de suero normales, 11 muestras de suero de lesiones de colon benignas y 6 suero muestras de enfermedad inflamatoria del colon. Se usaron 130 ul de suero por ensayo y los resultados se informaron

10 cuantitativamente como positivos o negativos.

The assays as described above in Ejemplo 14 (MSP) & were then applied to a set of serum samples consisting 32 colorectal carcinoma serum samples, and compared to a set consisting of 54 normal serum samples, 11 serum samples from benign colon lesions and 6 serum samples from inflammatory colon disease. 130 ul of serum was used per assay and the results were quantitatively reported as positive or negative.

15

Tabla 6

| Marcador o combinación de marcadores | Sensibilidad | Especificidad |
|--------------------------------------|--------------|---------------|
| SEQ ID NO: 7 (MSP) | 15.6 | 98.3 |

Tablas adicionales

TABLA 1.

| No: | Gen | Oligo: |
|-----|----------------|------------------------------------|
| 99 | (SEQ ID NO: 7) | TTCGTCGGCGGTAGAG (SEQ ID NO: 770) |
| 100 | (SEQ ID NO: 7) | TAGAGTTTGTGGTGG (SEQ ID NO: 771) |
| 101 | (SEQ ID NO: 7) | GATCGCGGGTACGTTT (SEQ ID NO: 772) |
| 102 | (SEQ ID NO: 7) | ATTGTGGGTATGTTTGT (SEQ ID NO: 773) |
| 103 | (SEQ ID NO: 7) | TTAACGTCGTTGGTTA (SEQ ID NO: 774) |
| 104 | (SEQ ID NO: 7) | TGATTAATGTTGTTGGT (SEQ ID NO: 775) |
| 105 | (SEQ ID NO: 7) | TTCGCGCGAAGATTTA (SEQ ID NO: 776) |
| 106 | (SEQ ID NO: 7) | GTTTTTGTGTGAAGATT (SEQ ID NO: 777) |

20

Tabla 3: Genes o locus genómico asociados con secuencias genómicas de acuerdo con SEQ ID NO .7

| SEQ ID NO: genómico | SEQ ID Nos: con bisulfito | Genbank Ref. ID No:/cóntigo | Descripción |
|---------------------|---------------------------|-----------------------------|---|
| 7 | 316, 317, 432 & 433 | NM_002507 | PRECURSOR DEL MIEMBRO 16 DE LA SUPERFAMILIA DEL RECEPTOR DEL FACTOR DE NECROSIS TUMORAL (RECEPTOR DEL FACTOR DE CRECIMIENTO NERVIOSO DE BAJA AFINIDAD) (RECEPTOR NGF) (GP80-LNGFR) (P75 ICD) (RECEPTOR DE NEUROTROFINA DE BAJA AFINIDAD P75NTR). NGFR |

Listado de secuencias

- 5 <110> Epigenomics AG; Lofton-Day, Cathy; Model, Fabian; Sledziewski, Andrew; Rujan, Tamas; Lewin, Jorn; Distler, Juergen
- <120> Métodos y ácidos nucleicos para el análisis de trastornos proliferativos de células de colon
- <160> 14624
- <210> 1 a <210> 6
- 10 000
- <210> 7
- <211> 3952
- <212> ADN
- <213> Homo Sapiens
- 15 <400> 7

ES 2 659 325 T3

| | | | | | | |
|-------------|------------|-------------|-------------|-------------|------------|------|
| ggccgcagcc | ggagaggaac | aggaaccgca | gtggggacgc | cttgggtccc | gggcccacag | 60 |
| catccgggac | ggacgcgcag | tagcgcgggc | cggaactgg | gtaccagggc | gggatgggtg | 120 |
| agaggctcta | agggacaagg | cagggagaag | cgagcgggg | tgcggggaac | cgcacgccct | 180 |
| ccctttgctt | ctgcttccca | ccccgaggg | gcagggcggg | cgggcgcggt | tccgggggtg | 240 |
| ggcgggctgg | gcggggcgga | ggcggggccg | cagcactggc | ttcaccacgc | ctctcccggc | 300 |
| cgacggcaga | gcgagccgag | ccgcggccag | ctccggcggg | cagggggggc | gctggagcgc | 360 |
| agcgcagcgc | agccccatca | gtccgcaaag | cgaccgcagc | tggaagtcca | gcgctgccgc | 420 |
| gggagggcgg | cgatgggggc | aggtgccacc | ggcgcgcgca | tggacgggcc | gcgctgctg | 480 |
| ctgttgctgc | ttctgggggt | gagtggttagc | cggagggggc | ccgctccctt | tcccgggatc | 540 |
| agaactccga | gaagagcccg | gcgcgccacc | caaggaaaca | gaacagagca | ttgggggtcc | 600 |
| agatactgag | ggtgggtggt | gggaaaaggac | ctctgatgcc | gggaccacga | aggagggctt | 660 |
| aggggtcccc | gagcgcagag | gcgactctcc | aggggtggaga | tgagggcaag | accggagcac | 720 |
| ggatgccggg | cctcaggtac | cgcagggggc | ggtgggggag | ctgggagggg | tctttcaaga | 780 |
| gggggcatgg | ggctctccga | tgcccaggtt | cttcggaaga | ggacactcga | atgccgggat | 840 |
| cccgaaggga | ctttcccctc | agcatctcgg | tctctggaga | gtcgtgggac | agaaccaagg | 900 |
| cgagagaagg | agggggaact | ggacggggac | tagagatgag | aggggcgagc | tgggctgggg | 960 |
| cggggagccc | gggacgacgg | gatggaacaa | tggaggaggt | cggagggact | ggaggcagag | 1020 |
| gggacccggc | aagacaatg | gggaccggcc | agacaatggg | ggggaggggc | gtcggagggg | 1080 |
| gaggttgggg | agcgggagag | aggttagaaa | gtgggttagg | gagggcagaa | gaggggcgac | 1140 |
| ggcgagggcg | gcagagagat | ggaagcagaa | ggaaggaga | cagagcgggg | cgcggaacct | 1200 |
| gaaagtggtcg | gggtcccgcg | tgcccgcgta | ggacagtgga | gacgagaaga | gagagcagag | 1260 |
| gcttgacatc | ttccagcgcc | tgtcccgcg | ctctgctcgc | cggcctctcc | cagtcccgga | 1320 |
| attggggctg | cggatctaag | gctgggaggg | gagtgccacc | ttcgccgggg | cgaaccgctt | 1380 |
| cccggggttc | cccaccggcc | ggcgggctcc | tccgacgcgc | gtgttctcac | ggcttgaagc | 1440 |
| agcgcagcgg | atcgcgaggg | acggagcggg | tgtgccctca | cccgggctgg | cggtggctac | 1500 |
| gtctcggggg | gcagagcgcc | ggggcgcact | agggggggac | ccttcctggc | cgcgccgagc | 1560 |
| tctggctacg | caggcgggag | gcggcaggca | ggggcgctg | cgggcgagg | caagtgcagt | 1620 |
| ccgccgctgc | ctgcctgcga | gtctggggct | gcgcgcgct | ccccacctag | ctgcgcgacc | 1680 |
| cgagcgccgc | gcccaccgcg | ctccgtgggc | tcccgcgcct | cgaagggtcg | ggatccggtc | 1740 |
| tgagcctctc | ctggctctcg | gtgcaagccg | ctgggcacct | aacgagacgg | gggcgcccgg | 1800 |
| acgctcgga | ttctgtagcg | cggtatcccg | ggccaaccgac | tgggcaagg | tggcggggtc | 1860 |
| ctccgggtgg | tctgcagaga | ttgtcagatg | tggctgctt | tatggccatg | aaccgaatgc | 1920 |
| cctggaaggt | ctggcaacgg | aggaggcgtc | ttactctctc | ccgccagcat | ctttcatcag | 1980 |
| agcactgcgc | cccaaattcc | ggctttacag | atacggagac | tgaggctctg | agagtttaa | 2040 |
| cgacttggcc | aagatctcac | agcaagtggg | gcagagctcg | tggctagact | ccccgacctg | 2100 |
| attcccagct | cggtactccc | ccaccttttc | agggggcagc | cgctgtcca | gctcggggtc | 2160 |
| acggctgcgt | ttcccagcag | ggcggggggg | gttgacactg | tcccagagc | ccgtcggcgg | 2220 |
| tagagcctgc | gggtgaggtg | ggcagagatt | ctgtccgggt | gcgggcccca | gcccgaagc | 2280 |
| tcagccccag | ttccctggag | ctgtcaggac | ctgtggctgc | gtccggggat | ttgggagcga | 2340 |
| ccgcgggcac | gtctgctgac | taacgccgct | ggttagagac | gctgctcaga | cgcggtggg | 2400 |
| cgagcgtaga | ccaggagagc | ggggagggag | gaccggatcc | cagaggggca | acgacttggg | 2460 |
| ctccgggtct | gggcaagagc | gagggtcccc | gcgcgaagac | ccaaggaaag | aggggagctg | 2520 |
| ggcgtggagg | acctgggcgc | ttgggaaggt | tgcccgcgac | aggaacctgc | cgctcgcagc | 2580 |
| ccctgcggct | cccgcctccg | cctcggcgcg | cggtgctcgc | gtctgggatg | gctgtgcgcg | 2640 |
| gtccgagttt | cttccctggg | cgcggtgaga | gagagagggc | tgaaccacga | gcgcgtccc | 2700 |
| gcggtcggc | tggcggggcg | cgccggtaat | ggaggcactt | tgtcattcag | acgtctgtaa | 2760 |
| ccagagccgc | cgggctggct | aatgcgccta | atagggatgg | aacgagggca | gcaaatgggc | 2820 |
| gtgctgagc | ggccgggctg | agctgggtgg | atggtggatg | gggagggcagc | tccgcggggg | 2880 |
| acgggcccct | accgcactgt | tccagcccag | tctggetcaa | gcgcctcgct | tcttccctgg | 2940 |
| gggaccggct | ggggagggcg | gaataatcga | tgtgctgagt | tcctactaag | tgccttgca | 3000 |
| ttccctggta | gtttctcttg | aattatttaa | tcctataaag | gtcctagcaa | ggtgaattta | 3060 |
| gttattccca | cttcgcagtt | gaggaaacag | aaccttctag | actttcaggc | ccgagaccag | 3120 |
| gctccccag | tgagtcaagt | gtggcgtctt | tgttgaacc | caggatgctt | ggcctgggat | 3180 |
| gttctctttc | ctacatatgc | caggctccct | cccgcgccct | accttctaga | tcatggaagg | 3240 |
| agtcgtggct | ctgagagatt | aaatcgtgcc | ctatgccttt | ggccccacac | atthagatct | 3300 |
| gagcccttc | tcacacgcga | gagccctgc | ccctctcaa | gtctctatgc | tacattatct | 3360 |
| tgggtaatta | gctcctttcc | tcccactcc | tcccctatcc | aaagggagtg | aggggtatgt | 3420 |
| gccagtgcct | cccctgggtt | tgcctcgacc | tcaaaaggcc | ctccaggtgt | ttgaaaatct | 3480 |
| ctcccattcc | atggcggtga | ccacggcccc | attcaactaa | gagctctttg | ctgaaactgt | 3540 |
| tggaatggcc | agggctgatt | atactgaaac | attcgtatgg | tttcaaatac | tttcaactgt | 3600 |
| ttcgtgtttt | ctctcttttc | tctaattaaa | aaaaatgaaa | attcttaaaa | gtcaattcat | 3660 |
| ctaaggatcc | ttccacctta | gttccttgta | agccttgaaa | tggccaaaac | aaaaagatta | 3720 |
| caaggtttct | taaaaatgag | atgaaatcat | tctgtcaaat | gtgaaatgac | taagtgaac | 3780 |
| acatacaaat | ttcagggaaa | tttatctgtc | atccctataa | attaatcctt | ttggatctga | 3840 |
| ttttggagca | attagcctga | atgttagtca | ccctccctca | cttggctaaa | ctctcccctc | 3900 |
| ctgcctgggg | tctccttaag | atgagatgct | tctttgataa | ctaacttta | tt | 3952 |

ES 2 659 325 T3

000

<210> 316

<211> 3952

<212> ADN

5 <213> Secuencia Artificial

<220>

<223> ADN genómico tratado químicamente (Homo sapiens)

<400> 316

| | | | | | | |
|-------------|-------------|-------------|-------------|-------------|-------------|------|
| ggtcgtagtc | ggagaggaat | aggaatcgt | gtggggacgt | tttggttttc | gggtttatag | 60 |
| tattcgggac | ggacgcgtag | tagcgcgggt | cgggaattgg | gtattagggc | gggatgggtg | 120 |
| agaggtttta | agggataaag | tagggagaag | cgtacggggg | tgcggggaat | cgtacgtttt | 180 |
| ttttttgttt | ttgtttttta | tttcgagcgg | gtagggcggg | cgggcgcggg | ttcgggggtg | 240 |
| ggcgggttgg | gcggggcggg | ggcggggtcg | tagtattggg | tttatttagt | ttttttcgtt | 300 |
| cgtagttaga | gcgagtcgag | tcgcggttag | tttcggcggg | tagggggggc | gttggagcgt | 360 |
| agcgtagcgt | agttttatta | gttcgtaaag | cggatcgagt | tggaagtcga | gcgttgcgcg | 420 |
| gggagggcggg | cgatgggggt | aggtgttatac | ggtcgcgtta | tggacgggtc | gcgtttgttg | 480 |
| ttgttgttgt | ttttgggggt | gagtgtagt | cggagggggg | tcgttttttt | tttcgggatt | 540 |
| agaatttcga | gaagagtcgg | gcgtcgttat | taagaaata | gaatagagta | ttggggtttt | 600 |
| agatattgag | ggtgggtggt | gggaaaggat | ttttgatgtc | gggattacga | aggagggttt | 660 |
| agggttttcg | gagcgtagag | gcgatttttt | aggggtggaga | tgagggtaaag | atcggagtac | 720 |
| ggatgtcggg | ttttaggtat | cgtagggggc | ggtgggggag | ttgggagggg | tttttaaga | 780 |
| gggggtatgg | ggtttttcga | tgtttaggtt | tttcggaaga | ggatattcga | atgtcgggat | 840 |
| ttcgaaggga | tttttttttt | agtatttcgg | ttttgggaga | gtcgtgggat | agaattaagg | 900 |
| cgagagaagg | agggggaatt | ggacggggat | tagagatgag | aggggagcgt | tgggttgggg | 960 |
| cggggagttc | gggacgacgg | gatggaataa | tgaggagggt | cggagggatt | ggaggtagag | 1020 |
| gggattcggg | aaggataatg | gggatcgggt | agataatggg | ggggaggggc | gtcggagggg | 1080 |
| gaggttgggg | agcgggagag | aggttgagaa | gtgggttagg | gagggtagaa | gaggggcgac | 1140 |
| ggcagggggc | gtagagagat | ggaagtagaa | ggaaaggaga | tagagcgggg | cgcggatttt | 1200 |
| gaagtggtcg | gggttttcgtt | tgttcgttga | gggatagtga | gacgagaaga | gagagttagag | 1260 |
| gtttggatat | tttttagcgtt | tgttttcgcg | ttttgttcg | cggttttttt | tagtttcgga | 1320 |
| attggggttg | cggattttaag | gttgggaggg | gagtgtttat | ttcgtcgggg | cgaattcggt | 1380 |
| ttcggggttt | ttttacggtc | ggcgggtttt | ttcgacgcgc | gtgtttttac | ggtttgaagt | 1440 |
| agcgtagcgg | atcgcgaggg | acggagcggg | tgtgttttta | ttcgggttgg | cgggtggttac | 1500 |
| gtttcggggg | gtagagcgtc | ggggcgtatt | aggcggggat | tttttttggg | cgccgcgtagt | 1560 |
| tttggttacg | taggcggggg | gcggtaggta | gggggcgttg | cggggcaggg | taagtgtagt | 1620 |
| tcgtcgttgt | ttgtttgcga | gtttgggggt | gcgcgctcgtt | ttttatttag | ttgcgcgatt | 1680 |
| cgagcgtcgc | gtttatcgcg | tttcgtgggt | tttcgcggtt | cgaagggtcg | ggattcgggt | 1740 |
| tgagtttttt | ttggttttcg | gtgtaagtcg | ttgggtattt | aacgagacgg | ggcgttcgg | 1800 |
| acgtttcggg | ttttgtagcg | cggtatctcg | ggttatcgtat | tcggtaaagg | tcggcgggtt | 1860 |

ES 2 659 325 T3

| | | | | | | |
|------------|-------------|-------------|------------|-------------|-------------|------|
| tttcgggtgg | ttcgcacgaga | ttggttagatg | tggtttgttt | tatggttatg | aatcgaatgt | 1920 |
| tttggaaggt | ttggaaccg | aggaggcgtt | tttatttttt | tcggttagtat | ttttattag | 1980 |
| agtattgcgt | tttaaatttc | ggttttatag | atcggagat | tgaggttttg | agagtttaa | 2040 |
| cgatttggtt | aagattttat | agtaagttgg | gttagagtcg | tggttagatt | tttcgatttg | 2100 |
| atttttagtt | cggatttttt | ttattttttt | aggggtagt | cgttgtttta | gttcgggggtt | 2160 |
| acggttcgct | tttttagtag | ggcggggggg | gttgatattg | tttttagagt | tcgtcggcgg | 2220 |
| tagagtttgc | gggtgaggtg | ggtagagatt | ttgttcgggt | gcgggtttta | gttcgaaagt | 2280 |
| ttagttttag | ttttttggag | ttggttaggat | ttgtggttgc | gttcggggat | ttgggagcga | 2340 |
| tcgcgggtac | gtttgttgat | taacgtcgtt | ggttagagac | gttgtttaga | cgcggtggg | 2400 |
| cgagcgtaga | ttaggagagc | ggggagagag | gatcggattt | tagaggggta | acgatttggg | 2460 |
| tttcgggttt | gggtaagagc | gaggtttttc | gcgcgaagat | ttaagggaag | aggggagttg | 2520 |
| ggcgtggagg | atttgggctg | ttgggaaggt | gtatttcgat | aggaatttgt | cgttttagt | 2580 |
| ttttcgggtt | ttcgttttcg | tttcggcgcg | cggttgttcg | gtttgggatg | gttgtgcgcg | 2640 |
| gttcgagttt | ttttttgggt | cgcggtgaga | gagagagggg | tgaatttaga | gcgcgtttcg | 2700 |
| gcgggtcggg | tggcgggtcg | cgtcggtaat | ggaggtattt | tgttatttag | acgtttgtaa | 2760 |
| ttagagtcgt | cgggttggtt | aatgcgttta | atagggatgg | aacgagggta | gtaaatgggc | 2820 |
| gtgctgagc | ggtcgggttg | agttgggtgg | atggtggatg | gggaggtagt | ttcgcggggg | 2880 |
| acgggttttt | atcgtattgt | tttagtttag | tttggtttaa | gcgtttcgtt | tttttttgg | 2940 |
| gggatcgcgt | ggggagggcg | gaataatcga | tgtgttagat | ttttattaag | tgttttgtat | 3000 |
| ttttttggta | gttttttttg | aattatttaa | ttttataag | gttttagtaa | ggtgaattta | 3060 |
| gttattttta | ttcgttagtt | gaggaatag | aattttttag | atttttaggt | tcgagattag | 3120 |
| gtttttttag | tgagtttagt | gtggcgtttt | tgttgaatt | taggatgttt | ggtttgggat | 3180 |
| gttttttttt | ttatatatgt | taggtttttt | ttcgtttttt | attttttaga | ttatggaagg | 3240 |
| agtcgtgggt | ttgagagatt | aaatcgtggt | ttatgttttt | ggttttatat | atttagattt | 3300 |
| gagttttttt | tttatacgt | gaggttttgt | ttttttttaa | gtttttatgt | tataattatt | 3360 |
| tgggtaatta | gttttttttt | ttttaatttt | tttttttttt | aaaggagtg | aggggatagt | 3420 |
| gttagtggtt | ttttttgggt | tgtatcgtat | ttaaaagggt | tttttagtgt | ttgaaaattt | 3480 |
| tttttatttt | atggcgggtg | ttacggtttt | atttatttaa | gagttttttg | ttgaagttgt | 3540 |
| tggaatgggt | agggttgatt | atattgaaat | atcgtatgg | ttttaaatat | ttttaattgt | 3600 |
| ttcgttggtt | tttttttttt | tttaattaaa | aaaaatgaaa | atttttaaaa | gttaatttat | 3660 |
| ttaaggtatt | ttttattttt | gtttttttgta | agttttgaaa | tggttaaaaat | aaaaagatta | 3720 |
| taagcgtttt | taaaaatgag | atgaaattat | tttgttaaat | gtgaaatgat | taagtgtaat | 3780 |
| atataataat | tttagggaaa | tttatttggt | atttttataa | attaattttt | ttggatttga | 3840 |
| ttttggagta | attagtttga | atgttagtta | ttttttttta | tttgggttaa | tttttttttt | 3900 |
| ttgtttgggg | tttttttaag | atgagatggt | tttttgataa | ttaatattta | tt | 3952 |

<210> 317

<211> 3952

<212> ADN

5 <213> Secuencia Artificial

<220>

<223> ADN genómico tratado químicamente (Homo sapiens)

<400> 317

| | | | | | | |
|------------|-------------|-------------|-------------|-------------|------------|------|
| aataaatggt | agttattaaa | gaagtatttt | attttaagga | gatttttaggt | aggaggggag | 60 |
| agtttagtta | agtaggagg | ggtgattaat | atttaggtta | attgttttaa | aattagattt | 120 |
| aaaaggatta | atttataggg | atgatagata | aatttttttg | aaatttgtat | gtgttatatt | 180 |
| tagttatttt | atatttgata | gaatgatttt | attttatttt | taagaacgtt | tgtaattttt | 240 |
| ttgttttggg | tatttttaagg | tttataagga | attaagggtg | aaggattttt | agatgaattg | 300 |
| atttttaaga | atttttattt | tttttaatta | gagaaaagag | agaaatagcg | aaatagttga | 360 |
| aagtatttga | aattatacga | atgttttagt | ataattagtt | ttggttattt | taatagtttt | 420 |
| agtaaagagt | ttttaagtga | atggggtcgt | ggttatcgtt | atgggatggg | agagattttt | 480 |
| aaatatttgg | agggtttttt | gaggtcgtatg | taaatttagg | ggaggtattg | gtatatattt | 540 |
| tttatttttt | ttggataggg | gaggagtggg | gaggaaagga | gttaattatt | taagataatg | 600 |
| tagtatagag | atttgagagg | gggtagggtt | tttcgctgtg | gagaaggggt | ttagatttaa | 660 |
| atgtgtgggg | ttaaagggtat | agggtagcat | ttaatttttt | agagttacga | ttttttttat | 720 |
| gatttagaag | gtagggggcg | ggagggagtt | tggtatatgt | aggaaagaga | atattttagg | 780 |
| ttaagtattt | tgggtttttaa | taaagacgtt | attattgatt | tattggggga | gtttggtttc | 840 |
| gggtttgaaa | gtttagaag | ttttgttttt | ttaattgcga | agtgggaata | attaaattta | 900 |
| ttttgttagg | attttataag | gattaaataa | tttaagagaa | attattaggg | aagtgttaag | 960 |
| tatttagtag | gaatttagta | tatcgtattt | tttcgttttt | ttacgcggtt | ttttagggaa | 1020 |
| gaagcagggc | gtttgagtt | gattgggttg | gaatagtgcg | gtaggggttc | gtttttcgcg | 1080 |
| gagttgtttt | tttattttatt | atttatttag | tttagttcgg | tcgtttacgt | acgtttattt | 1140 |
| gttgttttgc | ttttattttt | attaggcgt | tttagttagtt | cggcgggtttt | ggttatagac | 1200 |

ES 2 659 325 T3

```

gtttgaatga taaagtgttt ttattatcgg cgcggttcgt tagtcgattc gtcgggacgc 1260
gttttggttt tagttttttt tttttatcgg cggtttagga agaaattcgg atcgcgtata 1320
gttatttttag atcagagtagt cgcgcgtcga gccggaggcg ggagtcgtag gggttgtaga 1380
cggtaggttt ttgtcggggg atattttttt aagcgtttag gttttttacg tttagttttt 1440
tttttttttt gggtttttcg cgcgggattt tcgtttttgt ttagattcgg agtttaagtc 1500
gttggttttt tgggattcgg tttttttttt tcgttttttt ggtttacggt cgtttattcg 1560
cgtttgagta gcgtttttta tttagcgcgt tagttagtag acgtgttcgc ggtcgttttt 1620
aaattttcgg acgtagttat aggttttgat agttttagg aattggggtt gatttttcgg 1680
gttggggttc gtattcggat agaatttttg tttattttat tcgtaggttt tatcgtcgac 1740
ggattttggg gatagtgtta atttttttcg ttttggtggg aaacgtagtc gtgatttcga 1800
gttgggatag cggttgtttt ttgaaaaggg gggggagtat cgagttggga attaggtcgg 1860
ggagtttagt tacgattttg gtttaatttg ttgtgagatt ttgggtaagt cgtttaaatt 1920
tttagagttt tagttttcgt atttgtaaag tcggaatttg gggcgtagtg ttttgatgaa 1980
agatgttggc ggggagagtg aagacgtttt tttcgttggt agatttttta gggtattcgg 2040
tttatggtta taaagtaggt tataattgat aatttcgctg gattattcgg aggattcgtc 2100
gatttttgtc gagtcggtgg ttccggatat cgcgttatag aattcgaagg gttcgggctg 2160
tttcgtttcg ttagggtgtt agcggtttgt atcgagagtt aggagaggtt tagatcggat 2220
ttcgattttt cgaaggcgcg gagtttacgg agcgcggtgg gcgcggcgtt cgggtcgcgt 2280
agttagggtg ggagcggcgc gtagttttag attcgtaggt aggtagcggc ggattgtatt 2340
tgtttcgttt cgtagcgttt tttgtttgc gtttttcgtt tgcgtagtta gatttgccgc 2400
cggttaggaa ggtttttcgt ttagtgcgtt tcggcgtttt gtatttcgag acgtagtatt 2460
cgttagttcg ggtaggggta tattcgtttc gtttttcgcg attcgttcg ttttttaag 2520
tcgtgagaat acgcgcgtcg gaggagttcg tcggtcgtgg gggaaatttcg ggagcgggtt 2580
cgtttcggcg aagtgggtat ttttttttta gtttttagatt cgtagtttta atttcgggat 2640
tgggagaggt cgcgagtagg agcgcgggga taggcgttgg aaatgtttaa gtttttgtt 2700
ttttttttcg ttttattggt ttttagcggg taggcgggat ttcgattatt ttagggttcg 2760
cgtttcgttt tgtttttttt ttttttgtt ttattttttt gtcgttttcg tcgtcgtttt 2820
ttttttgtt tttttaattt attttttaat ttttttttcg ttttttaatt ttttttttcg 2880
acgttttttt tttttattgt ttggtcgtt tttattgtt ttgtcgggtt ttttttgtt 2940
ttagtttttt cgattttttt tattgtttta tttcgtcgtt tcgggttttt cgttttagtt 3000
tagttcgttt tttttatttt tagttttcgt ttagtttttt tttttttttt cgttttggtt 3060
ttgttttacg attttttaga gatcagatg ttgaggggaa agttttttcg ggatttcggt 3120
attcagagtg tttttttcga agaatttggg taccggagag ttttatgttt ttttttgaaa 3180
gatttttttt agttttttta tcgttttttg cgttatttga ggatcgtat tcgtgtttcg 3240
gttttggttt tattttttat ttggagagtc gtttttgctg ttcgggaatt tttagatttt 3300
tttcgtggtt tcggtattag aggttttttt ttattattta ttttttagta ttgggatttt 3360
aatgttttgt tttgtttttt ttgtggttgg gttcggtttt tttcggagtt ttgatttcgg 3420
gaaagggagc ggtttttttt cggttaatat ttatttttag aagtagtaat agtagtaggc 3480
gcggttcgtt tatggcgcgg tcggtggtat ttgtttttat cgttcgtttt tcgcggtagc 3540
gttcgatttt tagttcgtt cgtttttcgg attgatgggg ttgcgttcg ttgcgtttta 3600
gcgttttttt tgttcgtcgg agttggtcgc ggttcggttc gttttggttg cgggcgggag 3660
aggttgggtg aagttagtg tgccgttcg ttttcgtttc gtttagttcg tttattttcg 3720
gaatcgcgtt cgttcgtttt gtcgtttcgg ggtgggaagt agaggtaaag ggagggcgtg 3780
cggtttttcg tatttcgttg cgtttttttt tgttttgtt ttttagagttt tttattttat 3840
tcgttttggg attttagttt cggttcgcgt tattgcgcgt tcgttttcgga tgttgtgggt 3900
tcggggatta gggcgttttt attgcggtt ttgttttttt tcggttcgcg tt 3952

```

<210> 318 a <210> 431

000

<210> 432

5 <211> 3952

<212> ADN

<213> Secuencia Artificial

<220>

<223> ADN genómico tratado químicamente (Homo sapiens)

10 <400> 432

```

ggttgtagtt ggagaggaat aggaattgta gtggggatgt tttggttttt gggtttatag 60
tatttgggat ggatgtgtag tagtgtgggt tgggaattgg gtattagggt gggatgggtg 120
agaggtttta agggataaag tagggagaag tgtagtgggg tgtggggaat tgtatgtttt 180
ttttttgttt ttgtttttta ttttgaggtg gtagggtggg tgggtgtggt tttgggggtg 240
gggtgggttg gtgggggtga ggtggggttg tagtattggt tttatttagt tttttttggt 300
tgtagttaga gtgagttgag ttgtggttag ttttggtggg taggggggtg gttgagtggt 360

```

ES 2 659 325 T3

```

agtgtagtgt agttttatta gtttgtaaag tggattgagt tggaaagtga gtgttgttgt 420
gggaggtggg tgatgggggt aggtgttatt ggttgtgtta tggatgggtt gtgtttgttg 480
ttgttgttgt ttttgggggt gagtgttagt tggagggggt ttgttttttt ttttgggatt 540
agaatlttga gaagagttgg gtgttgttat taaggaaata gaatagagta ttgggggttt 600
agatattgag ggtgggtggg gggaaaggat ttttgatggt gggattatga aggagggttt 660
agggtttttg gagtgtagag gtgatttttt aggggtggaga tgagggttaag attggagtat 720
ggatgttggg ttttaggtat ttaggggggt ggtgggggag ttggggagggt ttttttaaga 780
gggggtatgg ggttttttga tgtttaggtt ttttggaaaga ggatatttga atgttgggat 840
tttgaaggga tttttttttt agtatttttg ttttggaga gttgtgggat agaattaagg 900
tgagagaagg aggggggaatt ggatggggat tagagatgag aggggtgagt tgggttgggg 960
tggggagttt gggatgatgg gatggaataa tggaggagggt tggagggatt ggaggtagag 1020
gggatttggg aaggataatg gggatttggg agataatggg ggggaggggt gttggaggga 1080
gaggttgggg agtgggagag aggttgagaa gtgggttagg gagggtagaa gaggggtgat 1140
ggtgaggggt gttagagatg ggaagtagaa ggaaggaga tagagtgggg tgtggatttt 1200
gaagtgggtg gggttttgtt tgtttgttga gggatagtga gatgagaaga gagagttagag 1260
gtttggatat ttttagtgtt tgtttttgtg ttttgtttt tggttttttt tagtttttga 1320
attgggggtt tggatttaag gttgggaggg gagtgtttat tttgttgggg tgaatttgtt 1380
tttggggttt ttttatggtt ggtgggtttt tttgatgtgt gtgtttttat ggtttgaagt 1440
agtgtagtgg attgtgaggg atggagtggg tgtgttttta tttgggttgg tgggtgttat 1500
gttttggggg gtagagtgtt ggggtgtatt aggtggggat tttttttggt tgtgtgtagt 1560
tttggttatg taggtgggag gtggtaggtt gggggtgttg tggggtgagg taagtgtagt 1620
ttgttgttgt ttgtttgtga gtttgggggt gtgtgttgtt ttttatttag ttgtgtgat 1680
tgagtgttgt gtttattgtg ttttgtgggt ttttgttggg tgaagggtt ggatttgggt 1740
tgagtttttt ttggtttttg gtgtaagtgt ttgggtattt ttgggtattt ggggtgttgg 1800
atgttttggg ttttgtagtg tggatatttt ggttattgat ttggtaagg ttggtgggtt 1860
tttgggtggg tttgatgaga ttgttagatg tggtttgttt tatggttatg aattgaatgt 1920
tttgaagggt ttggtaatgg aggaggtgtt tttatttttt ttgttagtat tttttattag 1980
agtattgtgt tttaaatltt ggttttatag atatggagat tgaggttttg agagttaaa 2040
tgatttgggt aagattttat agtaagtttg gtttagagtt tgggttagatt ttttgattt 2100
atttttagtt tggatatttt ttattttttt aggggttagt tgttgtttta gtttggggtt 2160
atggttgtgt ttttttagtag ggtggggggg gttgatattg ttttttagagt ttgttgggtg 2220
tagagtttgg gggtagaggt ggttagagatt ttgtttgggt gtgggtttta gtttgaaagt 2280
ttagtttttag ttttttggag ttgttaggat ttgtggttgt gtttggggat ttgggagtga 2340
ttgtgggtat gtttgttgat taatgttgtt ggttagagat gttgtttaga tgtgggtggg 2400
tgagtgtaga ttaggagagt ggggaggagg gattggattt tagaggggtt atgatttggg 2460
tttgggtttt gggtaagagt gagggttttt gtgtgaagat ttaaggagg aggggagttg 2520
gggtgtggagg atttgggtgt ttgggaaggt gtattttgat aggaatttgt tgtttgtagt 2580
tttgtgggtt tttgtttttg ttttgggtgt ggttgttttg gtttgggatg gttgtgtgtg 2640
gtttgagttt ttttttgggt tgtggtgaga gagagagggt tgaattaga gtgtgtttt 2700
gtgggttggg ttggtgggtt tgttggtaat ggaggtattt tgttatttag atgtttgtaa 2760
ttagagttgt tgggttgggt aatgtgttta atagggatg aatgagggtt gtaaattggg 2820
gtgtgtgagt ggttgggttg agttgggttg atggtggatg gggaggtagt ttttggggg 2880
atgggttttt attgtattgt ttttagtttag tttggtttaa gtgttttgt ttttttttg 2940
gggattgtgt ggggaggtgg gaataattga tgtgttagt ttttattaag tgttttgtat 3000
tttttgggta gttttttttg aattatttaa tttttataag gtttttagtaa ggtgaattta 3060
gttattttta ttttgtagt gaggaaatag aatttttttag attttttagt ttgagattag 3120
gttttttttag tgagtttagt gtggtgtttt tgttggaaatt taggatgttt ggtttgggat 3180
gttttttttt ttatataatg taggtttttt tttgtttttt atttttttaga ttatggaagg 3240
agtgttgggt ttgagagatt aaattgtgtt ttatgttttt ggttttatat attttagattt 3300
gagttttttt tttatatgta gaggttttgt ttttttttaa gtttttatgt tatattattt 3360
tgggtaatta gttttttttt ttttaatttt tttttatttt aaaggagtg aggggtatgt 3420
gttagtggtt tttttgggtt tgtattgatt ttaaagggtt ttttaggtgt ttgaaaattt 3480
tttttatttt atgggtgtga ttatggtttt atttatttaa gagttttttg ttgaagtgt 3540
tggaatgggt aggggtgatt atattgaaat atttgtatgg ttttaaatat ttttaattgt 3600
tttgttgttt tttttttttt ttttaattaaa aaaaatgaaa attttttaaaa gtttaattat 3660
ttaaggattt ttttttttga gtttttttga agttttgaaa tggtttaaat aaaaagatta 3720
taagtgtttt taaaaatgag atgaaattat tttgttaaat gtgaaatgat taagttaat 3780
ataataaaat tttagggaaa tttattttgt atttttataa attaattttt ttggatttga 3840
ttttggagta attagtttga atgttagtta ttttttttta tttggttaaa tttttttttt 3900
ttgtttgggg ttttttttaag atgagatgtt tttttgataa ttaaatatta tt 3952

```

<210> 433

<211> 3952

<212> ADN

5 <213> Secuencia Artificial

<220>

<223> ADN genómico tratado químicamente (Homo sapiens)

ES 2 659 325 T3

<400> 433

| | | | | | | |
|--------------|--------------|--------------|---------------|--------------|--------------|------|
| aataaatggt | agttattnaa | gaagtatntt | atnttaagga | gattnttaggt | aggaggggag | 60 |
| agnttagtta | agtaggagg | ggtgattaat | atnttaggta | attgntntaa | aattagattt | 120 |
| aaaaggatta | atnttatagg | atgatagata | aatntntntg | aaatntgtat | gtgttatatt | 180 |
| tagttatntt | atatttgata | gaatgattnt | atnttatntt | taagaatggt | tghtaatntt | 240 |
| ttgntntggt | tattnttaag | tttataagga | attaaggtgg | aaggatntt | agatgaattg | 300 |
| atntnttaaga | atntntatnt | ttnttaatta | gagaaaagag | agaaatagtg | aaatagttga | 360 |
| aagtatntga | aattatagta | atgntntagt | ataatagtt | ttggttatnt | taatagntnt | 420 |
| agtaaagagt | ttntaagtga | atggggtgt | gnttatntgt | atgggatggg | agagatntnt | 480 |
| aaatatttgg | agggtntntt | gaggttgatg | taaatttagg | ggaggtattg | gtatatattt | 540 |
| tttatntntt | ttggataggg | gaggagtgg | gaggaaagga | gttaattatt | taagataatg | 600 |
| tagtatagag | atnttgagagg | gggtaggggt | ttgtgtgtg | gagaaggggt | ttagatntaa | 660 |
| atggtggggg | ttaaaggtat | agggtatgat | ttaatntntt | agagtatga | ttntntntat | 720 |
| gattntagaag | gtaggggggt | ggagggagt | tggtatatgt | aggaaagaga | atattnttag | 780 |
| ttaaagtatnt | tgggtntntaa | taaagatggt | atattagatt | tattggggga | gnttggntnt | 840 |
| gggtntgaaa | gntntagaagg | ttntgntntt | ttaatgtgta | agtgggaata | atntaaatnta | 900 |
| ttntgttagg | atntntataag | gattntaaata | ttntaagagaa | attattaggg | aagtntaagg | 960 |
| tatttagtag | gaatttagta | tattgattat | ttntgntntt | ttatgtggt | ttnttagggaa | 1020 |
| gaagtgaggt | gntntgagnta | gattgggttg | gaatagtgtg | gtaggggtnt | gntntntgtg | 1080 |
| gagntgntntt | tttatnttat | atattntntt | tttagntntg | ttgnttatgt | atgnttatnt | 1140 |
| gntgntntnt | ttntatntnt | attaggtgta | ttagntagtt | tggtggtntt | ggttatagat | 1200 |
| gnttgaaatga | taaagtgtnt | ttatnttg | tgtgntntgt | tagntgattt | gntgggatgt | 1260 |
| gntntggntt | tagntntntt | ttntntatnt | tgntntagga | agaaatntgg | atntgtgata | 1320 |
| gntatntntag | atntgagtat | tgtgtgntga | ggtggaggtg | ggagtnttag | gggtntgtaga | 1380 |
| tggtaggtntt | ttgntgggt | atattntntt | aagtgntntag | gntntntatg | tttagntntt | 1440 |
| ttntntntnt | gggtntntgt | gtggggatnt | ttgntntntgt | ttagatntgg | agntntaagt | 1500 |
| gntgntntnt | tgggatnttg | ttntntntnt | ttgntntntt | ggntntatgt | tgtntatntg | 1560 |
| tgtntgagnta | gtgntntntaa | ttagntggtg | tagnttagtag | atgntntntgt | gntntgntntt | 1620 |
| aaatntnttg | atnttagntat | aggntntgat | agntnttaggg | aatntgggt | gagntntntg | 1680 |
| gntggggntt | gtatntggat | agaatntntg | tttatntntat | ttgtagnttt | tatntgntgat | 1740 |
| ggatntntgg | gatagntnta | atntntntnt | ttntgntggg | aaatntagtt | gtgatntntga | 1800 |
| gntgggatag | tggntgntntt | ttgaaaaggt | gggggagntat | tgagnttggga | atntagnttg | 1860 |
| ggagnttagt | tatgatntntg | gntntaatntg | ttgtgagat | ttggntaaagt | tgtntaaant | 1920 |
| ttntagatntt | tagntntntgt | atntntgtaaag | ttggaatntg | gggtntagtg | ttntgatntaa | 1980 |
| agatntgntg | ggggagagnt | aagatntntt | ttntgntgnt | agatntntnta | gggatntntg | 2040 |
| ttntatggnta | taaagttagt | tatatntgat | aatntntgntg | gattatnttg | aggatntntt | 2100 |
| gattntntgt | gagntgnttg | ttntgggat | tgtgntatag | aatntgaggt | gntntggntgt | 2160 |
| ttntgntntg | ttagntgntt | agntgntntgt | atntgagagnt | aggagagntt | tagatntggat | 2220 |
| ttntgatntt | tgagntgntg | gagntntatgg | agntgntgntg | gtgntgntgt | tggntgntgt | 2280 |
| agntagntgg | ggagntgntgt | gtagntnttag | atntntagnt | aggtagntgnt | ggatntgntat | 2340 |
| tgtntntgntt | tgtagntgntt | ttntgntgnt | gntntntgnt | tgtgntagnta | gagntgntgntg | 2400 |
| tggnttagntaa | gggtntntgt | ttagntgntt | ttgntgntt | gtatntntgag | atntagnttat | 2460 |
| tgtntagntt | gntagggnta | tatntgntt | gntntntgntg | atntgntgntg | ttgntntaag | 2520 |
| ttntgagaat | atntgntgntg | gaggagntntg | ttgntntgntg | gggaatntntg | ggagntggntt | 2580 |
| tgtntntgntg | aagtggntat | ttntntntnta | gntntntagat | tgtagntntnta | atntntggat | 2640 |
| tgggagagnt | tgtgagntag | agntgntggga | tagntgnttg | aaatgntntaa | gntntntgntt | 2700 |
| ttntntntntg | ttntatntgt | ttnttagntgg | tagntggntat | ttntgntat | ttagggntntg | 2760 |
| tgtntntgntt | tgtntntntt | ttntntgntt | ttatntntnt | gntntntntg | ttgntgntt | 2820 |
| ttntntgntt | ttntntaat | atntntntaat | ttntntntntg | ttntntntaat | ttntntntntg | 2880 |
| atgntntntt | ttntntatntgt | ttggntgntt | ttatntgntt | ttgntggntt | ttntntgntt | 2940 |
| ttagntntntt | tgantntntt | tatntgntnta | ttntgntgntt | ttggntntntt | tgtntntagntt | 3000 |
| tagntntgntt | ttntntatntt | tagntntntgt | ttagntntntt | ttntntntntt | tgtntntgntt | 3060 |
| ttgntntatg | atntntntaga | gattntgagatg | ttgagggntaa | agntntntntg | ggatntntgnt | 3120 |
| atntntagntg | ttntntntntga | agaatntggg | tatntggagag | ttntntatgntt | ttntntntntaa | 3180 |
| gattntntntt | agntntntnta | ttgntntntntg | tggntatntntga | ggatntgntat | ttgntgntntt | 3240 |
| gntntntgntt | tatntntntt | ttggagagnt | gntntntgntt | ttntggntaat | ttagatntntt | 3300 |
| ttntntggntt | ttgntatntag | aggntntntt | ttatntntnta | ttntntagntat | ttgggntntt | 3360 |
| aatgntntntg | ttntgntntt | tggntgntgnt | gntntgntntt | ttntntgagnt | ttgntntntg | 3420 |
| gaaagggagt | gggtntntntt | tggntntaat | ttatntntntag | aagtntntaat | agntntagntt | 3480 |
| gtgntntgntt | tatgntgntg | ttgntgntat | ttgntntntat | tgtntntgntt | ttgntgntagnt | 3540 |
| gntntgntntt | tagntntgntt | tgtntntgntg | atntgatggg | ttgntgntgntg | ttgntgntnta | 3600 |
| gtgntntntt | tgtntgnttg | agntntgntgt | ggntntgntt | gntntntgntt | tggntggntg | 3660 |
| aggntggntg | aagnttagntg | tgtgntntntg | ttntntgntt | gntntagntt | ttatntntntg | 3720 |
| gaatntgntt | tgtntgntntt | gntgntntntg | gntggntaagt | agagntntaa | ggagntgntg | 3780 |
| tggntntntg | tatntntgntg | tgtntntntt | tgtntntgntt | ttntagagntt | ttatntntat | 3840 |
| ttgntntgntt | atnttagntt | tggntntgnt | tatntgntgnt | ttgntntntga | tgtntgntgntt | 3900 |
| ttgggntnta | gggtntntntt | atntgntgntt | ttgntntntt | ttggntntgntg | tt | 3952 |

<210> 434 a <210> 599
000
<210> 600
<211> 22
5 <212> ADN
<213> Secuencia Artificial
<220>
<223> Cebador de detección para
<400> 600
10 ggggtgata ttgttttag ag 22
<210> 601
<211> 19
<212> ADN
<213> Secuencia Artificial
15 <220>
<223> Cebador de detección para
<400> 601
cccctccttc cttaaact 19
<210> 602 a <210> 769
20 000
<210> 770
<211> 16
<212> ADN
<213> Secuencia Artificial
25 <220>
<223>
<400> 770
ttcgtcggcg gtagag 16
<210> 771
30 <211> 16
<212> ADN
<213> Secuencia Artificial
<220>
<223>
35 <400> 771
tagagttgt tgggg 16
<210> 772

ES 2 659 325 T3

<211> 16
<212> ADN
<213> Secuencia Artificial
<220>
5 <223>
<400> 772
gatcgcgggt acgttt 16
<210> 773
<211> 17
10 <212> ADN
<213> Secuencia Artificial
<220>
<223>
<400> 773
15 attgtgggta tgtttgt 17
<210> 774
<211> 16
<212> ADN
<213> Secuencia Artificial
20 <220>
<223>
<400> 774
ttaacgtcgt tggta 16
<210> 775
25 <211> 17
<212> ADN
<213> Secuencia Artificial
<220>
<223>
30 <400> 775
tgattaatgt tgttggt 17
<210> 776
<211> 16
<212> ADN
35 <213> Secuencia Artificial
<220>
<223>

ES 2 659 325 T3

<400> 776
ttcgcgcgaa gattta 16
<210> 777
<211> 17
5 <212> ADN
<213> Secuencia Artificial
<220>
<223>
<400> 777
10 gttttgtgt gaagatt 17
<210> 778 a <210> 1306
000
<210> 1307
<211> 21
15 <212> ADN
<213> Secuencia Artificial
<220> tratado con bisulfito
<223> ácido nucleico para análisis de estado de metilación deSEQ ID NO: 7
<400> 1307
20 GAGAGAGAGG GTTGAAATTA G 21
<210> 1308
<211> 16
<212> ADN
<213> Secuencia Artificial
25 <220> tratado con bisulfito
<223> ácido nucleico para análisis de estado de metilación deSEQ ID NO: 7
<400> 1308
CCATTACCGA CGCGAC 16
<210> 1309
30 <211> 19
<212> ADN
<213> Secuencia Artificial
<220> tratado con bisulfito
<223> ácido nucleico para análisis de estado de metilación deSEQ ID NO: 7
35 <400> 1309
CTCTAATTTC AACCCCTCTC 19
<210> 1310

ES 2 659 325 T3

- <211> 20
<212> ADN
<213> Secuencia Artificial
<220> tratado con bisulfito
- 5 <223> ácido nucleico para análisis de estado de metilación deSEQ ID NO: 7
<400> 1310
CCTCCATTAC CAACACAACC 20
<210> 1311
<211> 20
- 10 <212> ADN
<213> Secuencia Artificial
<220> tratado con bisulfito
<223> ácido nucleico para análisis de estado de metilación deSEQ ID NO: 7
<400> 1311
- 15 AGAGAGAGGG TTGAAATTAG 20
<210> 1312
<211> 23
<212> ADN
<213> Secuencia Artificial
- 20 <220> tratado con bisulfito
<223> ácido nucleico para análisis de estado de metilación deSEQ ID NO: 7
<400> 1312
CTAAATAACA AAATACCTCC ATT 23
<210> 1313
- 25 <211> 23
<212> ADN
<213> Secuencia Artificial
<220> tratado con bisulfito
<223> ácido nucleico para análisis de estado de metilación deSEQ ID NO: 7
- 30 <400> 1313
AAATAACAAA ATACCTCCAT TAC 23
<210> 1314
<211> 22
<212> ADN
- 35 <213> Secuencia Artificial
<220> tratado con bisulfito
<223> ácido nucleico para análisis de estado de metilación deSEQ ID NO: 7

ES 2 659 325 T3

- <400> 1314
TAAATAACAA AATACCTCCA TT 22
- <210> 1315
<211> 20
- 5 <212> ADN
<213> Secuencia Artificial
<220> tratado con bisulfito
<223> ácido nucleico para análisis de estado de metilación deSEQ ID NO: 7
- <400> 1315
- 10 ACCTCCATTA CCAACACAAC 20
<210> 1316
<211> 20
<212> ADN
<213> Secuencia Artificial
- 15 <220> tratado con bisulfito
<223> ácido nucleico para análisis de estado de metilación deSEQ ID NO: 7
- <400> 1316
CTCCATTACC AACACAACCC 20
<210> 1317
- 20 <211> 21
<212> ADN
<213> Secuencia Artificial
<220> tratado con bisulfito
<223> ácido nucleico para análisis de estado de metilación deSEQ ID NO: 7
- 25 <400> 1317
TACCTCCATT ACCAACACAA C 21
<210> 1318
<211> 21
<212> ADN
- 30 <213> Secuencia Artificial
<220> tratado con bisulfito
<223> ácido nucleico para análisis de estado de metilación deSEQ ID NO: 7
- <400> 1318
CCTCCATTAC CAACACAACC C 21
- 35 <210> 1319
<211> 21
<212> ADN

ES 2 659 325 T3

- <213> Secuencia Artificial
<220> tratado con bisulfito
<223> ácido nucleico para análisis de estado de metilación deSEQ ID NO: 7
<400> 1319
- 5 ACCTCCATTA CCAACACAAC C 21
<210> 1320
<211> 22
<212> ADN
<213> Secuencia Artificial
- 10 <220> tratado con bisulfito
<223> ácido nucleico para análisis de estado de metilación deSEQ ID NO: 7
<400> 1320
ACCTCCATTA CCAACACAAC CC 22
<210> 1321
- 15 <211> 22
<212> ADN
<213> Secuencia Artificial
<220> tratado con bisulfito
<223> ácido nucleico para análisis de estado de metilación deSEQ ID NO: 7
- 20 <400> 1321
TACCTCCATT ACCAACACAA CC 22
<210> 1322
<211> 23
<212> ADN
- 25 <213> Secuencia Artificial
<220> tratado con bisulfito
<223> ácido nucleico para análisis de estado de metilación deSEQ ID NO: 7
<400> 1322
ATACCTCCAT TACCAACACA ACC 23
- 30 <210> 1323
<211> 22
<212> ADN
<213> Secuencia Artificial
<220> tratado con bisulfito
- 35 <223> ácido nucleico para análisis de estado de metilación deSEQ ID NO: 7
<400> 1323
AAATAACAAA ATACCTCCAT TA 22

- <210> 1324
<211> 23
<212> ADN
<213> Secuencia Artificial
- 5 <220> tratado con bisulfito
<223> ácido nucleico para análisis de estado de metilación deSEQ ID NO: 7
<400> 1324
TACCTCCATT ACCAACACAA CCC 23
<210> 1325
- 10 <211> 24
<212> ADN
<213> Secuencia Artificial
<220> tratado con bisulfito
<223> ácido nucleico para análisis de estado de metilación deSEQ ID NO: 7
- 15 <400> 1325
AATACCTCCA TTACCAACAC AACC 24
<210> 1326
<211> 21
<212> ADN
- 20 <213> Secuencia Artificial
<220> tratado con bisulfito
<223> ácido nucleico para análisis de estado de metilación deSEQ ID NO: 7
<400> 1326
AAATAACAAA ATACCTCCAT T 21
- 25 <210> 1327
<211> 24
<212> ADN
<213> Secuencia Artificial
<220> tratado con bisulfito
- 30 <223> ácido nucleico para análisis de estado de metilación deSEQ ID NO: 7
<400> 1327
ATACCTCCAT TACCAACACA ACCC 24
<210> 1328
<211> 25
- 35 <212> ADN
<213> Secuencia Artificial
<220> tratado con bisulfito

ES 2 659 325 T3

- <223> ácido nucleico para análisis de estado de metilación deSEQ ID NO: 7
<400> 1328
AATACCTCCA TTACCAACAC AACCC 25
<210> 1329
- 5 <211> 22
<212> ADN
<213> Secuencia Artificial
<220> tratado con bisulfito
<223> ácido nucleico para análisis de estado de metilación deSEQ ID NO: 7
- 10 <400> 1329
TCTAAATAAC AAAATACCTC CA 22
<210> 1330
<211> 26
<212> ADN
- 15 <213> Secuencia Artificial
<220> tratado con bisulfito
<223> ácido nucleico para análisis de estado de metilación deSEQ ID NO: 7
<400> 1330
AAATACCTCC ATTACCAACA CAACCC 26
- 20 <210> 1331
<211> 22
<212> ADN
<213> Secuencia Artificial
<220> tratado con bisulfito
- 25 <223> ácido nucleico para análisis de estado de metilación deSEQ ID NO: 7
<400> 1331
CTAAATAACA AAATACCTCC AT 22
<210> 1332
<211> 27
- 30 <212> ADN
<213> Secuencia Artificial
<220> tratado con bisulfito
<223> ácido nucleico para análisis de estado de metilación deSEQ ID NO: 7
<400> 1332
- 35 AAAATACCTC CATTACCAAC ACAACCC 27
<210> 1333
<211> 25

ES 2 659 325 T3

- <212> ADN
- <213> Secuencia Artificial
- <220> tratado con bisulfito
- <223> ácido nucleico para análisis de estado de metilación deSEQ ID NO: 7
- 5 <400> 1333
TCTAAATAAC AAAATACCTC CATTA 25
- <210> 1334
- <211> 21
- <212> ADN
- 10 <213> Secuencia Artificial
- <220> tratado con bisulfito
- <223> ácido nucleico para análisis de estado de metilación deSEQ ID NO: 7
- <400> 1334
CCATTACCAA CACAACCCAC C 21
- 15 <210> 1335
- <211> 24
- <212> ADN
- <213> Secuencia Artificial
- <220> tratado con bisulfito
- 20 <223> ácido nucleico para análisis de estado de metilación deSEQ ID NO: 7
- <400> 1335
CTAAATAACA AAATACCTCC ATTA 24
- <210> 1336
- <211> 24
- 25 <212> ADN
- <213> Secuencia Artificial
- <220> tratado con bisulfito
- <223> ácido nucleico para análisis de estado de metilación deSEQ ID NO: 7
- <400> 1336
TAAATAACAA AATACCTCCA TTAC 24
- 30 <210> 1337
- <211> 22
- <212> ADN
- <213> Secuencia Artificial
- 35 <220> tratado con bisulfito
- <223> ácido nucleico para análisis de estado de metilación deSEQ ID NO: 7
- <400> 1337

TCCATTACCA ACACAACCCA CC 22

<210> 1338

<211> 23

<212> ADN

5 <213> Secuencia Artificial

<220> tratado con bisulfito

<223> ácido nucleico para análisis de estado de metilación deSEQ ID NO: 7

<400> 1338

CTCCATTACC AACACAACCC ACC 23

10 <210> 1338 a <210> 4648

000

<210> 4649

<211> 22

<212> ADN

15 <213> Secuencia Artificial

<220> tratado con bisulfito

<223> ácido nucleico para análisis de estado de metilación deSEQ ID NO: 7

<400> 4649

TTTCGATAGG AATTTGTCGT TT 22

20 <210> 4650

<211> 21

<212> ADN

<213> Secuencia Artificial

<220> tratado con bisulfito

25 <223> ácido nucleico para análisis de estado de metilación deSEQ ID NO: 7

<400> 4650

GAAACGCGCT CTAATTTCAA C 21

<210> 4651

<211> 29

30 <212> ADN

<213> Secuencia Artificial

<220> tratado con bisulfito

<223> ácido nucleico para análisis de estado de metilación deSEQ ID NO: 7

<400> 4651

35 TTGTTTCGGTT TGGGATGGTT GTGCGCGGT 29

<210> 4652

<211> 22

ES 2 659 325 T3

- <212> ADN
<213> Secuencia Artificial
<220> tratado con bisulfito
<223> ácido nucleico para análisis de estado de metilación deSEQ ID NO: 7
- 5 <400> 4652
CGTTTAATAG GGATGGAACG AG 22
<210> 4653 a <12005>
000
<210> 12006
- 10 <211> 20
<212> ADN
<213> Secuencia Artificial
<220> tratado con bisulfito
<223> ácido nucleico para análisis de estado de metilación deSEQ ID NO: 7
- 15 <400> 12006
GTTTTCGGTG TAAGTCGTTG 20
<210> 12007
<211> 22
<212> ADN
- 20 <213> Secuencia Artificial
<220> tratado con bisulfito
<223> ácido nucleico para análisis de estado de metilación deSEQ ID NO: 7
<400> 12007
ACATCTAACA ATCTCGTCGA AC 22
- 25 <210> 12008
<211> 16
<212> ADN
<213> Secuencia Artificial
<220> tratado con bisulfito
- 30 <223> ácido nucleico para análisis de estado de metilación deSEQ ID NO: 7
<400> 12008
AACGAGACGG GGGCGT 16
<210> 12009
<211> 27
- 35 <212> ADN
<213> Secuencia Artificial
<220> tratado con bisulfito

ES 2 659 325 T3

- <223> ácido nucleico para análisis de estado de metilación deSEQ ID NO: 7
<400> 12009
TTCGGATTTT GTAGCGCGGT ATTCGG 27
<210> 12010
- 5 <211> 21
<212> ADN
<213> Secuencia Artificial
<220> tratado con bisulfito
<223> ácido nucleico para análisis de estado de metilación deSEQ ID NO: 7
- 10 <400> 12010
CATCTAACAA TCTCGTCGAA C 21
<210> 12011
<211> 19
<212> ADN
- 15 <213> Secuencia Artificial
<220> tratado con bisulfito
<223> ácido nucleico para análisis de estado de metilación deSEQ ID NO: 7
<400> 12011
ATTGAGCGT AGCGTTTAT 19
- 20 <210> 12012
<211> 22
<212> ADN
<213> Secuencia Artificial
<220> tratado con bisulfito
- 25 <223> ácido nucleico para análisis de estado de metilación deSEQ ID NO: 7
<400> 12012
CGTTAAATAC CCAACGACTT AC 22
<210> 12013
<211> 17
- 30 <212> ADN
<213> Secuencia Artificial
<220> tratado con bisulfito
<223> ácido nucleico para análisis de estado de metilación deSEQ ID NO: 7
<400> 12013
- 35 GGTTTTGCGG TTTCGAA 17
<210> 12014
<211> 17

- <212> ADN
<213> Secuencia Artificial
<220> tratado con bisulfito
<223> ácido nucleico para análisis de estado de metilación deSEQ ID NO: 7
- 5 <400> 12014
GTCGGGATTC GGTTTGA 17
<210> 12015
<211> 19
<212> ADN
- 10 <213> Secuencia Artificial
<220> tratado con bisulfito
<223> ácido nucleico para análisis de estado de metilación deSEQ ID NO: 7
<400> 12015
GGTTTTCGGT GTAAGTCGT 19
- 15 <210> 12016
<211> 19
<212> ADN
<213> Secuencia Artificial
<220> tratado con bisulfito
- 20 <223> ácido nucleico para análisis de estado de metilación deSEQ ID NO: 7
<400> 12016
TTTTCGGTGT AAGTCGTTG 19
<210> 12017
<211> 19
- 25 <212> ADN
<213> Secuencia Artificial
<220> tratado con bisulfito
<223> ácido nucleico para análisis de estado de metilación deSEQ ID NO: 7
<400> 12017
- 30 ACGTTTCGGA TTTTGTAGC 19
<210> 12018
<211> 18
<212> ADN
<213> Secuencia Artificial
- 35 <220> tratado con bisulfito
<223> ácido nucleico para análisis de estado de metilación deSEQ ID NO: 7
<400> 12018

TTCGGGTTAT CGATTCGG 18

<210> 12019

<211> 16

<212> ADN

5 <213> Secuencia Artificial

<220> tratado con bisulfito

<223> ácido nucleico para análisis de estado de metilación deSEQ ID NO: 7

<400> 12019

AAAGGTCGGC GGGTTT 16

10 <210> 12020

<211> 21

<212> ADN

<213> Secuencia Artificial

<220> tratado con bisulfito

15 <223> ácido nucleico para análisis de estado de metilación deSEQ ID NO: 7

<400> 12020

ATCTAACAAT CTCGTCGAAC C 21

<210> 12021

<211> 18

20 <212> ADN

<213> Secuencia Artificial

<220> tratado con bisulfito

<223> ácido nucleico para análisis de estado de metilación deSEQ ID NO: 7

<400> 12021

25 TCGAGCGTAG CGTTTATC 18

<210> 12022

<211> 18

<212> ADN

<213> Secuencia Artificial

30 <220> tratado con bisulfito

<223> ácido nucleico para análisis de estado de metilación deSEQ ID NO: 7

<400> 12022

TAGCGTTTAT CGCGTTTC 18

<210> 12023

35 <211> 19

<212> ADN

<213> Secuencia Artificial

ES 2 659 325 T3

- <220> tratado con bisulfito
<223> ácido nucleico para análisis de estado de metilación deSEQ ID NO: 7
<400> 12023
GTAGCGTTTA TCGCGTTTC 19
- 5 <210> 12024
<211> 20
<212> ADN
<213> Secuencia Artificial
<220> tratado con bisulfito
- 10 <223> ácido nucleico para análisis de estado de metilación deSEQ ID NO: 7
<400> 12024
GATTCGAGCG TAGCGTTTAT 20
<210> 12025
<211> 18
- 15 <212> ADN
<213> Secuencia Artificial
<220> tratado con bisulfito
<223> ácido nucleico para análisis de estado de metilación deSEQ ID NO: 7
<400> 12025
- 20 TTCGAGCGTA GCGTTTAT 18
<210> 12026
<211> 19
<212> ADN
<213> Secuencia Artificial
- 25 <220> tratado con bisulfito
<223> ácido nucleico para análisis de estado de metilación deSEQ ID NO: 7
<400> 12026
GGACGTTTCG GATTTTGTA 19
<210> 12027
- 30 <211> 22
<212> ADN
<213> Secuencia Artificial
<220> tratado con bisulfito
<223> ácido nucleico para análisis de estado de metilación deSEQ ID NO: 7
- 35 <400> 12027
AAACCTATAA CTACGTCCGA AA 22
<210> 12028

- <211> 22
<212> ADN
<213> Secuencia Artificial
<220> tratado con bisulfito
- 5 <223> ácido nucleico para análisis de estado de metilación deSEQ ID NO: 7
<400> 12028
TTTTGGTTTA CGTTCGTTTA TT 22
<210> 12029
<211> 17
- 10 <212> ADN
<213> Secuencia Artificial
<220> tratado con bisulfito
<223> ácido nucleico para análisis de estado de metilación deSEQ ID NO: 7
<400> 12029
- 15 GTTCGCGGTC GTTTTTA 17
<210> 12030
<211> 18
<212> ADN
<213> Secuencia Artificial
- 20 <220> tratado con bisulfito
<223> ácido nucleico para análisis de estado de metilación deSEQ ID NO: 7
<400> 12030
AGCGTTTTTA ATTAGCGG 18
<210> 12031
- 25 <211> 22
<212> ADN
<213> Secuencia Artificial
<220> tratado con bisulfito
<223> ácido nucleico para análisis de estado de metilación deSEQ ID NO: 7
- 30 <400> 12031
AAAACCTATA ACTACGTC CG AA 22
<210> 12032
<211> 22
<212> ADN
- 35 <213> Secuencia Artificial
<220> tratado con bisulfito
<223> ácido nucleico para análisis de estado de metilación deSEQ ID NO: 7

ES 2 659 325 T3

- <400> 12032
TTTGGTTTAC GTTCGTTTAT TC 22
<210> 12033
<211> 21
- 5 <212> ADN
<213> Secuencia Artificial
<220> tratado con bisulfito
<223> ácido nucleico para análisis de estado de metilación deSEQ ID NO: 7
<400> 12033
- 10 TTGGTTTACG TTCGTTTATT C 21
<210> 12034
<211> 22
<212> ADN
<213> Secuencia Artificial
- 15 <220> tratado con bisulfito
<223> ácido nucleico para análisis de estado de metilación deSEQ ID NO: 7
<400> 12034
AACACGTCTA CTA ACTAACG CC 22
<210> 12035
- 20 <211> 21
<212> ADN
<213> Secuencia Artificial
<220> tratado con bisulfito
<223> ácido nucleico para análisis de estado de metilación deSEQ ID NO: 7
- 25 <400> 12035
TTTCGTTTTT GTTTAGATTC G 21
<210> 12036
<211> 19
<212> ADN
- 30 <213> Secuencia Artificial
<220> tratado con bisulfito
<223> ácido nucleico para análisis de estado de metilación deSEQ ID NO: 7
<400> 12036
TACGTTCGTT TATTCGCGT 19
- 35 <210> 12037
<211> 20
<212> ADN

ES 2 659 325 T3

<213> Secuencia Artificial
<220> tratado con bisulfito
<223> ácido nucleico para análisis de estado de metilación deSEQ ID NO: 7
<400> 12037

5 AAGTCGTTGT TTTTTTGGGA 20
<210> 12038
<211> 21
<212> ADN
<213> Secuencia Artificial

10 <220> tratado con bisulfito
<223> ácido nucleico para análisis de estado de metilación deSEQ ID NO: 7
<400> 12038
TTTGTTTAC GTTCGTTTAT T 21
<210> 12039

15 <211> 21
<212> ADN
<213> Secuencia Artificial
<220> tratado con bisulfito
<223> ácido nucleico para análisis de estado de metilación deSEQ ID NO: 7

20 <400> 12039
CGTTTGAGTA GCGTTTTTAA T 21
<210> 12040
<211> 17
<212> ADN

25 <213> Secuencia Artificial
<220> tratado con bisulfito
<223> ácido nucleico para análisis de estado de metilación deSEQ ID NO: 7
<400> 12040
TTCGCGGTCG TTTTTAA 17

30 <210> 12041
<211> 19
<212> ADN
<213> Secuencia Artificial
<220> tratado con bisulfito

35 <223> ácido nucleico para análisis de estado de metilación deSEQ ID NO: 7
<400> 12041
GGCGTTAGTT AGTAGACGT 19

- <210> 12042
<211> 22
<212> ADN
<213> Secuencia Artificial
- 5 <220> tratado con bisulfito
<223> ácido nucleico para análisis de estado de metilación deSEQ ID NO: 7
<400> 12042
TCAAACCTA TAACTACGTC CG 22
- <210> 12043
- 10 <211> 22
<212> ADN
<213> Secuencia Artificial
<220> tratado con bisulfito
<223> ácido nucleico para análisis de estado de metilación deSEQ ID NO: 7
- 15 <400> 12043
ACCTATAACT ACGTCCGAAA AT 22
- <210> 12044
<211> 20
<212> ADN
- 20 <213> Secuencia Artificial
<220> tratado con bisulfito
<223> ácido nucleico para análisis de estado de metilación deSEQ ID NO: 7
<400> 12044
GTTTACGTTC GTTTATTCGC 20
- 25 <210> 12045
<211> 22
<212> ADN
<213> Secuencia Artificial
<220> tratado con bisulfito
- 30 <223> ácido nucleico para análisis de estado de metilación deSEQ ID NO: 7
<400> 12045
TAACTCTCGA TACAAACCGC TA 22
- <210> 12046
<211> 22
- 35 <212> ADN
<213> Secuencia Artificial
<220> tratado con bisulfito

ES 2 659 325 T3

- <223> ácido nucleico para análisis de estado de metilación deSEQ ID NO: 7
<400> 12046
ATATTTGATA ATTTTCGTCCG AT 22
<210> 12047
- 5 <211> 24
<212> ADN
<213> Secuencia Artificial
<220> tratado con bisulfito
<223> ácido nucleico para análisis de estado de metilación deSEQ ID NO: 7
- 10 <400> 12047
ATTGTGTTAT AGAATTTGAG GTGT 24
<210> 12048
<211> 18
<212> ADN
- 15 <213> Secuencia Artificial
<220> tratado con bisulfito
<223> ácido nucleico para análisis de estado de metilación deSEQ ID NO: 7
<400> 12048
GGAGGATTCG TCGATTTT 18
- 20 <210> 12049
<211> 21
<212> ADN
<213> Secuencia Artificial
<220> tratado con bisulfito
- 25 <223> ácido nucleico para análisis de estado de metilación deSEQ ID NO: 7
<400> 12049
CAAAACCTAT AACTACGTCC G 21
<210> 12050
<211> 23
- 30 <212> ADN
<213> Secuencia Artificial
<220> tratado con bisulfito
<223> ácido nucleico para análisis de estado de metilación deSEQ ID NO: 7
<400> 12050
- 35 AACCTATAAC TACGTCCGAA AAT 23
<210> 12051
<211> 20

ES 2 659 325 T3

- <212> ADN
<213> Secuencia Artificial
<220> tratado con bisulfito
<223> ácido nucleico para análisis de estado de metilación deSEQ ID NO: 7
- 5 <400> 12051
ACTCTCGATA CAAACCGCTA 20
<210> 12052
<211> 22
<212> ADN
- 10 <213> Secuencia Artificial
<220> tratado con bisulfito
<223> ácido nucleico para análisis de estado de metilación deSEQ ID NO: 7
<400> 12052
GCGTTTGAGT AGCGTTTTTA AT 22
- 15 <210> 12053
<211> 17
<212> ADN
<213> Secuencia Artificial
<220> tratado con bisulfito
- 20 <223> ácido nucleico para análisis de estado de metilación deSEQ ID NO: 7
<400> 12053
AGCGGCGTTA GTTAGTA 17
<210> 12054
<211> 22
- 25 <212> ADN
<213> Secuencia Artificial
<220> tratado con bisulfito
<223> ácido nucleico para análisis de estado de metilación deSEQ ID NO: 7
<400> 12054
- 30 AACCTATAAC TACGTCCGAA AA 22
<210> 12055
<211> 21
<212> ADN
<213> Secuencia Artificial
- 35 <220> tratado con bisulfito
<223> ácido nucleico para análisis de estado de metilación deSEQ ID NO: 7
<400> 12055

GTTTATTCGC GTTTGAGTAG C 21

<210> 12056

<211> 22

<212> ADN

5 <213> Secuencia Artificial

<220> tratado con bisulfito

<223> ácido nucleico para análisis de estado de metilación deSEQ ID NO: 7

<400> 12056

TTATATTTGA TAATTCGTC GG 22

10 <210> 12057

<211> 20

<212> ADN

<213> Secuencia Artificial

<220> tratado con bisulfito

15 <223> ácido nucleico para análisis de estado de metilación deSEQ ID NO: 7

<400> 12057

TTTATTCGCG TTTGAGTAGC 20

<210> 12058

<211> 23

20 <212> ADN

<213> Secuencia Artificial

<220> tratado con bisulfito

<223> ácido nucleico para análisis de estado de metilación deSEQ ID NO: 7

<400> 12058

25 GTTATATTTG ATAATTCGT CGG 23

<210> 12059

<211> 20

<212> ADN

<213> Secuencia Artificial

30 <220> tratado con bisulfito

<223> ácido nucleico para análisis de estado de metilación deSEQ ID NO: 7

<400> 12059

TCGTTTTTGT TTAGATTCGG 20

<210> 12060

35 <211> 23

<212> ADN

<213> Secuencia Artificial

ES 2 659 325 T3

- <220> tratado con bisulfito
<223> ácido nucleico para análisis de estado de metilación deSEQ ID NO: 7
<400> 12060
TATATTTGAT AATTTTCGTCG GAT 23
- 5 <210> 12061
<211> 21
<212> ADN
<213> Secuencia Artificial
<220> tratado con bisulfito
- 10 <223> ácido nucleico para análisis de estado de metilación deSEQ ID NO: 7
<400> 12061
CGTTTTTGTT TAGATTCGGA G 21
<210> 12062
<211> 21
- 15 <212> ADN
<213> Secuencia Artificial
<220> tratado con bisulfito
<223> ácido nucleico para análisis de estado de metilación deSEQ ID NO: 7
<400> 12062
- 20 AACTCTCGAT ACAAACCGCT A 21
<210> 12063
<211> 21
<212> ADN
<213> Secuencia Artificial
- 25 <220> tratado con bisulfito
<223> ácido nucleico para análisis de estado de metilación deSEQ ID NO: 7
<400> 12063
CTAACTCTCG ATACAAACCG C 21
<210> 12064
- 30 <211> 21
<212> ADN
<213> Secuencia Artificial
<220> tratado con bisulfito
<223> ácido nucleico para análisis de estado de metilación deSEQ ID NO: 7
- 35 <400> 12064
ACACGTCTAC TAACTAACGC C 21
<210> 12065

- <211> 20
<212> ADN
<213> Secuencia Artificial
<220> tratado con bisulfito
- 5 <223> ácido nucleico para análisis de estado de metilación deSEQ ID NO: 7
<400> 12065
GGTTTACGTT CGTTTATTCG 20
<210> 12066
<211> 23
- 10 <212> ADN
<213> Secuencia Artificial
<220> tratado con bisulfito
<223> ácido nucleico para análisis de estado de metilación deSEQ ID NO: 7
<400> 12066
- 15 ATCAAAACCT ATAACTACGT CCG 23
<210> 12067
<211> 21
<212> ADN
<213> Secuencia Artificial
- 20 <220> tratado con bisulfito
<223> ácido nucleico para análisis de estado de metilación deSEQ ID NO: 7
<400> 12067
AACCTATAAC TACGTCCGAA A 21
<210> 12068
- 25 <211> 20
<212> ADN
<213> Secuencia Artificial
<220> tratado con bisulfito
<223> ácido nucleico para análisis de estado de metilación deSEQ ID NO: 7
- 30 <400> 12068
CGATACAAAC CGCTAAACAC 20
<210> 12069
<211> 21
<212> ADN
- 35 <213> Secuencia Artificial
<220> tratado con bisulfito
<223> ácido nucleico para análisis de estado de metilación deSEQ ID NO: 7

ES 2 659 325 T3

<400> 12069
TTCGTTTTTG TTTAGATTCG G 21
<210> 12070
<211> 23
5 <212> ADN
<213> Secuencia Artificial
<220> tratado con bisulfito
<223> ácido nucleico para análisis de estado de metilación deSEQ ID NO: 7
<400> 12070
10 AAAACCTATA ACTACGTCCG AAA 23
<210> 12071
<211> 20
<212> ADN
<213> Secuencia Artificial
15 <220> tratado con bisulfito
<223> ácido nucleico para análisis de estado de metilación deSEQ ID NO: 7
<400> 12071
CGTTTATTCG CGTTTGAGTA 20
<210> 12072
20 <211> 23
<212> ADN
<213> Secuencia Artificial
<220> tratado con bisulfito
<223> ácido nucleico para análisis de estado de metilación deSEQ ID NO: 7
25 <400> 12072
TCTAAAATAA CTATACGCGA TCC 23
<210> 12073
<211> 20
<212> ADN
30 <213> Secuencia Artificial
<220> tratado con bisulfito
<223> ácido nucleico para análisis de estado de metilación deSEQ ID NO: 7
<400> 12073
CGGTTTTGGT TATAGACGTT 20
35 <210> 12074
<211> 18
<212> ADN

ES 2 659 325 T3

<213> Secuencia Artificial
<220> tratado con bisulfito
<223> ácido nucleico para análisis de estado de metilación deSEQ ID NO: 7
<400> 12074

5 GTTCGTTAGT CGATTCGT 18
<210> 12075
<211> 17
<212> ADN
<213> Secuencia Artificial

10 <220> tratado con bisulfito
<223> ácido nucleico para análisis de estado de metilación deSEQ ID NO: 7
<400> 12075
ATCGCGGTTA GGAAGAA 17
<210> 12076

15 <211> 20
<212> ADN
<213> Secuencia Artificial
<220> tratado con bisulfito
<223> ácido nucleico para análisis de estado de metilación deSEQ ID NO: 7

20 <400> 12076
CGACGATAAA ACCTACGAAT 20
<210> 12077
<211> 22
<212> ADN

25 <213> Secuencia Artificial
<220> tratado con bisulfito
<223> ácido nucleico para análisis de estado de metilación deSEQ ID NO: 7
<400> 12077
GTTAGTTAGT AGACGTGTTC GC 22

30 <210> 12078
<211> 23
<212> ADN
<213> Secuencia Artificial
<220> tratado con bisulfito

35 <223> ácido nucleico para análisis de estado de metilación deSEQ ID NO: 7
<400> 12078
GTCGTTTTTA AATTTTCGGA CGT 23

ES 2 659 325 T3

- <210> 12079
<211> 17
<212> ADN
<213> Secuencia Artificial
- 5 <220> tratado con bisulfito
<223> ácido nucleico para análisis de estado de metilación deSEQ ID NO: 7
<400> 12079
AGGGAATTGG GGTTGAG 17
- <210> 12080
- 10 <211> 19
<212> ADN
<213> Secuencia Artificial
<220> tratado con bisulfito
<223> ácido nucleico para análisis de estado de metilación deSEQ ID NO: 7
- 15 <400> 12080
TTATTCGCGT TTGAGTAGC 19
- <210> 12081
<211> 21
<212> ADN
- 20 <213> Secuencia Artificial
<220> tratado con bisulfito
<223> ácido nucleico para análisis de estado de metilación deSEQ ID NO: 7
<400> 12081
TATTTGATAA TTTCGTCGGA T 21
- 25 <210> 12082
<211> 20
<212> ADN
<213> Secuencia Artificial
<220> tratado con bisulfito
- 30 <223> ácido nucleico para análisis de estado de metilación deSEQ ID NO: 7
<400> 12082
CGCGAACACG TCTACTAACT 20
- <210> 12083
<211> 21
- 35 <212> ADN
<213> Secuencia Artificial
<220> tratado con bisulfito

ES 2 659 325 T3

- <223> ácido nucleico para análisis de estado de metilación deSEQ ID NO: 7
<400> 12083
AGCGTTTTTA ATTAGCGGCG T 21
<210> 12084
- 5 <211> 19
<212> ADN
<213> Secuencia Artificial
<220> tratado con bisulfito
<223> ácido nucleico para análisis de estado de metilación deSEQ ID NO: 7
- 10 <400> 12084
TTTACGTTCG TTTATTCGC 19
<210> 12085
<211> 19
<212> ADN
- 15 <213> Secuencia Artificial
<220> tratado con bisulfito
<223> ácido nucleico para análisis de estado de metilación deSEQ ID NO: 7
<400> 12085
AACCGCTAAA CACCTAACG 19
- 20 <210> 12086
<211> 22
<212> ADN
<213> Secuencia Artificial
<220> tratado con bisulfito
- 25 <223> ácido nucleico para análisis de estado de metilación deSEQ ID NO: 7
<400> 12086
CGCGAACACG TCTACTAACT AA 22
<210> 12087
<211> 21
- 30 <212> ADN
<213> Secuencia Artificial
<220> tratado con bisulfito
<223> ácido nucleico para análisis de estado de metilación deSEQ ID NO: 7
<400> 12087
- 35 ATTCGGAGTT TAAGTCGTTG T 21
<210> 12088
<211> 20

ES 2 659 325 T3

- <212> ADN
<213> Secuencia Artificial
<220> tratado con bisulfito
<223> ácido nucleico para análisis de estado de metilación deSEQ ID NO: 7
- 5 <400> 12088
TGGTTTACGT TCGTTTATTC 20
<210> 12089
<211> 21
<212> ADN
- 10 <213> Secuencia Artificial
<220> tratado con bisulfito
<223> ácido nucleico para análisis de estado de metilación deSEQ ID NO: 7
<400> 12089
CCTATAACTA CGTCCGAAAA T 21
- 15 <210> 12090
<211> 20
<212> ADN
<213> Secuencia Artificial
<220> tratado con bisulfito
- 20 <223> ácido nucleico para análisis de estado de metilación deSEQ ID NO: 7
<400> 12090
ATTTCTTCCT AACCGCGATA 20
<210> 12091
<211> 22
- 25 <212> ADN
<213> Secuencia Artificial
<220> tratado con bisulfito
<223> ácido nucleico para análisis de estado de metilación deSEQ ID NO: 7
<400> 12091
- 30 TTAGGCGTAT TAGTTAGTTC GG 22
<210> 12092
<211> 24
<212> ADN
<213> Secuencia Artificial
- 35 <220> tratado con bisulfito
<223> ácido nucleico para análisis de estado de metilación deSEQ ID NO: 7
<400> 12092

GTTTGAATGA TAAAGTGTTT TTAT 24

<210> 12093

<211> 22

<212> ADN

5 <213> Secuencia Artificial

<220> tratado con bisulfito

<223> ácido nucleico para análisis de estado de metilación deSEQ ID NO: 7

<400> 12093

CTCGATACAA ACCGCTAAAC AC 22

10 <210> 12094

<211> 21

<212> ADN

<213> Secuencia Artificial

<220> tratado con bisulfito

15 <223> ácido nucleico para análisis de estado de metilación deSEQ ID NO: 7

<400> 12094

TCGATACAAA CCGCTAAACA C 21

<210> 12095

<211> 19

20 <212> ADN

<213> Secuencia Artificial

<220> tratado con bisulfito

<223> ácido nucleico para análisis de estado de metilación deSEQ ID NO: 7

<400> 12095

25 CTTCTAACC GCGATAAAA 19

<210> 12096

<211> 23

<212> ADN

<213> Secuencia Artificial

30 <220> tratado con bisulfito

<223> ácido nucleico para análisis de estado de metilación deSEQ ID NO: 7

<400> 12096

GAACACGTCT ACTAATAAC GCC 23

<210> 12097

35 <211> 19

<212> ADN

<213> Secuencia Artificial

ES 2 659 325 T3

- <220> tratado con bisulfito
<223> ácido nucleico para análisis de estado de metilación deSEQ ID NO: 7
<400> 12097
CTCTCGATAC AAACCGCTA 19
- 5 <210> 12098
<211> 24
<212> ADN
<213> Secuencia Artificial
<220> tratado con bisulfito
- 10 <223> ácido nucleico para análisis de estado de metilación deSEQ ID NO: 7
<400> 12098
TATCAAACC TATAACTACG TCCG 24
<210> 12099
<211> 20
- 15 <212> ADN
<213> Secuencia Artificial
<220> tratado con bisulfito
<223> ácido nucleico para análisis de estado de metilación deSEQ ID NO: 7
<400> 12099
- 20 TTCGGAGTTT AAGTCGTTGT 20
<210> 12100
<211> 23
<212> ADN
<213> Secuencia Artificial
- 25 <220> tratado con bisulfito
<223> ácido nucleico para análisis de estado de metilación deSEQ ID NO: 7
<400> 12100
TTTTGGTTTA CGTTCGTTTA TTC 23
<210> 12101
- 30 <211> 20
<212> ADN
<213> Secuencia Artificial
<220> tratado con bisulfito
<223> ácido nucleico para análisis de estado de metilación deSEQ ID NO: 7
- 35 <400> 12101
AAACCGCTAA ACACCTAACG 20
<210> 12102

ES 2 659 325 T3

- <211> 22
<212> ADN
<213> Secuencia Artificial
<220> tratado con bisulfito
- 5 <223> ácido nucleico para análisis de estado de metilación deSEQ ID NO: 7
<400> 12102
TCGTTTATTC GCGTTTGAGT AG 22
<210> 12103
<211> 21
- 10 <212> ADN
<213> Secuencia Artificial
<220> tratado con bisulfito
<223> ácido nucleico para análisis de estado de metilación deSEQ ID NO: 7
<400> 12103
- 15 CGACAAAAAC CTACCGTCTA C 21
<210> 12104
<211> 20
<212> ADN
<213> Secuencia Artificial
- 20 <220> tratado con bisulfito
<223> ácido nucleico para análisis de estado de metilación deSEQ ID NO: 7
<400> 12104
TCGGATCGCG TATAGTTATT 20
<210> 12105
- 25 <211> 17
<212> ADN
<213> Secuencia Artificial
<220> tratado con bisulfito
<223> ácido nucleico para análisis de estado de metilación deSEQ ID NO: 7
- 30 <400> 12105
ATCGAGTAGT CGCGCGT 17
<210> 12106
<211> 16
<212> ADN
- 35 <213> Secuencia Artificial
<220> tratado con bisulfito
<223> ácido nucleico para análisis de estado de metilación deSEQ ID NO: 7

ES 2 659 325 T3

- <400> 12106
GGCGGGAGTC GTAGGG 16
<210> 12107
<211> 21
- 5 <212> ADN
<213> Secuencia Artificial
<220> tratado con bisulfito
<223> ácido nucleico para análisis de estado de metilación deSEQ ID NO: 7
<400> 12107
- 10 AATTTCTTCC TAACCGCGAT A 21
<210> 12108
<211> 22
<212> ADN
<213> Secuencia Artificial
- 15 <220> tratado con bisulfito
<223> ácido nucleico para análisis de estado de metilación deSEQ ID NO: 7
<400> 12108
CTAAAATAAC TATACGCGAT CC 22
<210> 12109
- 20 <211> 21
<212> ADN
<213> Secuencia Artificial
<220> tratado con bisulfito
<223> ácido nucleico para análisis de estado de metilación deSEQ ID NO: 7
- 25 <400> 12109
TCGTTTATTC GCGTTTGAGT A 21
<210> 12110
<211> 21
<212> ADN
- 30 <213> Secuencia Artificial
<220> tratado con bisulfito
<223> ácido nucleico para análisis de estado de metilación deSEQ ID NO: 7
<400> 12110
CGGAGTTTAA GTCGTTGTTT T 21
- 35 <210> 12111
<211> 19
<212> ADN

ES 2 659 325 T3

<213> Secuencia Artificial
<220> tratado con bisulfito
<223> ácido nucleico para análisis de estado de metilación deSEQ ID NO: 7
<400> 12111

5 TTCCTAACCG CGATAAAAA 19
<210> 12112
<211> 19
<212> ADN
<213> Secuencia Artificial

10 <220> tratado con bisulfito
<223> ácido nucleico para análisis de estado de metilación deSEQ ID NO: 7
<400> 12112
CGATCCGAAT TTCTTCCTA 19
<210> 12113

15 <211> 21
<212> ADN
<213> Secuencia Artificial
<220> tratado con bisulfito
<223> ácido nucleico para análisis de estado de metilación deSEQ ID NO: 7

20 <400> 12113
GTATTAGTTA GTTCGGCGGT T 21
<210> 12114
<211> 21
<212> ADN

25 <213> Secuencia Artificial
<220> tratado con bisulfito
<223> ácido nucleico para análisis de estado de metilación deSEQ ID NO: 7
<400> 12114
CGAATCTAAA CAAAACGAA A 21

30 <210> 12115
<211> 19
<212> ADN
<213> Secuencia Artificial
<220> tratado con bisulfito

35 <223> ácido nucleico para análisis de estado de metilación deSEQ ID NO: 7
<400> 12115
GTCGTAGGGG TTGTAGACG 19

ES 2 659 325 T3

- <210> 12116
<211> 16
<212> ADN
<213> Secuencia Artificial
- 5 <220> tratado con bisulfito
<223> ácido nucleico para análisis de estado de metilación deSEQ ID NO: 7
<400> 12116
GGTTTTCGCG CGGGGA 16
- <210> 12117
- 10 <211> 21
<212> ADN
<213> Secuencia Artificial
<220> tratado con bisulfito
<223> ácido nucleico para análisis de estado de metilación deSEQ ID NO: 7
- 15 <400> 12117
TGTCGGGGTA TATTTTTTTA A 21
- <210> 12118
<211> 19
<212> ADN
- 20 <213> Secuencia Artificial
<220> tratado con bisulfito
<223> ácido nucleico para análisis de estado de metilación deSEQ ID NO: 7
<400> 12118
TCTTCCTAAC CGCGATAAA 19
- 25 <210> 12119
<211> 19
<212> ADN
<213> Secuencia Artificial
<220> tratado con bisulfito
- 30 <223> ácido nucleico para análisis de estado de metilación deSEQ ID NO: 7
<400> 12119
TTTCTTCCTA ACCGCGATA 19
- <210> 12120
<211> 24
- 35 <212> ADN
<213> Secuencia Artificial
<220> tratado con bisulfito

ES 2 659 325 T3

- <223> ácido nucleico para análisis de estado de metilación deSEQ ID NO: 7
<400> 12120
ATCTAAAATA ACTATACGCG ATCC 24
<210> 12121
- 5 <211> 21
<212> ADN
<213> Secuencia Artificial
<220> tratado con bisulfito
<223> ácido nucleico para análisis de estado de metilación deSEQ ID NO: 7
- 10 <400> 12121
GGTTTACGTT CGTTTATTCG C 21
<210> 12122
<211> 20
<212> ADN
- 15 <213> Secuencia Artificial
<220> tratado con bisulfito
<223> ácido nucleico para análisis de estado de metilación deSEQ ID NO: 7
<400> 12122
CGGATCGCGT ATAGTTATTT 20
- 20 <210> 12123
<211> 22
<212> ADN
<213> Secuencia Artificial
<220> tratado con bisulfito
- 25 <223> ácido nucleico para análisis de estado de metilación deSEQ ID NO: 7
<400> 12123
GATTCGGAGT TTAAGTCGTT GT 22
<210> 12124
<211> 22
- 30 <212> ADN
<213> Secuencia Artificial
<220> tratado con bisulfito
<223> ácido nucleico para análisis de estado de metilación deSEQ ID NO: 7
<400> 12124
- 35 TTCGTTTATT CGCGTTTGAG TA 22
<210> 12125
<211> 20

ES 2 659 325 T3

- <212> ADN
<213> Secuencia Artificial
<220> tratado con bisulfito
<223> ácido nucleico para análisis de estado de metilación deSEQ ID NO: 7
- 5 <400> 12125
AGTCGTAGGG GTTGTAGACG 20
<210> 12126
<211> 19
<212> ADN
- 10 <213> Secuencia Artificial
<220> tratado con bisulfito
<223> ácido nucleico para análisis de estado de metilación deSEQ ID NO: 7
<400> 12126
AGGTTTTTGT CGGGGTATA 19
- 15 <210> 12127
<211> 21
<212> ADN
<213> Secuencia Artificial
<220> tratado con bisulfito
- 20 <223> ácido nucleico para análisis de estado de metilación deSEQ ID NO: 7
<400> 12127
TGGTTTACGT TCGTTTATTC G 21
<210> 12128
<211> 21
- 25 <212> ADN
<213> Secuencia Artificial
<220> tratado con bisulfito
<223> ácido nucleico para análisis de estado de metilación deSEQ ID NO: 7
<400> 12128
- 30 GCGAACACGT CTA C T A A C T A A 21
<210> 12129
<211> 19
<212> ADN
<213> Secuencia Artificial
- 35 <220> tratado con bisulfito
<223> ácido nucleico para análisis de estado de metilación deSEQ ID NO: 7
<400> 12129

GTTCGTTTAT TCGCGTTTG 19

<210> 12130 a <210> 14553

000

<210> 14554

5 <211> 20

<212> ADN

<213> Secuencia Artificial

<220>

<223> ADN genómico tratado químicamente (Homo sapiens)

10 <400> 14554

tgagagagag agggtgaaa 20

<210> 14555

<211> 24

<212> ADN

15 <213> Secuencia Artificial

<220>

<223> ADN genómico tratado químicamente (Homo sapiens)

<400> 14555

tctaaataac aaaatacctc catt 24

20 <210> 14556

<211> 16

<212> ADN

<213> Secuencia Artificial

<220>

25 <223> ADN genómico tratado químicamente (Homo sapiens)

<400> 14556

cgacccgcca accgac 16

<210> 14557

<211> 15

30 <212> ADN

<213> Secuencia Artificial

<220>

<223> ADN genómico tratado químicamente (Homo sapiens)

<400> 14557

35 cgccgaaacg cgctc 15

<210> 14558

<211> 27

<212> ADN
 <213> Secuencia Artificial
 <220>
 <223> ADN genómico tratado químicamente (Homo sapiens)
 5 <400> 14558
 ccattaccaa cacaaccac caaccaa 27
 <210> 14559 a <210> 14614
 000
 <210> 14615
 10 <211> 16
 <212> ADN
 <213> Secuencia Artificial
 <220>
 <223> ADN genómico tratado químicamente (Homo sapiens)
 15 <400> 14615
 ggttgggat gttgt 16
 <210> 14616
 <211> 24
 <212> ADN
 20 <213> Secuencia Artificial
 <220>
 <223> ADN genómico tratado químicamente (Homo sapiens)
 <400> 14616
 tctaaataac aaaatacctc catt 24
 25 <210> 14617
 <211> 27
 <212> ADN
 <213> Secuencia Artificial
 <220>
 30 <223> ADN genómico tratado químicamente (Homo sapiens)
 <400> 14617
 ccattaccaa cacaaccac caaccaa 27
 <210> 14618
 <211> 20
 35 <212> ADN
 <213> Secuencia Artificial
 <220>

ES 2 659 325 T3

<223> ADN genómico tratado químicamente (Homo sapiens)

<400> 14618

ggtcgcggtg agagagagag 20

<210> 14619

5 <211> 21

<212> ADN

<213> Secuencia Artificial

<220>

<223> ADN genómico tratado químicamente (Homo sapiens)

10 <400> 14619

tgaaattaga gcgcgtttcg g 21

<210> 14620 a <210> 14624

000

REIVINDICACIONES

1. Un método para detectar trastornos proliferativos de células de colon en un sujeto que comprende poner en contacto ADN genómico aislado de una muestra biológica obtenida del sujeto con al menos un reactivo o una serie de reactivos que distingue entre dinucleótidos CpG metilados y no metilados en al menos un región objetivo del ADN genómico, en donde la región objetivo comprende o hibrida bajo condiciones rigurosas con al menos 16 nucleótidos contiguos del gen o una secuencia de NGFR y en donde dichos nucleótidos contiguos comprenden al menos una secuencia de dinucleótido CpG, en donde la hipermetilación indica la presencia de un trastorno proliferativo de células de colon.
2. El método de la reivindicación 1, en donde la muestra biológica es plasma sanguíneo, suero sanguíneo, sangre entera, células sanguíneas aisladas, células aisladas de la sangre.
3. El método de la reivindicación 1, en donde al menos uno de tejido de carcinoma colorrectal o adenomas de colon se distingue de al menos un tejido seleccionado del grupo que consiste en tejido de colon inflamatorio, tejido de colon normal, tejido sano no de colon, linfocitos de sangre periférica, y tejido de cáncer no de colon, y en donde la región objetivo comprende, o hibrida bajo condiciones rigurosas con al menos 16 nucleótidos contiguos de la secuencia SEQ ID NO: 7, y complementos de la misma.
4. Un método para detectar trastornos proliferativos de células de colon en un sujeto que comprende determinar el nivel de expresión del gen o secuencia de NGFR, en una muestra biológica aislada de dicho sujeto, en donde dicho nivel de expresión se determina detectando la presencia, ausencia o nivel de ARNm transcrito de dicho gen o secuencia, o en donde dicho nivel de expresión se determina detectando la presencia, ausencia o nivel de un polipéptido codificado por dicho gen o secuencia, o en donde dicha expresión se determina detectando la presencia o ausencia de metilación de CpG dentro de dicho gen o secuencia, en donde la hipermetilación indica la presencia de un trastorno proliferativo de células de colon.
5. Un método de acuerdo con cualquiera de las reivindicaciones 1 a 4, que comprende:
 - a) extraer o de otra manera aislar ADN genómico de una muestra biológica obtenida del sujeto
 - b) tratar el ADN genómico de a), o un fragmento del mismo, con uno o más reactivos para convertir las bases de citosina que no están metiladas en la posición 5 del mismo en uracilo;
 - c) 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 que es complementaria a, o hibrida bajo condiciones moderadamente rigurosas o rigurosas con una secuencia seleccionada del grupo que consiste en las SEQ ID NOs: 316, 317, 432, 433 y sus complementos, en donde 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 o ausencia de, o en una propiedad de dicho amplificado, el estado de metilación de al menos un dinucleótido CpG de la secuencia SEQ ID NO: 7, o un promedio, o un valor que refleja un estado de metilación promedio de una pluralidad de dinucleótidos CpG de la secuencia de SEQ ID NO: 7.
6. El método de la reivindicación 5, en donde tratar el ADN genómico, o el fragmento del mismo en b), comprende el uso de un reactivo seleccionado del grupo que consiste en bisulfito, hidrogenosulfito, disulfito y combinaciones de los mismos.
7. El método de la reivindicación 6, que comprende adicionalmente en la etapa d) el uso de al menos una molécula de ácido nucleico o molécula de ácido nucleico peptídico que comprende en cada caso una secuencia contigua de al menos 9 nucleótidos de longitud que es complementaria a, o se hibrida bajo condiciones moderadamente rigurosas o rigurosas con una secuencia seleccionada del grupo que consiste en SEQ ID NOs: 316, 317, 432, 433 y complementos de las mismas, en donde dicha molécula de ácido nucleico o molécula de ácido nucleico peptídico suprime la amplificación del ácido nucleico al que se hibrida .
8. El método de la reivindicación 6, en donde la determinación en d) comprende la hibridación de al menos una molécula de ácido nucleico o molécula de ácido nucleico peptídico que comprende en cada caso una secuencia contigua de al menos 9 nucleótidos de longitud que es complementaria a, o hibrida bajo condiciones moderadamente rigurosas. o rigurosas con una secuencia seleccionada del grupo que consiste en las SEQ ID NOs: 316, 317, 432, 433 y sus complementos.
9. Un método para detectar trastornos proliferativos de células de colon en un sujeto, que comprende:
 - a) proporcionar una muestra biológica que se ha obtenido de un sujeto y que contiene ADN genómico del sujeto;
 - b) extraer, o de otro modo aislar el ADN genómico;

- 5 c) poner en contacto el ADN genómico de b), o un fragmento del mismo, que comprende al menos 16 nucleótidos contiguos de una secuencia de SEQ ID NO: 7 y secuencias que se hibridan bajo condiciones rigurosas a ella, con una o más enzimas de restricción sensibles a la metilación, en donde el ADN genómico, con respecto a cada motivo de reconocimiento de escisión del mismo, o bien se escinde para producir fragmentos de escisión, o bien no se escinde; y
- d) determinar, con base a la presencia o ausencia de, o en la propiedad de al menos uno de tales fragmentos de escisión, el estado de metilación de al menos un dinucleótido CpG de la secuencia de SEQ ID NO: 7, o un promedio, o un valor que refleje un estado de metilación promedio de una pluralidad de dinucleótidos CpG de la secuencia de SEQ ID NO: 7,
- 10 en donde la hipermetilación indica la presencia de un trastorno proliferativo de células de colon o permite distinguir entre o en medio de los trastornos proliferativos de células de colon.
10. Uso de un ácido nucleico derivado de la SEQ ID NO: 7 para detectar trastornos proliferativos de células de colon, en donde al menos una base de citosina no metilada de la secuencia de ADN genómico se convierte en uracilo.
- 15 11. El uso de la reivindicación 10, en donde el ácido nucleico comprende al menos 16 nucleótidos contiguos de una secuencia de ADN seleccionada del grupo que consiste en las SEQ ID NOs: 316, 317, 432, 433 y secuencias complementarias a las mismas.
12. El uso de la reivindicación 10, en donde el ácido nucleico comprende una secuencia de al menos 9 nucleótidos contiguos que es complementaria a, o hibrida bajo condiciones moderadamente rigurosas o rigurosas con una secuencia de ADN seleccionada del grupo que consiste en las SEQ ID NOs: 316, 317, 432, 433.
- 20 13. El uso de las reivindicaciones 10 a 12, en donde la secuencia de bases contigua del ácido nucleico comprende al menos una secuencia de dinucleótido CpG, TpG o CpA.
14. Uso de un kit para detectar trastornos proliferativos de células de colon de un sujeto, comprendiendo el kit:
- una enzima de restricción sensible a la metilación; y
- 25 - al menos una molécula de ácido nucleico o molécula de ácido nucleico peptídico, que comprende una secuencia contigua de al menos 16 nucleótidos que son complementarios a, o hibridan bajo condiciones moderadamente rigurosas o rigurosas con la secuencia de SEQ ID NO: 7 y complementos de la misma.
15. Uso de un kit útil para detectar trastornos proliferativos de células de colon de un sujeto, comprendiendo el kit:
- un reactivo de bisulfito; y
- 30 - al menos una molécula de ácido nucleico o molécula de ácido nucleico peptídico, que comprende una secuencia contigua de al menos 16 nucleótidos que es complementario a, o hibridiza bajo condiciones moderadamente rigurosas o rigurosas con la secuencia seleccionada del grupo que consiste en SEQ ID NOs: 316 , 317, 432, 433, y complementos de las mismas.

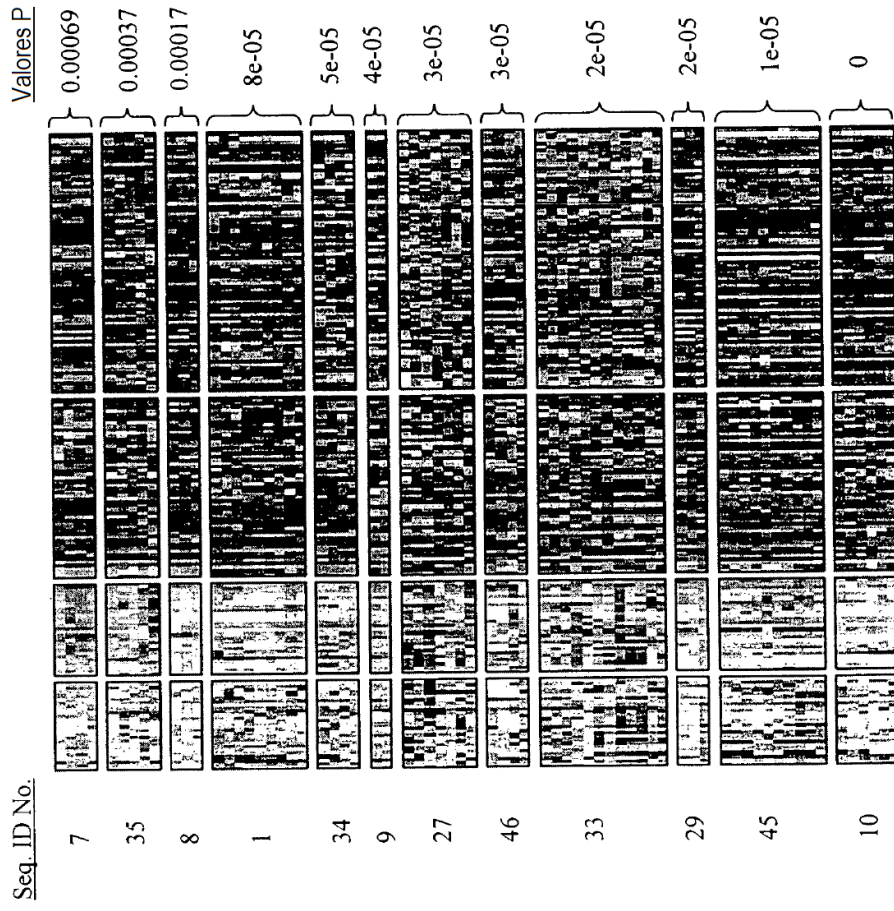


Figura 1

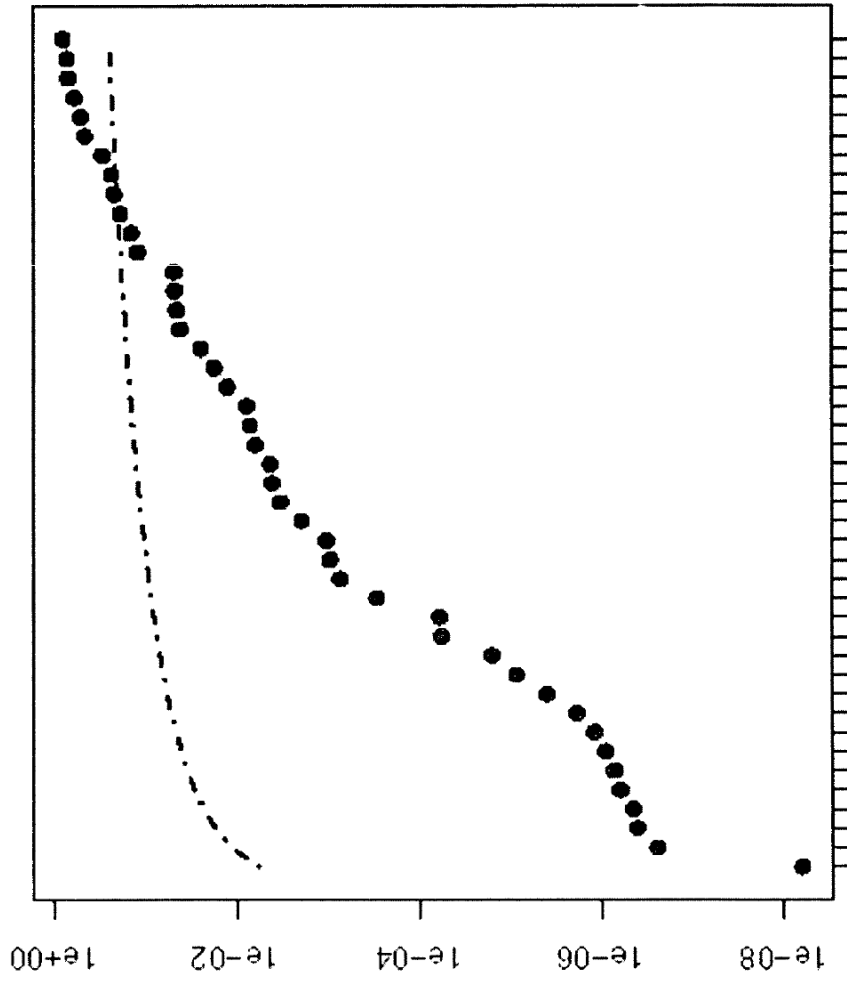


Figura 2

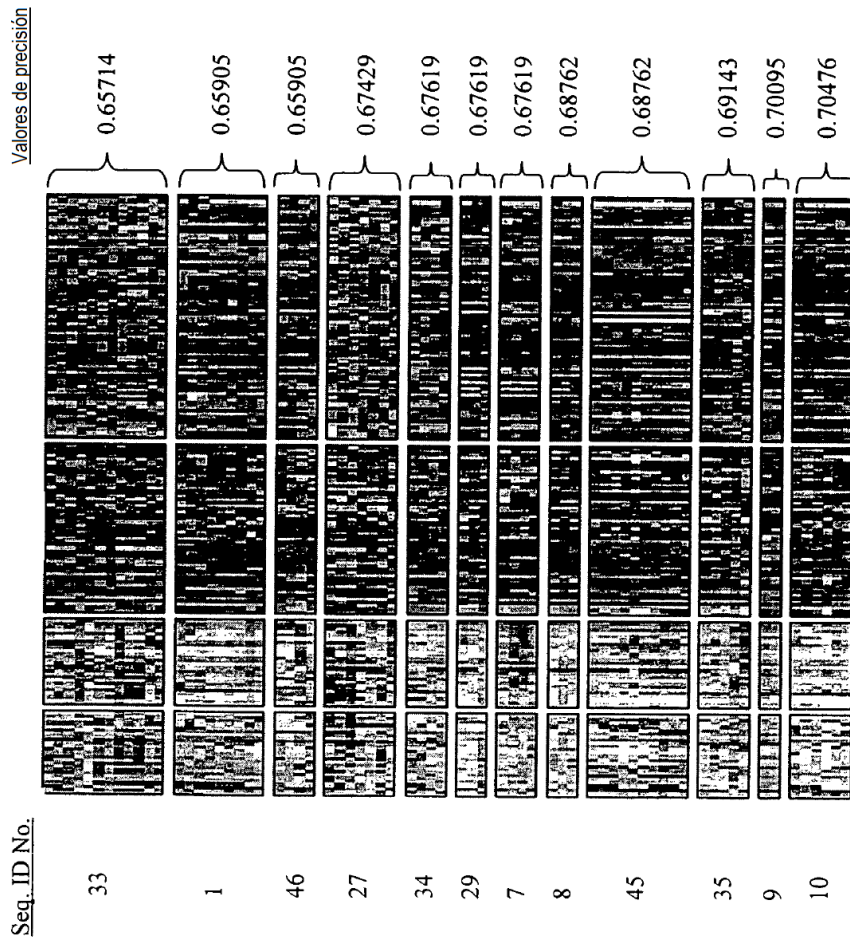


Figura 3

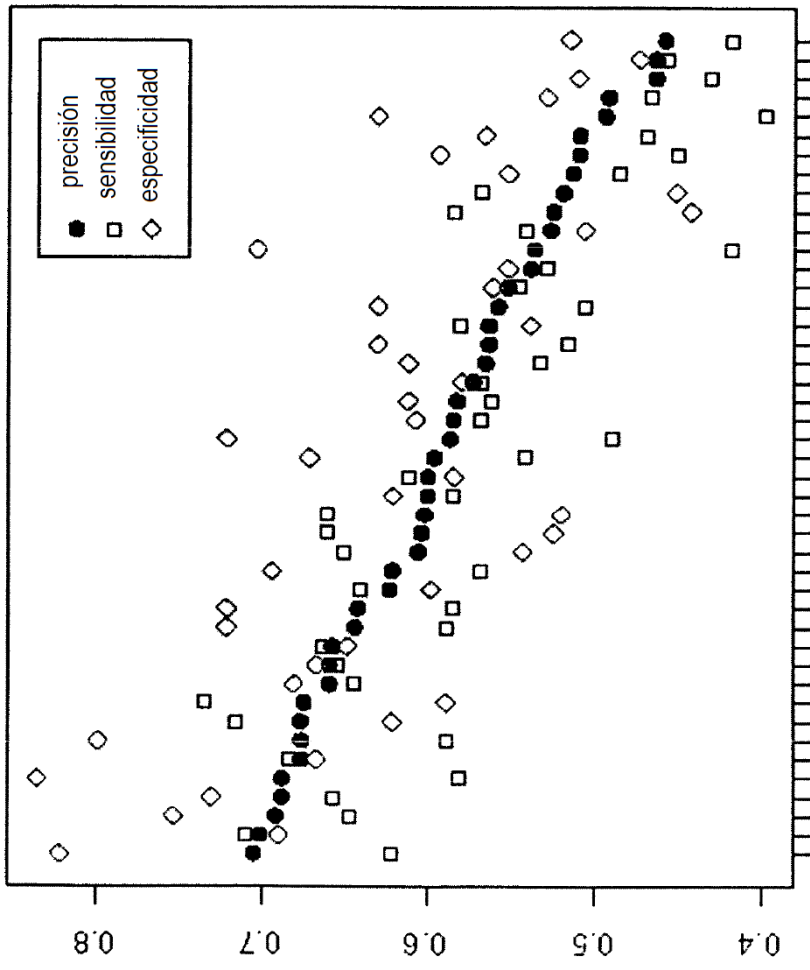


Figura 4

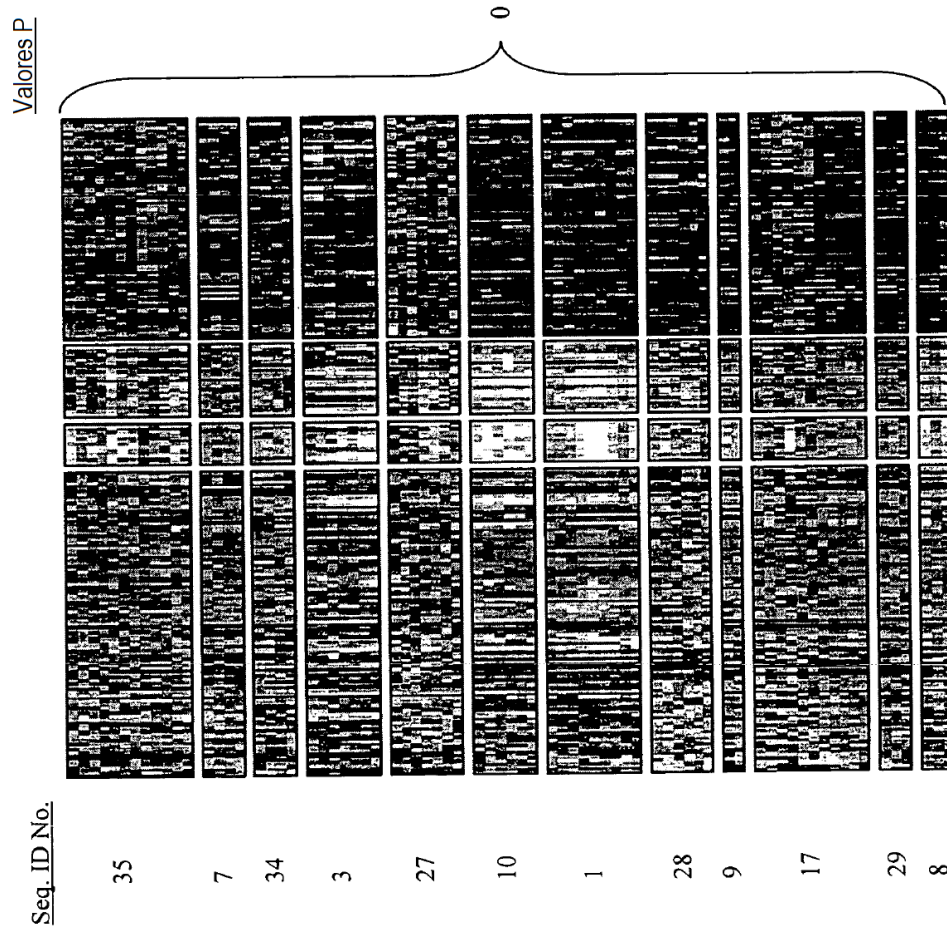


Figura 5

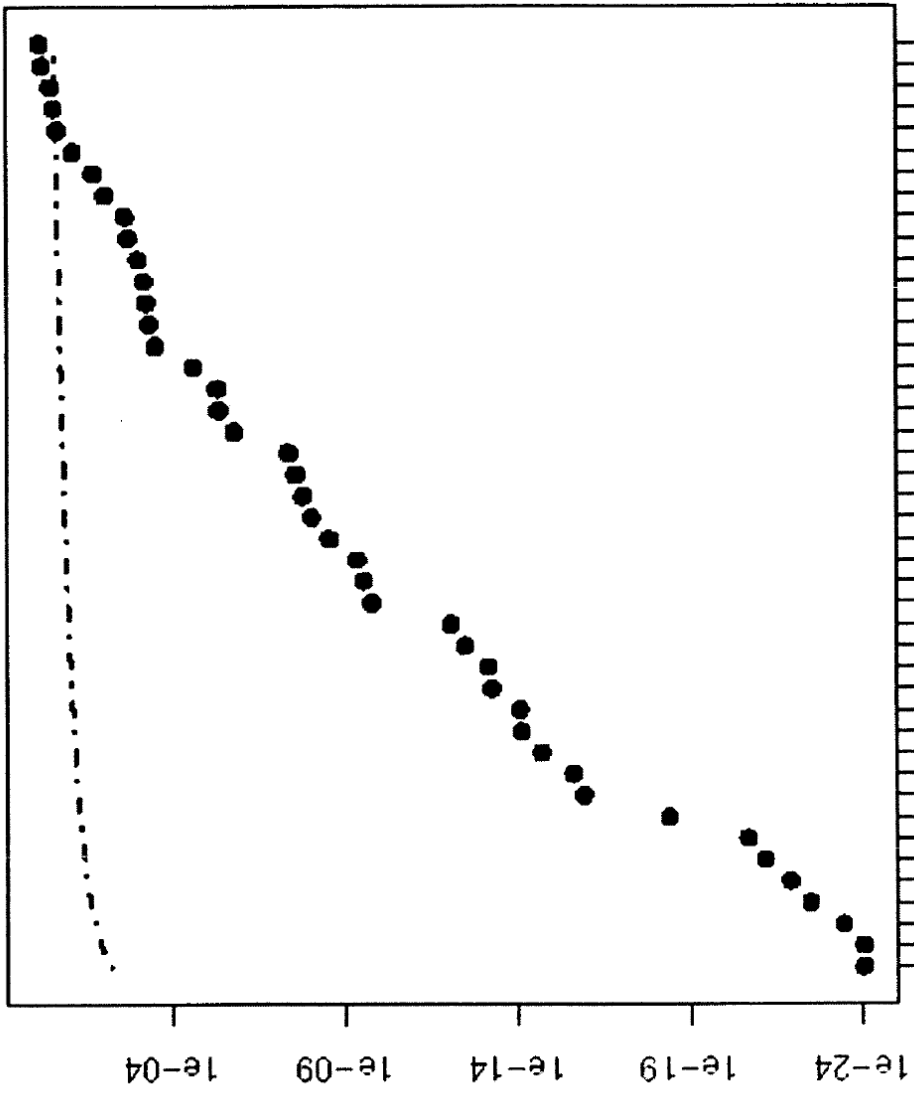


Figura 6

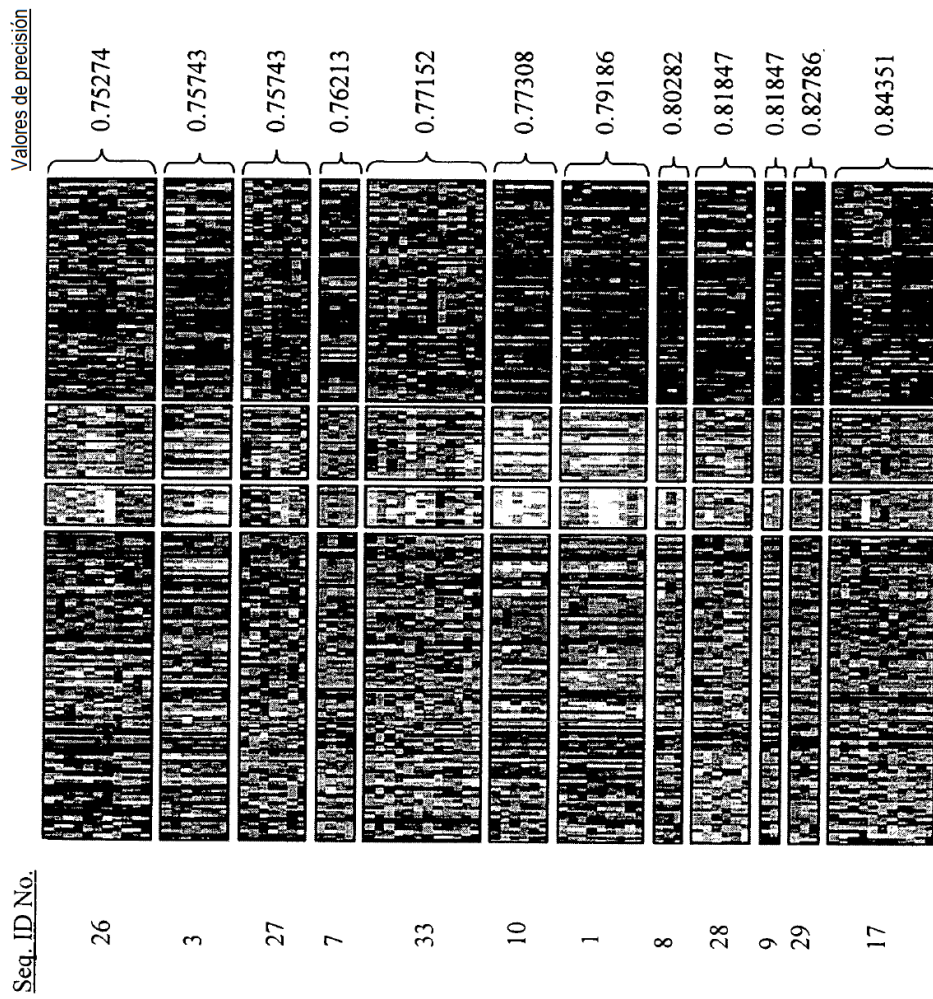


Figura 7

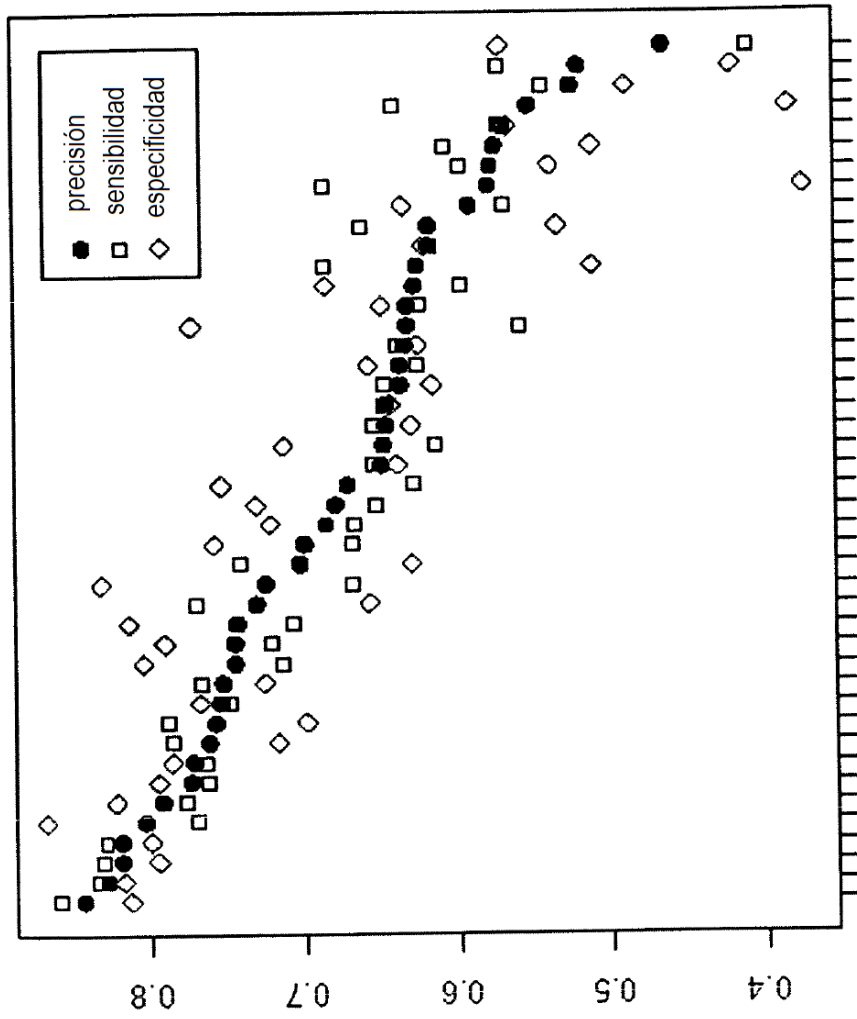


Figura 8

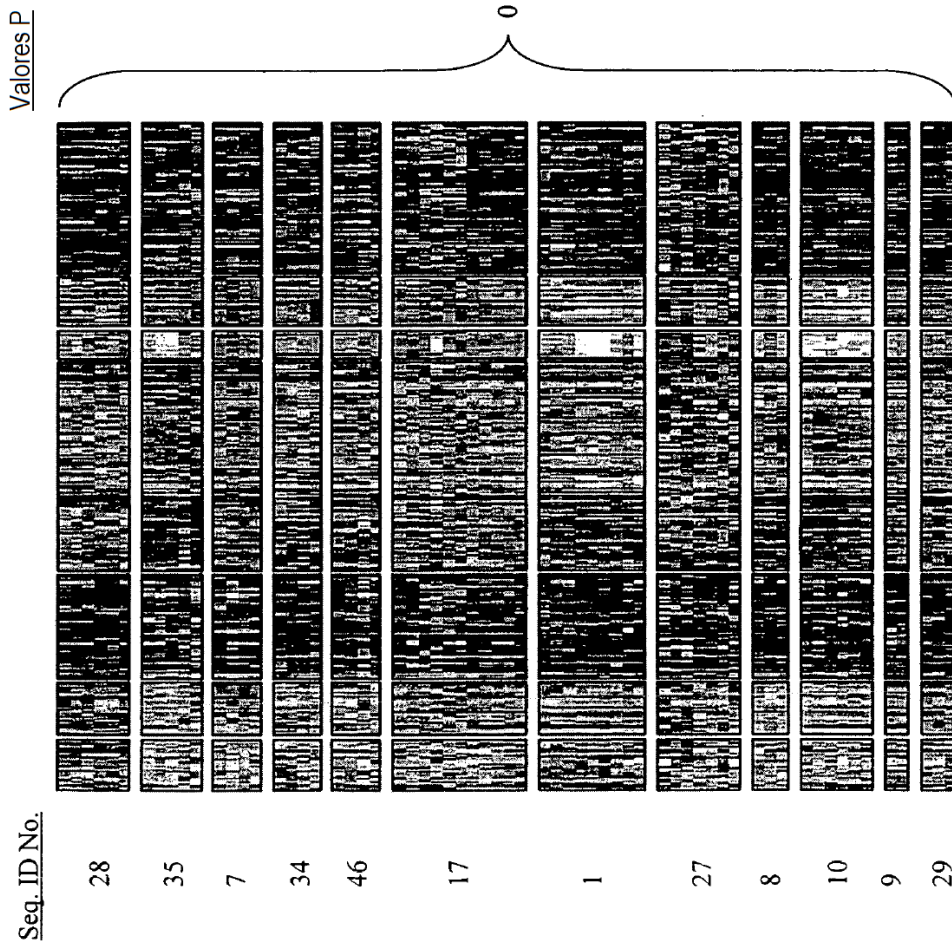


Figura 9

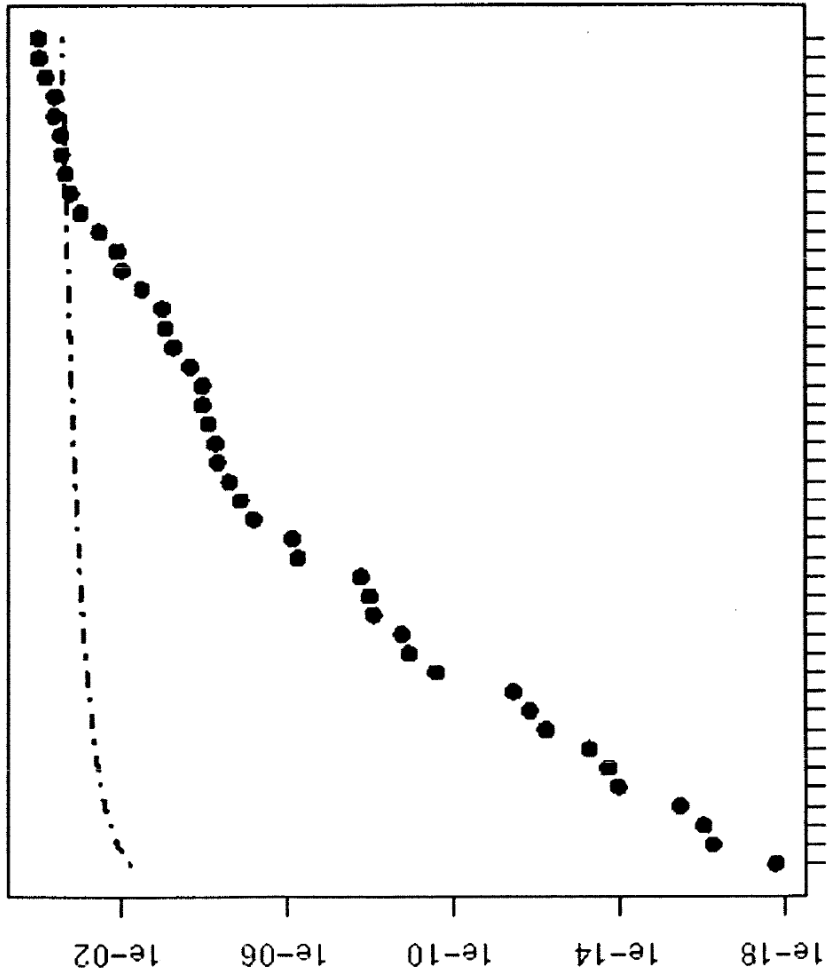


Figura : 10

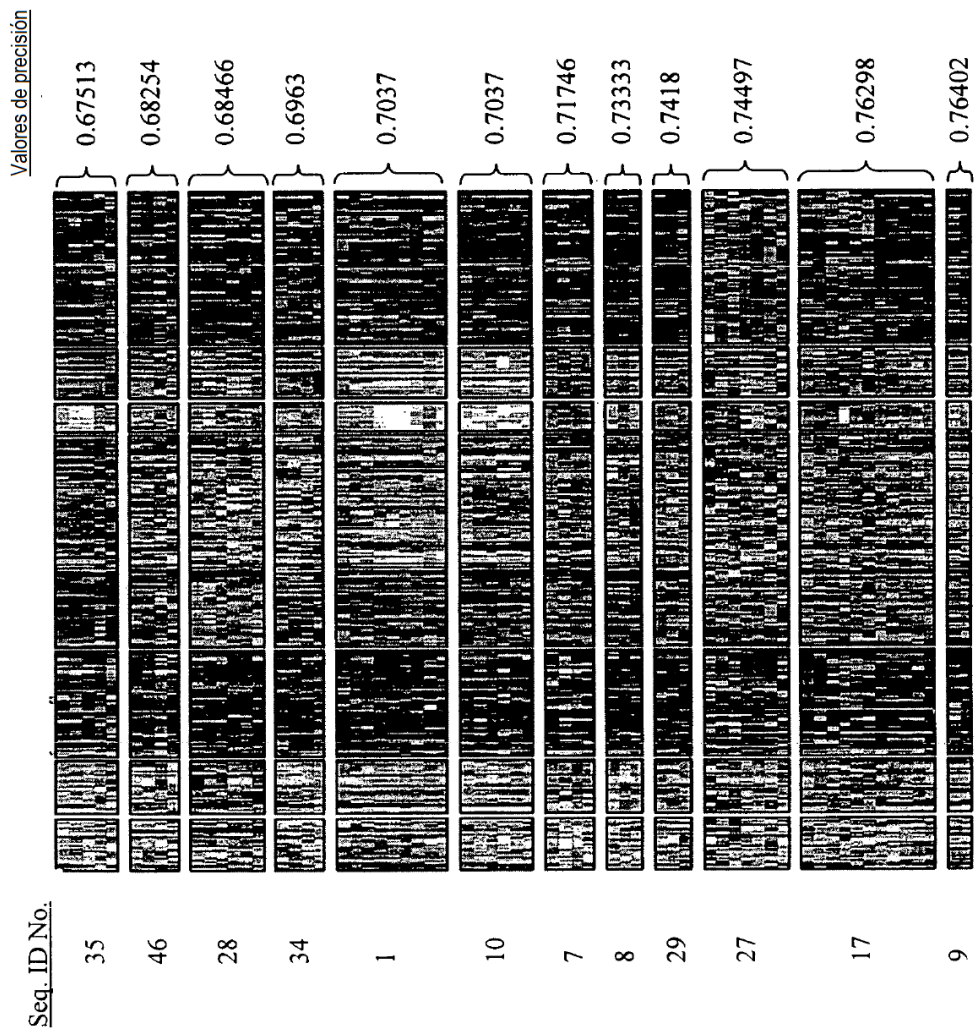


Figura 11

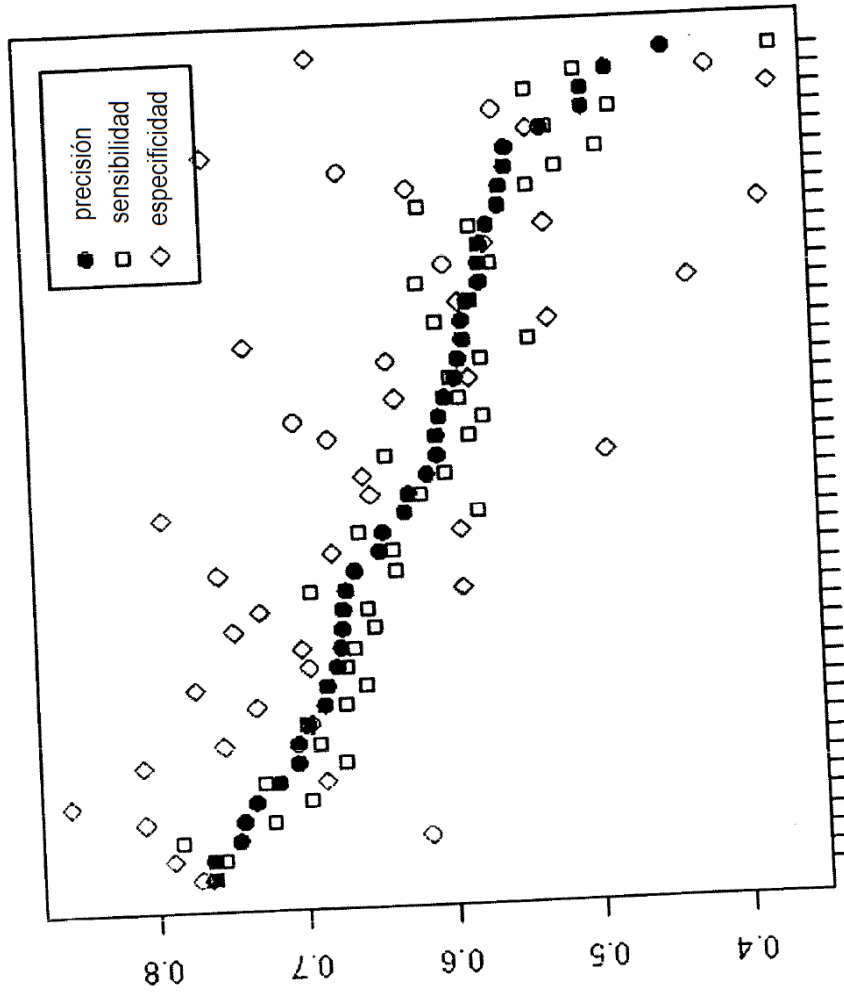


Figura .12

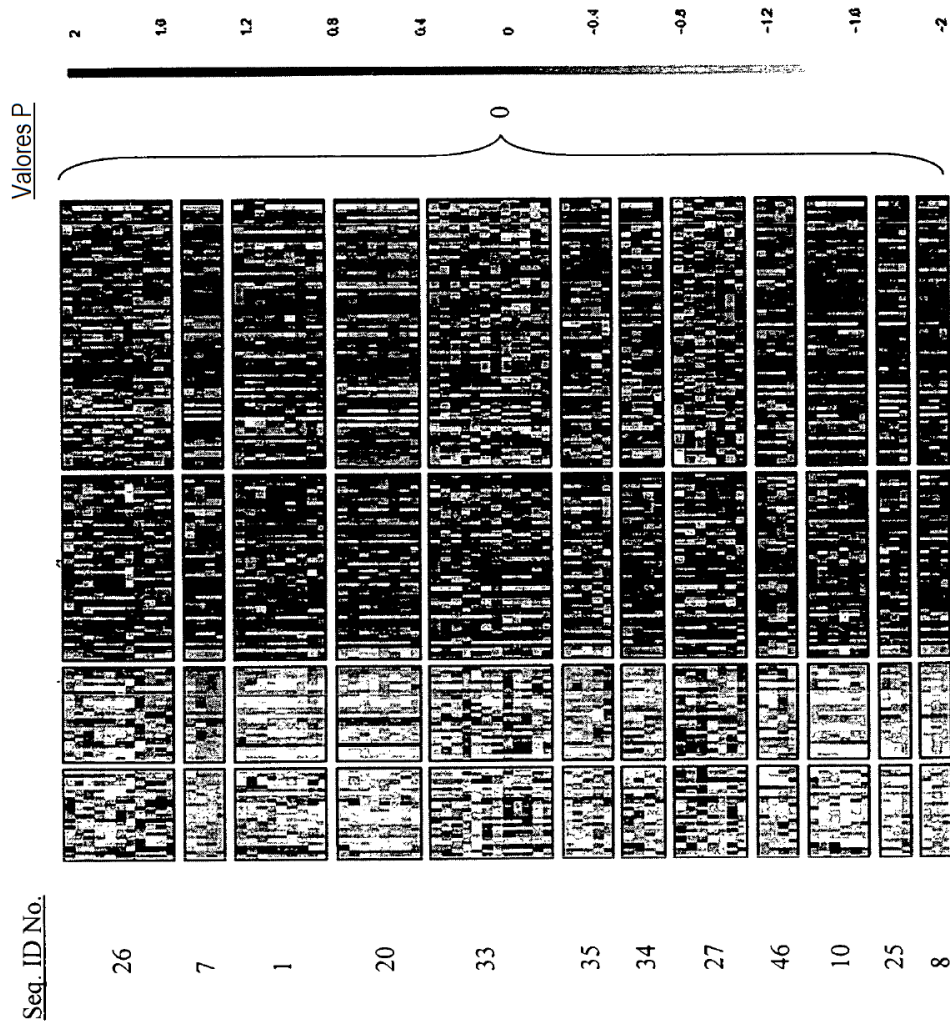


Figura 16

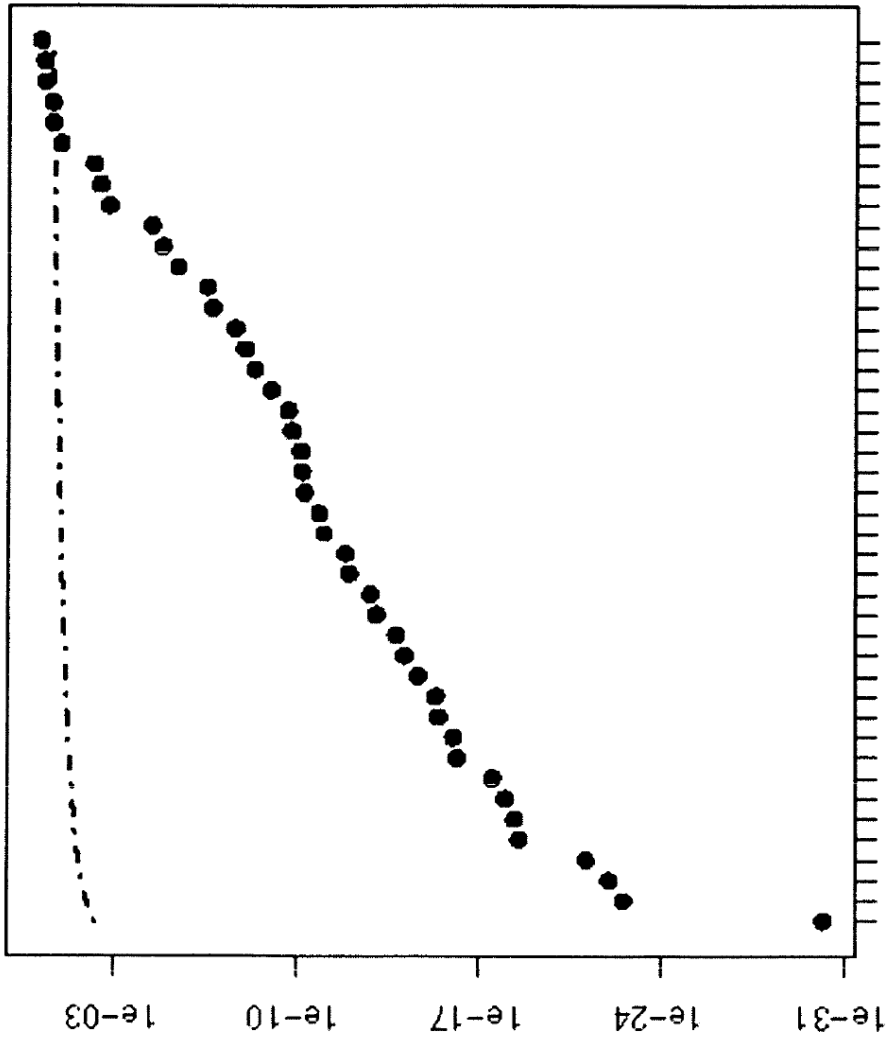


Figura 17

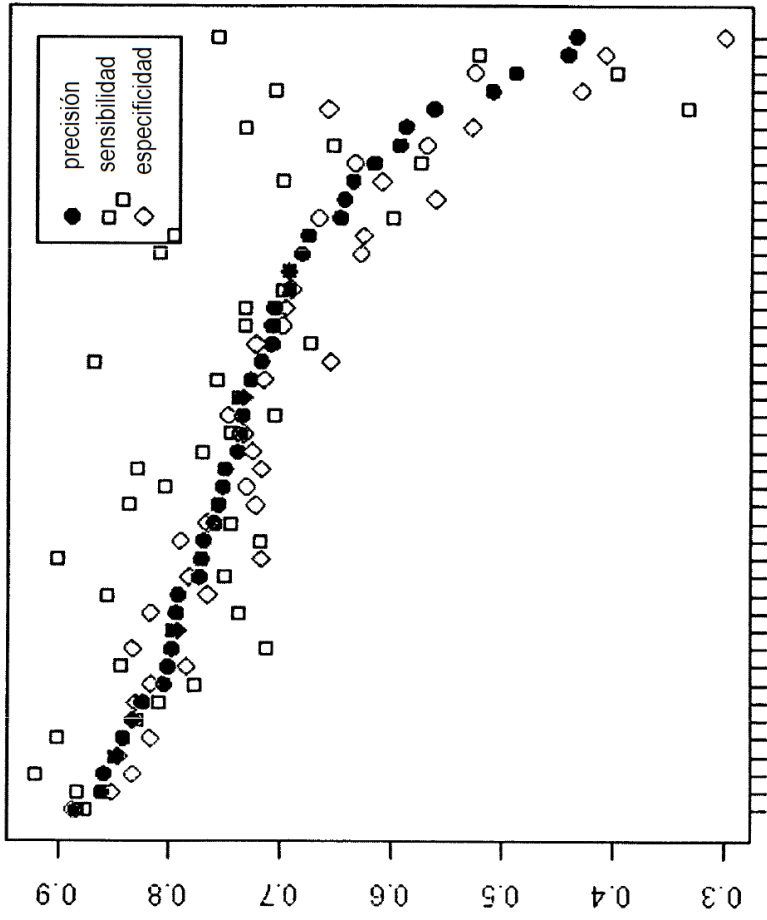


Figura 19

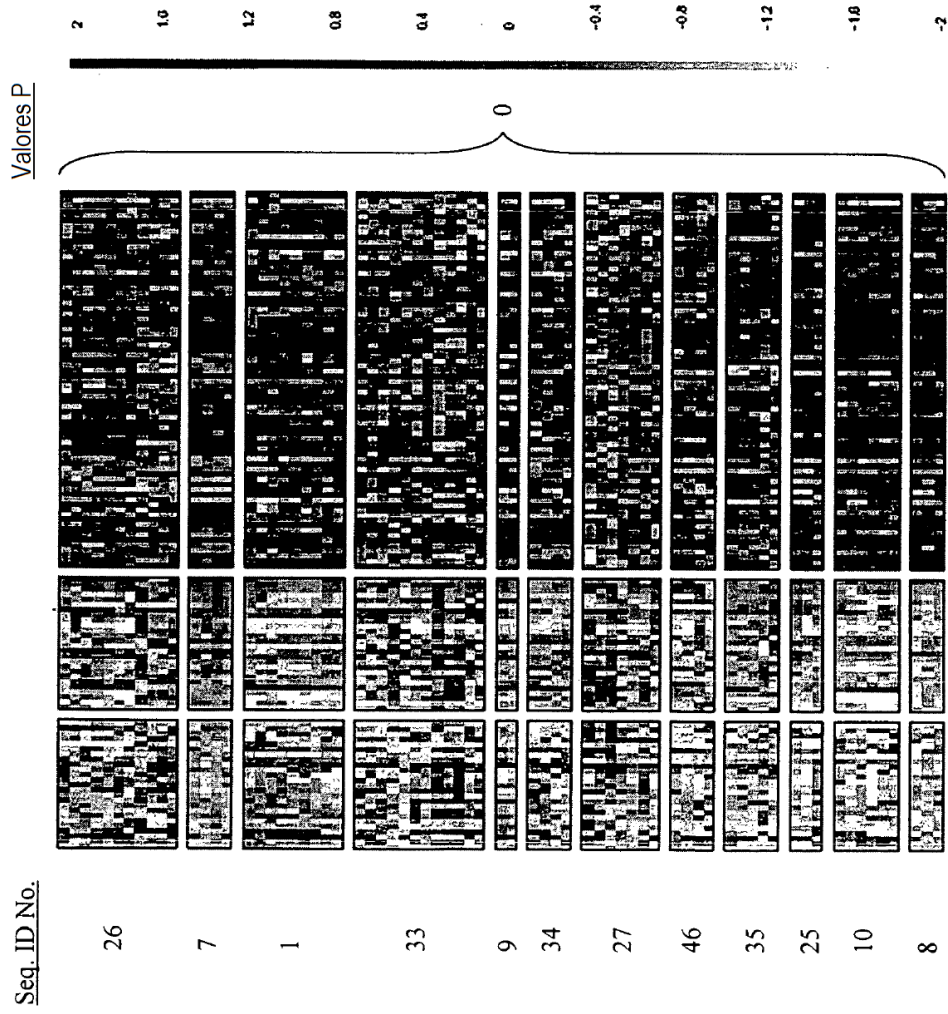


Figura 20

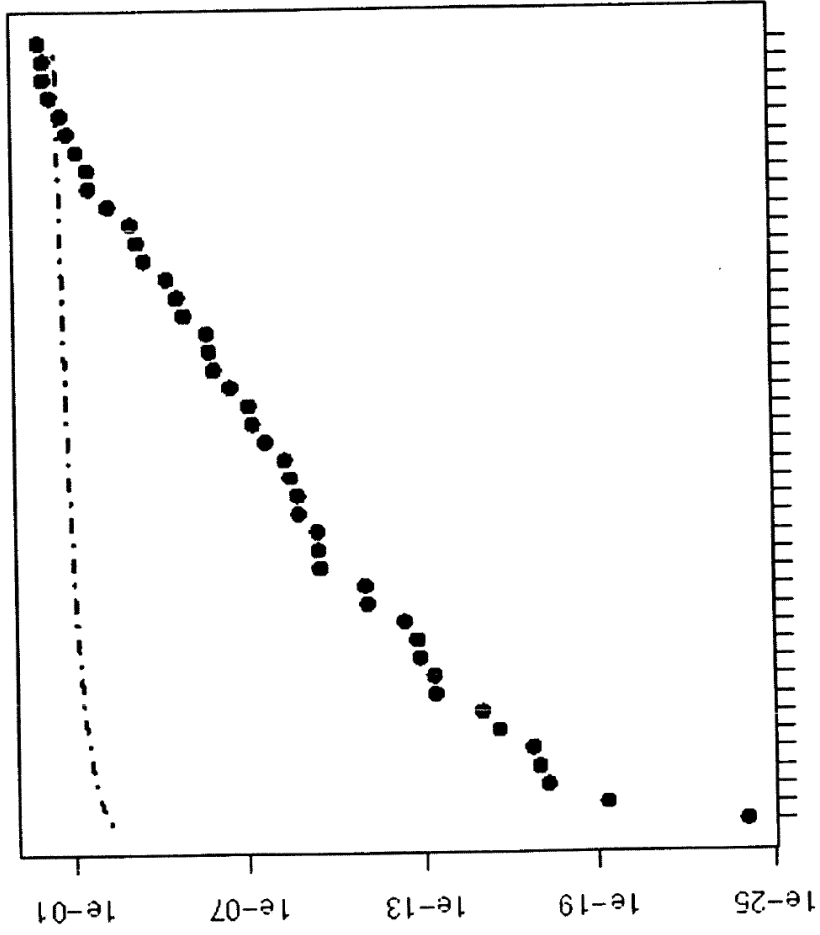


Figura 21

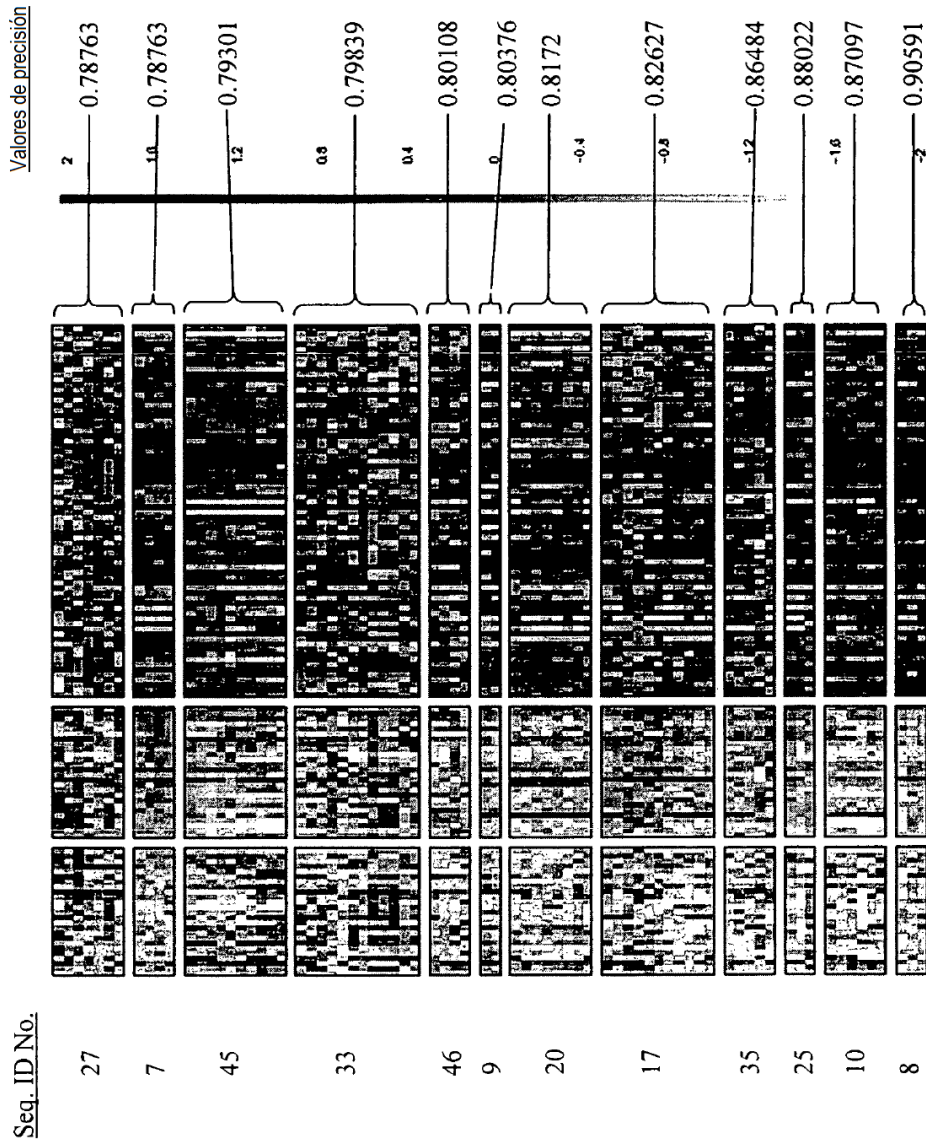


Figura 22

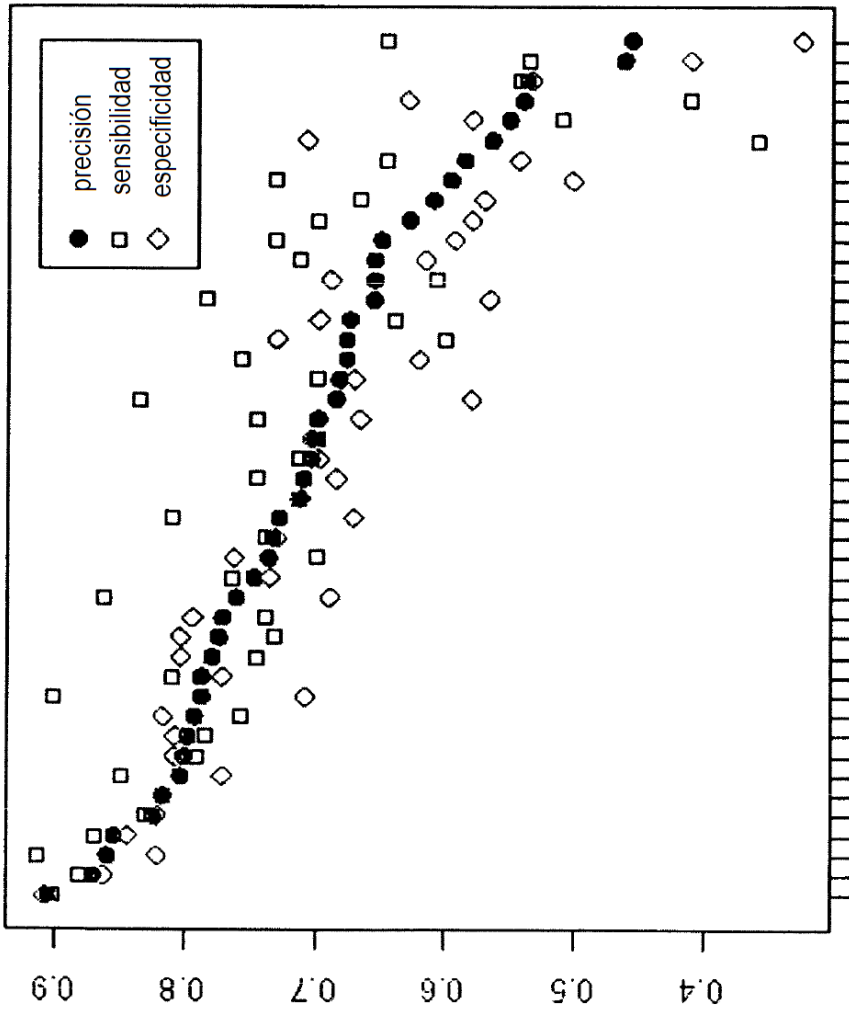


Figura 23

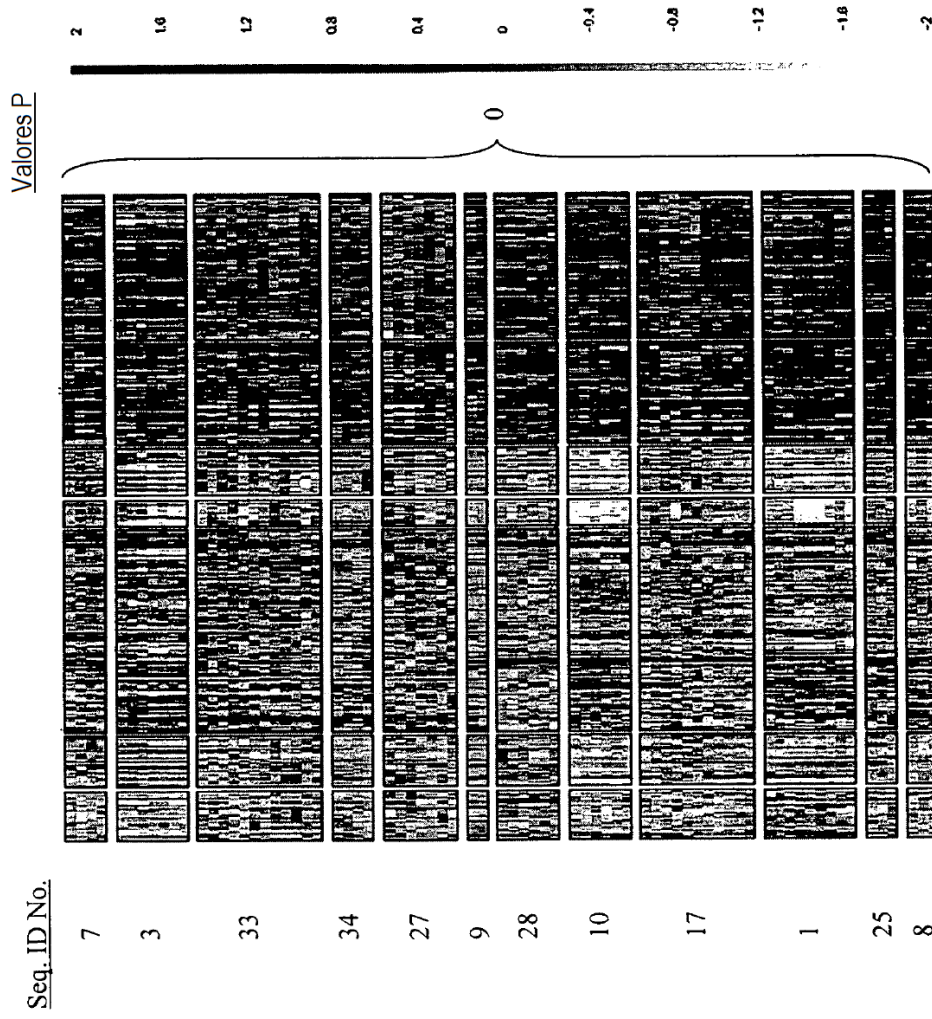


Figura 24

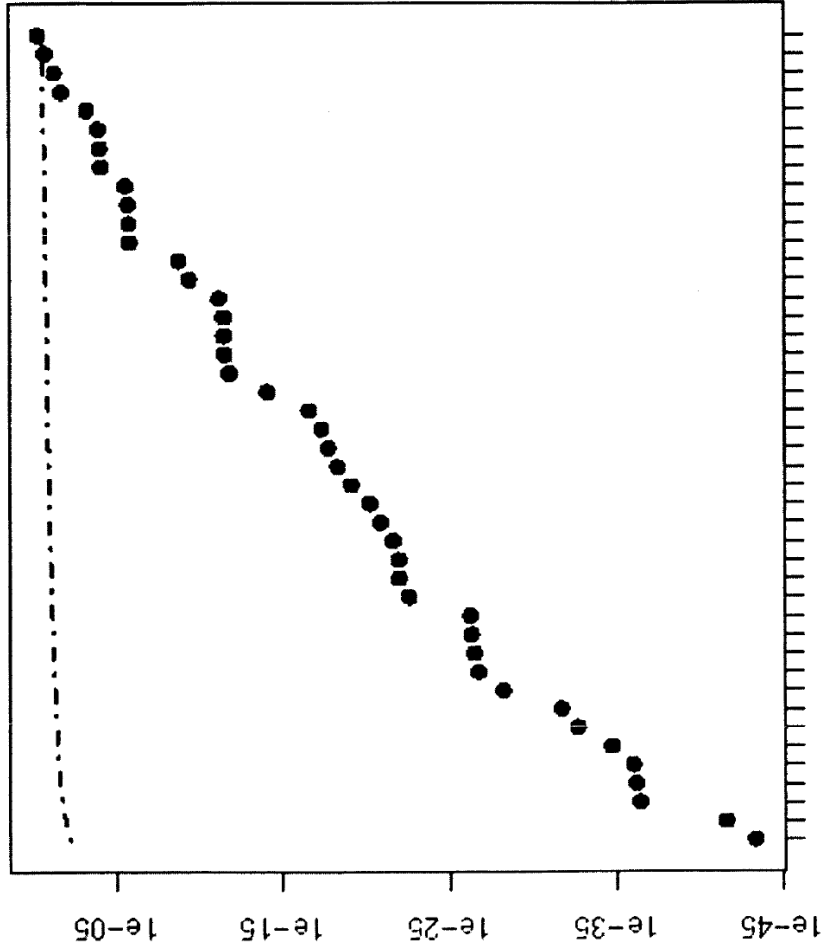


Figura : 25

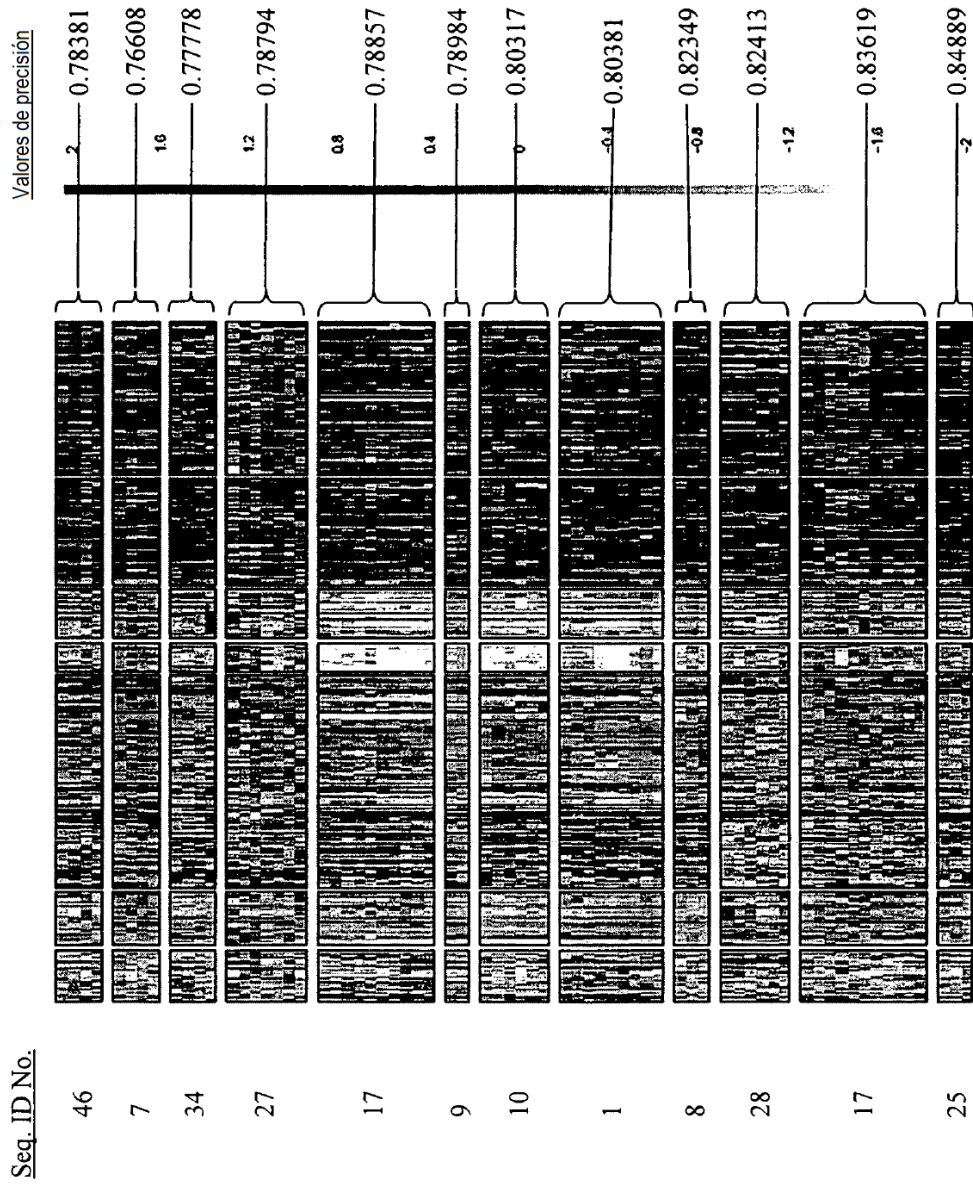


Figura 26

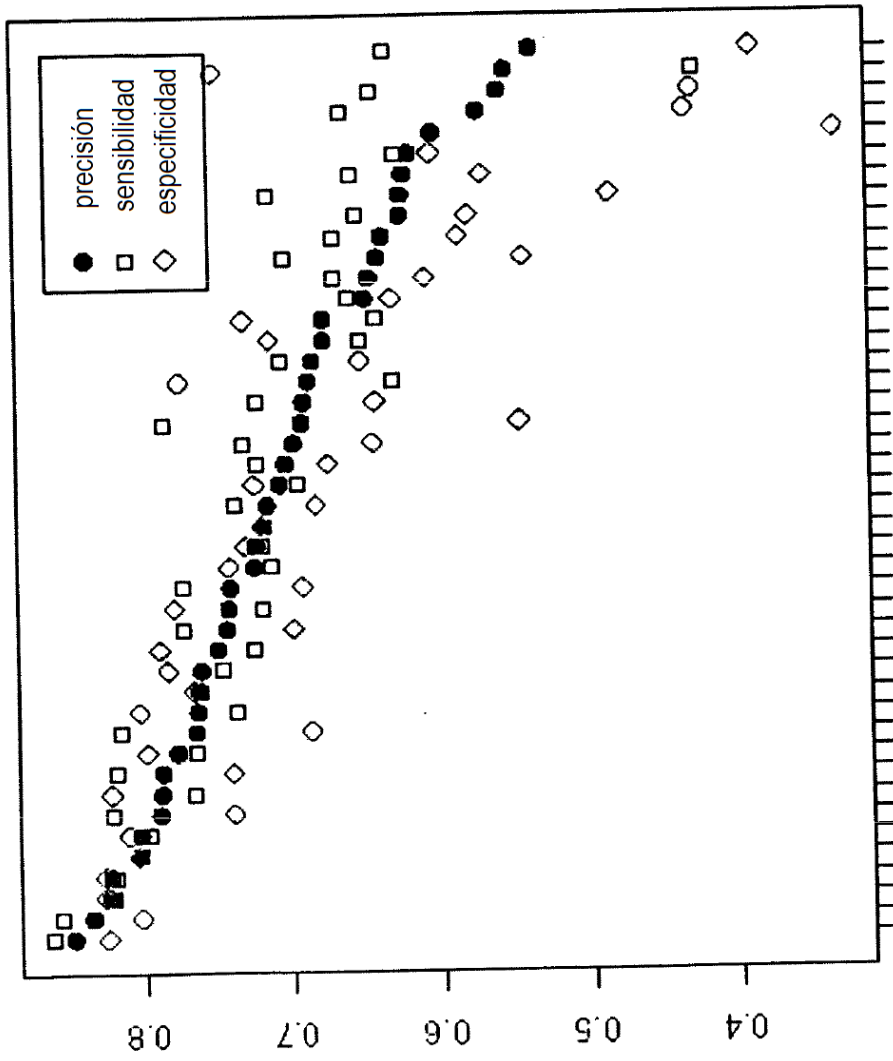


Figura 27

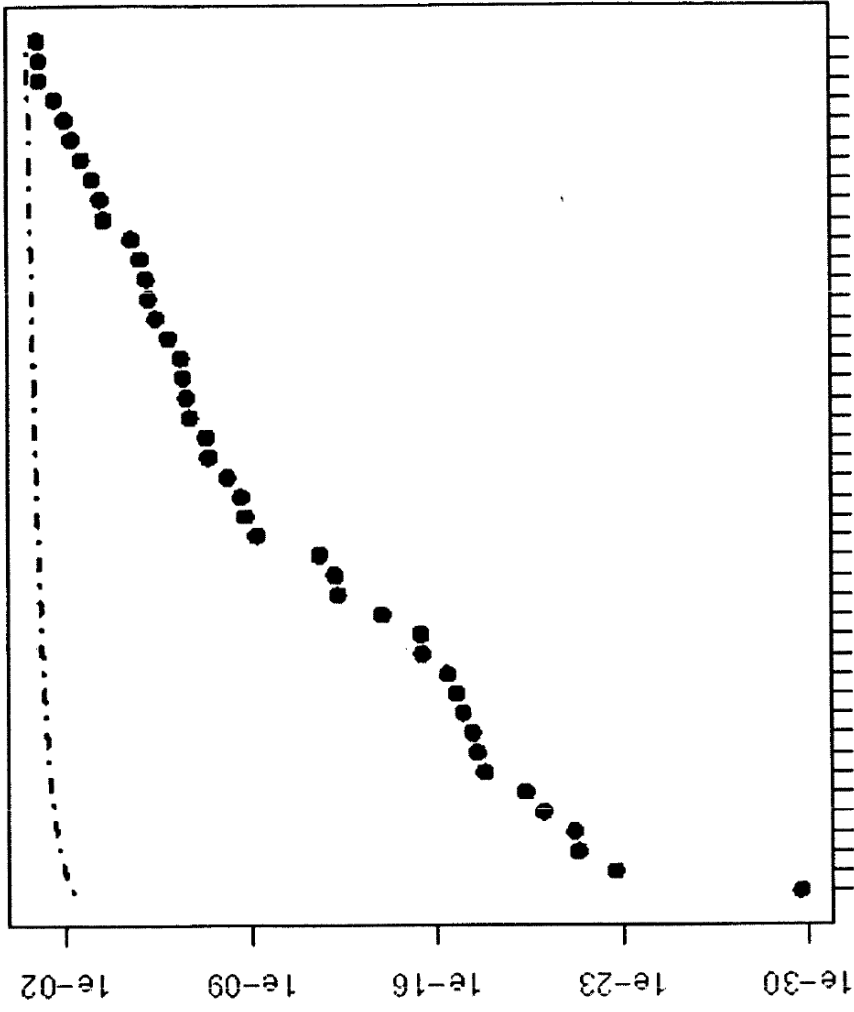


Figura 29

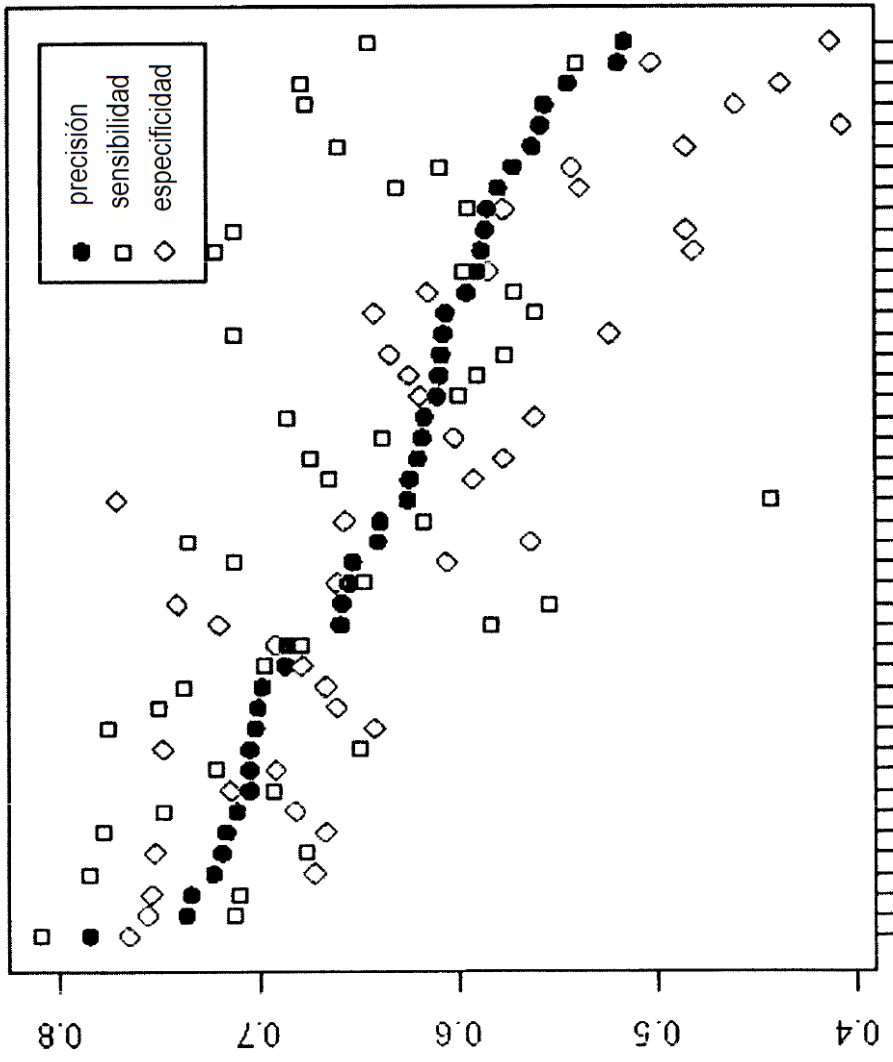


Figura 31

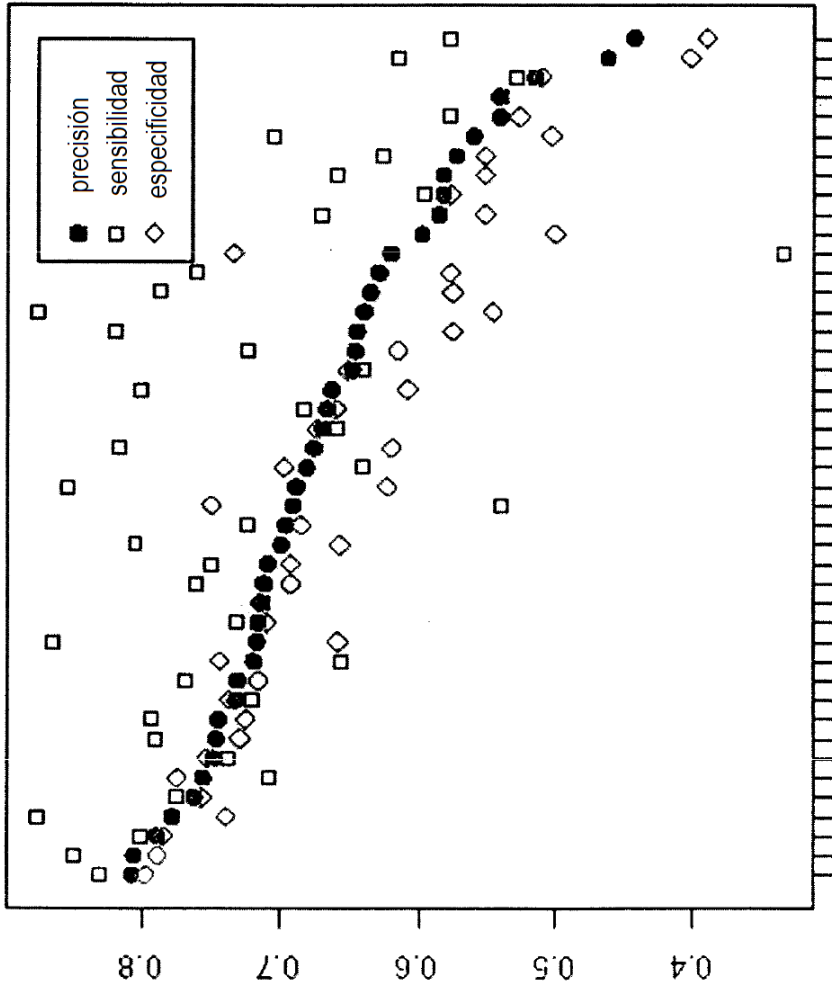


Figura 35

Figura 74

