(19) OFICINA ESPAÑOLA DE PATENTES Y MARCAS

ESPAÑA

(11) Número de publicación: **2 690 160**

(21) Número de solicitud: 201730701

(51) Int. CI.:

C12Q 1/68 (2006.01)

(12) SOLICITUD DE PATENTE A1

(22) Fecha de presentación:

17.05.2017

(43) Fecha de publicación de la solicitud:

19.11.2018

(71) Solicitantes:

HOSPITAL SANT JOAN DE DEU (100.0%)
Pº Sant Joan de Déu, 2
08950 ESPLUGUES DE LLOBREGAT (Barcelona) ES

(72) Inventor/es:

LAVARINO, Cinzia Emilia y
GOMEZ GONZALEZ, Soledad

(74) Agente/Representante:

CARPINTERO LÓPEZ, Mario

(54) Título: **Método de clasificación en subgrupos moleculares de pacientes con meduloblastoma**

(57) Resumen:

Método para la clasificación en subgrupos moleculares de pacientes con meduloblastoma.

La presente invención se refiere al empleo de la combinación de los perfiles de metilación de las citosinas del panel WNT-SHH y Panel G3-G4 como marcador de clasificación de pacientes con meduloblastoma en los subgrupos moleculares WNT, SHH, Grupo 3 y Grupo 4. Asimismo se contempla el método para la clasificación de pacientes con meduloblastoma en uno de dichos subgrupos moleculares basado en el análisis de la metilación de las citosinas de los Paneles WNT-SHH y G3-G4. Finalmente se contempla el kit para llevar a cabo el método de clasificación de la invención.

ES 2 690 160 A1

DESCRIPCIÓN

Método de clasificación en subgrupos moleculares de pacientes con meduloblastoma

Campo de la invención

La presente invención tiene su campo de aplicación dentro del sector sanitario, principalmente en los sectores de la “Oncología Pediátrica” y la “Biología Molecular”. En particular, la presente invención se refiere a un método de clasificación de tumores en subgrupos moleculares de interés clínico. De forma más específica, la presente invención contempla un método *in vitro* para la clasificación de un paciente con meduloblastoma en uno de los subgrupos moleculares WNT, SHH, Grupo 3 y Grupo 4.

Antecedentes de la invención

El meduloblastoma (MB) es un tumor embrionario altamente maligno de origen neuroepitelial que se describió por primera vez como tumor del sistema nervioso central en 1925. Es el tumor cerebral maligno más común en la edad pediátrica y representa aproximadamente el 20% de los tumores pediátricos de sistema nervioso central (*Gilbertson RJ and Ellison DW. The Origins of Medulloblastoma Subtypes. Annual Review of Pathology Mechanisms of Disease 2008, 3:341-365; Gajiar A et al. Pediatric Brain Tumors: Innovative Genomic Information is transforming the Diagnostic and Clinical Landscape. Journal of Clinical Oncology 2015, 33(7):2986-2988*). En los países desarrollados, el MB es la causa más común de muerte por cáncer en niños mayores de 1 año de edad (*European detailed mortality database (DMDB). Copenhagen, WHO Regional Office of Europe, 2015*). La edad de presentación de la enfermedad es variable, y puede desarrollarse tanto en niños pequeños como en adolescentes, con un pico de incidencia en niños de 3 a 6 años de edad. En jóvenes adultos es raro. Aproximadamente un 75% de los MBs de la edad pediátrica tienen origen en el *vermis* cerebeloso, y protruyen hacia el cuarto ventrículo, con el restante 25% localizado en los hemisferios cerebelosos. Alrededor de un 30% de los casos pediátricos presentan metástasis en el momento del diagnóstico. La mayoría de las metástasis se desarrollan en el sistema nervioso central (craneal o medular), mientras que la propagación a los órganos extracraneales es muy rara al diagnóstico. En una minoría de pacientes, el MB está asociado con el síndrome de Gorlin (www.orpha.net, ORPHA377), la poliposis adenomatosa o con el síndrome de Li-Fraumeni (www.orpha.net; ORPHA616).

El diagnostico diferencial del MB se plantea, macroscópicamente, con otros tumores de fosa posterior (*vermis* cerebeloso) como el astrocitoma pilocítico y el ependimoma. El tumor teratoide rabdoide atípico también ha de barajarse en determinadas situaciones. Desde el punto de vista microscópico, la confusión con el astrocitoma pilocítico es rara, con excepción de los tumores desdiferenciados, como astrocitomas malignizados o glioblastomas de esta región. Con respecto a los ependimomas, la dificultad puede plantease en los casos de elevada densidad celular, en los que los sistemas gliovasculares pequeños pueden inducir a confusión con rosetas o pseudorosetas y con otras estructuras secundarias características de los ependimomas (*Gilbertson RJ and Ellison DW. The Origins of Medulloblastoma Subtypes. Annual Review of Pathology Mechanisms of Disease 2008, 3:341-365; Escalona-Zapata J. Tumores del Sistema Nervioso Central. Editorial Complutense 1996*).

El tratamiento del MB depende de la edad, la diseminación de la enfermedad, la variante histológica y las características moleculares del tumor. En la actualidad el tratamiento para MB incluye resección quirúrgica, radioterapia craneoespinal (en pacientes mayores de 3 años) y quimioterapia adyuvante. El tratamiento multimodal intensivo de los MBs ha permitido mejorar de forma significativa la supervivencia de los pacientes, supervivencia global a 5 años de un 80% en los casos con enfermedad de riesgo estándar y un 70% en casos de alto riesgo clínico, aunque en muchas ocasiones a expensas de secuelas severas permanentes (alteraciones del desarrollo, secuelas neurológicas, neuroendocrinas y psicosociales) (*Gajjar A et al. Pediatric Brain Tumors: Innovative Genomic Information Is Transforming The Diagnostic and Clinical Landscape. Journal of Clinical Oncology 2015, 33(27): 2986-2998; Northcott PA. et al. Medulloblastomics: the end of the beginning. Nature Reviews Cancer 2012, 12: 818-834*).

El MB representa un grupo heterogéneo de tumores del cerebelo caracterizados por tener comportamiento clínico, histopatología, biología e índices de curación diversos (*Gajjar A et al. Pediatric Brain Tumors: Innovative Genomic Information Is Transforming The Diagnostic and Clinical Landscape. Journal of Clinical Oncology 2015; 33(27): 2986-2998*). Los esquemas de estratificación clínica utilizados durante décadas se han basado únicamente en características clínicas (tamaño y estado de diseminación del tumor), en la edad al diagnóstico, el grado de resección quirúrgica y la histología del tumor. La edad del paciente al momento del diagnóstico es un factor determinante al verse reflejada en el

comportamiento agresivo de los tumores en pacientes menores de 3 años (*DeSouza RMet al. Pedriatic medulloblastoma – update on molecular classification driving targeted therapies. Frontiers in Oncology 2014, 4:1-8*). Pacientes menores de 3 años de edad, con evidencia de tumor residual (≥1.5cm^2) después de la cirugía y pacientes con diseminación leptomeníngea al diagnóstico se consideran tumores de alto riesgo, el resto de MB se clasifican de riesgo estándar *(Northcott PA. et al. Medulloblastomics: the end of the beginning. Nature Reviews Cancer 2012, 12: 818-834)*. Este esquema de estratificación de pacientes no tiene en cuenta la heterogeneidad del comportamiento clínico de estos tumores.

Los MBs son considerados altamente malignos, corresponden a un grado IV de la clasificación de los tumores del sistema nervioso central de la Organización Mundial de la Salud (OMS). De acuerdo a la clasificación de la OMS del 2007, histológicamente los MBs se clasifican en tres grandes grupos que incluyen el subtipo clásico, el meduloblastoma desmoplásico/nodular (MBEN) y el subtipo de células gigantes/anaplásico (LCA). El subtipo clásico es el más frecuente (66%), se caracteriza por estar compuesto de células pequeñas indiferenciadas, empaquetadas de forma densa, que se tiñen de azul con hematoxilina (basofílicas) con núcleos hipercromáticos y escaso citoplasma que frecuentemente forman rosetas de Homer-Wright. El MB clásico crece desde la parte más central del cerebelo (*vermis* cerebeloso) (*Louis DN et al. WHO Classification of Tumors of the Central Nervous System. Lyon: IARC 2007; Ellison DW et al. Medulloblastoma. Pathology and genetics of tumors of the nervous system. World Health Organization Classification of Tumours. Lyon: IARC 2000*). El meduloblastoma desmoplásico/nodular (MBEN) (15%) tiene un pronóstico más favorable al ser menos agresivo. Se desarrolla en la parte más lateral del hemisferio cerebeloso. El MB desmoplásico también presenta células pequeñas azules, pero con isletas pálidas libres de reticulina en un fondo rico en estroma y reticulina. El subtipo anaplásico (15%) se caracteriza por un marcado pleomorfismo nuclear y amoldamiento celular, y la variante de célula grande (2-4%) presenta población celular monomorfa con nucléolo prominente. Ambas variantes se caracterizan por una elevada proliferación celular, abundante apoptosis y pronóstico más desfavorable (*Louis DN et al. WHO Classification of Tumors of the Central Nervous System. Lyon: IARC 2007).*

El comportamiento clínico-patológico del MB es un reflejo de las características genético-biológicas subyacentes del tumor. Durante los últimos años se han llevado a cabo varios

estudios genómicos (secuenciación masiva del genoma, análisis del transcriptoma y del metiloma del ADN y estudio de las alteraciones cromosómicas) con el fin de definir las bases moleculares subyacentes al comportamiento clínico-patológico del MB. Uno de los hallazgos más relevantes derivado de estos estudios ha sido la identificación de cuatro subgrupos principales de MB denominados: wingless (WNT), Sonic hedgehog (SHH), Grupo 3 y Grupo 4. Estos subgrupos se caracterizan por tener un comportamiento clínico, un perfil transcripcional y una genética distinta (*Northcott PA et al. Medulloblastoma Comprises Four Distinct Molecular Variants. Journal of Clinical Oncology 2011,29 (11):1408-1414; Kool M et al. Molecular subgroups of medulloblastoma: an international meta-analysis of transcriptome, genetic aberrations, and clinical data of WNT, SHH, Group 3, and Group 4 medulloblastomas. Acta Neuropathologica 2012, 123: 473-484; Taylor MD et al. Molecular subgroups of medulloblastoma: the current consensus. Acta Neuropathologica 2012, 123:465-472*; *Northcott PA et al Sugroup-specific structural variation across 1,000 medulloblastoma genomes. Nature 2012, 488:49-56; Northcott PA. et al. Medulloblastomics: the end of the beginning. Nature Reviews Cancer 2012, 12: 818-834; Northcott PA et al. Rapid, reliable, and reproducible molecular sub-grouping of clinical medulloblastoma samples. Acta Neuropathologica 2012, 123:615-626; Hovestadt V et al. Robust molecular subgrouping and copy-number profiling of medulloblastoma from small amounts of archival tumor material using high-density DNA methylation arrays. Acta Neuropathologica 2013, 125:913-916; Wang X et al. Medulloblastoma subgroups remain stable across primary and metastatic compartments. Acta Neuropathologica 2015, 129:449-457; Thompson EM et al. Prognostic value of medulloblastoma extent of resection after accounting for molecular subgroup: a retrospective integrated clinical and molecular analysis. The Lancet Oncology 2016; 17:485-495).*

Los subgrupos WNT y SHH llevan el nombre de las vías de señalización celular que juegan un papel importante en la patogénesis del subgrupo. La biología del Grupo 3 y Grupo 4 es más desconocida, por consiguiente se han nombrado de forma genérica hasta que no se defina la biología subyacente a su comportamiento clínico (*Taylor MD et al. Molecular subgroups of medulloblastoma: the current consensus. Acta Neuropathologica 2012, 123:465-472).*

El subgrupo de MB más conocido es el subgrupo WNT debido a su pronóstico excelente en comparación con el resto de subgrupos. Los índices de supervivencia global de los MB

WNT pueden superar el 90%, donde aquellos pacientes que fallecen es mayoritariamente debido a complicaciones asociadas al tratamiento o neoplasias secundarias (*Taylor MD et al. Molecular subgroups of medulloblastoma: the current consensus. Acta Neuropathologica 2012, 123:465-472).* Este subgrupo representa aproximadamente el 10% de los pacientes con MB. Normalmente afecta a pacientes mayores (media de edad 10 años), la mayoría presentan una histología clásica y rara vez presentan metástasis. El 80-85% se asocian a presencia de monosomía del cromosoma 6 (*Gajjar A et al. Pediatric Brain Tumors: Innovative Genomic Information Is Transforming The Diagnostic and Clinical Landscape. Journal of Clinical Oncology 2015, 33(27): 2986-2998*.

El gen más recurrentemente mutado en los MBs WNT es *CTNNB1* (del inglés *catenin beta 1*), que se identifica en un 85% de los tumores analizados. Mutaciones en el gen *DDX3* se ven enriquecidas en el subgrupo WNT, pero el subgrupo SHH y Grupo 3 también pueden presentar estas mutaciones. Aproximadamente un 15% de los tumores WNT tienen mutaciones en el gen TP53 no asociadas con el síndrome de Li-Fraumeni (mutación en TP53 en línea germinal) o con pronóstico desfavorable (*Gajjar A et al. Pediatric Brain Tumors: Innovative Genomic Information Is Transforming The Diagnostic and Clinical Landscape. Journal of Clinical Oncology 2015, 33(27): 2986-2998; Taylor MD et al. Molecular subgroups of medulloblastoma: the current consensus. Acta Neuropathologica 2012, 123:465-472)*.

El subgrupo SHH representa aproximadamente el 25% de los MBs, mayoritariamente de histología desmoplásica nodular. El pronóstico es bastante variable y dependiente de la edad del paciente: niños pequeños con SHH tratados exclusivamente con quimioterapia tienen pronóstico excelente, mientras pacientes mayores con SHH asociado a mutaciones en *TP53* tienen pronóstico desfavorable, especialmente si presentan amplificación de los genes *MYCN* y *GLI2*.

El Grupo 3 y Grupo 4 constituyen el 25% y 35% de los MBs, respectivamente. Aun siendo genéticamente distintos, estos dos subgrupos presentan numerosas alteraciones genéticas comunes. Hasta la fecha, no se ha hallado un patrón específico que los distinga en Grupo 3 y Grupo 4 de forma concluyente. Ambos grupos son más frecuentes en niños, y el isocromosoma 17q sólo se presenta en estos tumores, siendo más frecuente en el Grupo 4 (80% *vs*. 26%). Los MBs del Grupo 3 y Grupo 4 muestran una frecuencia baja de

mutaciones recurrentes. Se ha descrito la activación de la expresión de la familia de proto-oncogenes *GFI1* y *GFI1B* mediante un mecanismo de "*hijacking*" (secuestro) de "*enhancers*" (potenciadores). Esta alteración genética *GFI1/GFI1B* está activa en aproximadamente un 40% y 10% de los tumores del Grupo 3 y Grupo 4, respectivamente. Los MBs Grupo 3 se asocian a histología LCA y diseminación metastásica (50%). También se caracterizan por sobre-expresión de *MYC* (17% presenta amplificación de MYC). La presencia de enfermedad metastásica, isocromosoma 17q y amplificación de *MYC* confiere al Grupo 3 un pronóstico desfavorable. Los tumores del Grupo 4 habitualmente poseen una histología clásica, y en ocasiones histología LCA. Los pacientes tienen un pronóstico intermedio. La amplificación del oncogén *MYCN* en estos tumores, a diferencia de los SHH, no se asocia a pronóstico desfavorable. Pacientes con enfermedad metastásica tienen mayor riesgo de recaída, excepto si el tumor pierde el cromosoma 11 y gana el cromosoma 17, que parece identificar un subgrupo de pronóstico más favorable (*Gajjar A et al. Pediatric Brain Tumors: Innovative Genomic Information Is Transforming The Diagnostic and Clinical Landscape. Journal of Clinical Oncology 2015, 33(27): 2986-2998; Taylor MD et al. Molecular subgroups of medulloblastoma: the current consensus. Acta Neuropathologica 2012, 123:465-472*).

Los subgrupos WNT, SHH, Grupo 3 y Grupo 4 de MB han adquirido cada vez más relevancia tanto para definir de forma más precisa el pronóstico clínico o el tratamiento de los pacientes, como para el diseño de ensayos clínicos. Por ejemplo, dado el pronóstico favorable del subgrupo WNT, estos pacientes podrían beneficiarse de una reducción u omisión de la radioterapia o quimioterapia, limitando de esta forma los efectos neurológicos adversos y toxicidades. Por el contrario, pacientes Grupo 3 con pronóstico desfavorable podrían beneficiarse de una intensificación del tratamiento de primera línea.

En 2010, en una conferencia consenso en Boston, el grupo de Trabajo del Meduloblastoma (*Medulloblastoma Working Group*) reconoció los subgrupos de MB, WNT, SHH, Grupo 3 y Grupo 4, como entidades biológicas distintas. Actualmente, se están realizando grandes esfuerzos para desarrollar nuevas estrategias terapéuticas dirigidas a cada uno de estas entidades de MB. En 2015, la conferencia consenso de la OMS reconoció la importancia de estos grupos biológicos e introdujo las siguientes entidades definidas genéticamente en la última revisión de la clasificación de los tumores del SNC publicada en 2016: WNT, SHH-TP53 no mutado (TP53 *wild-type*); SHH-TP53 mutado, y Grupo no-WNT/no-SHH. El Grupo

3 y Grupo 4, al tener un cierto grado de similitud y al coincidir algunas de las características genéticas, han sido incluidos de forma provisional en el subgrupo de MBs no-WNT/no-SHH *(Louis DN et al. WHO Classification of Tumours of the Central Nervous System. WHO/IARC Classification of Tumours, 4th Edition Revised, Volume 1, WHO press-IARC; Louis DN et al. The 2016 World Health Organization Classification of Tumor of the Central Nervous System: a summary. Acta Neuropathologica 2016, 131(6):803-820; Ramaswamy V et al. Risk stratification of childhood medulloblastoma in the molecular era: the current consensus. Acta Neuropathologica 2016,131:821-831*).

La metodología utilizada para definir el subgrupo molecular de MB ha cambiado a lo largo de los últimos años. Inicialmente se realizaba mediante un análisis de expresión génica basado en tecnología de *microarray*, para ello era necesario partir de muestras de tejido fresco congelado (*Northcott PA et. Medulloblastoma comprises four distinct molecular variants. Journal of Clinical Oncology 2011, 29(11):1408-1414*). También existen métodos para el análisis de los niveles ARN en tejido fijado e incluido en parafina, sin embargo la precisión es inferior, especialmente cuando se trata de muestras más antiguas. También se ha propuesto utilizar como metodología alternativa un análisis de un panel de marcadores mediante técnicas de inmunohistoquímica (*Northcott PA et. Medulloblastoma comprises four distinct molecular variants. Journal of Clinical Oncology 2011, 29(11):1408-1414*) pero se ha demostrado que es difícil de estandarizar en los laboratorios de neuropatología.

Actualmente se utilizan dos estrategias para la clasificación de estos tumores: 1) tecnología basada en la cuantificación de niveles de ARN mediante el empleo del sistema *NanoString nCounter System* (NanoString Technologies, Inc.) y 2) tecnología de *microarrays* de alta densidad (*Illumina Infinium Human Methylation 450K BeadChip array* (HM450K)) para analizar el perfil de metilación del genoma completo (ADN) de los tumores.

La tecnología *NanoString nCounter System* está basada en un análisis no enzimático con sondas secuencia-específicas para la cuantificación digital de los niveles de múltiples ARN diana en una muestra. En 2012, el grupo de Taylor MD del *Sick Children's Hospital* de Toronto identificó 22 genes cuyos niveles de expresión permiten clasificar los MBs *(Northcott PA et al. Rapid, reliable, and reproducible molecular sub-grouping of clinical medulloblastoma samples. Acta Neuropathologica 2012, 123:615-626)*. El mismo grupo ha desarrollado un ensayo (una librería de sondas para la cuantificación de ARN) que permite

cuantificar los niveles de expresión de los 22 genes mediante un analizador digital. Esta metodología es aplicable tanto a muestras de tejido fresco congelado como tejido fijado en formalina e incluido en parafina *(Northcott PA et al. Rapid, reliable, and reproducible molecular sub-grouping of clinical medulloblastoma samples. Acta Neuropathologica 2012, 123:615-626)*. El análisis mediante *NanoString nCounter* ha mostrado ser fiable y reproducible, pero el coste elevado del analizador digital ha limitado la aplicabilidad en la práctica clínica. Actualmente el ensayo no es comercial y el análisis de la firma de 22 genes está centralizado en el *Sick Children's Hospital* de Toronto, Canada.

El *microarray* HM450k interroga el estado de metilación de más de 450.000 citosinas a lo largo de todo el genoma. Cubre el 96% por ciento de las islas de dinucleótidos citosina-guanina (CpG) de todo el genoma, múltiples CpG "*shores*" (orillas) y CpGs aislados localizados en regiones tanto intragénicas como intergénicas. Esta metodología ha demostrado ser fiable para la clasificación de los MBs en subgrupos tanto con tejido fresco congelado como fijado en formalina e incluido en parafina. Sin embargo, la utilidad del HM450k en la práctica clínica se ve limitada por el número extremadamente elevado de datos que genera el *microarray* (más de 450.000 datos), la dificultad del procesamiento de los datos (i.e. control de calidad de la hibridación de los fragmentos de ADN al *array*, control de la robustez de la señal de dichas secuencias, corrección de la señal debida a hibridación no especifica que afecta la sensibilidad y especificidad del resultado, normalización de la señal específica para contener errores técnicos) y la dificultad del análisis masivo de grandes cantidades de datos de metilación que hacen necesario el empleo de tecnología computacional, de métodos de bioinformática (programación y aplicación de algoritmos/programas para el análisis, la clasificación, "*data mining*" (minería de datos) y visualización de dato, entre otros) y estadísticos complejos, personal especializado y cantidades elevadas de tejido adecuado. Finalmente, la tecnología de *microarray* tiene un coste económico elevado. Por todo ello, esta estrategia de clasificación de los MBs mediante tecnología de *microarrays* HM450K está centralizada en el *German Cancer Center* de Heidelberg, Alemania.

En respuesta a la necesidad de aplicar el sistema de clasificación molecular de pacientes con MB en la práctica clínica, los autores de la invención, tras un intenso trabajo de investigación, han conseguido identificar dos patrones de metilación de un grupo muy reducido y específico de citosinas (Panel WNT-SHH y Panel G3-G4) con niveles de

metilación significativamente asociados con los cuatro subgrupos moleculares de meduloblastoma descritos en literatura: WNT, SHH, Grupo 3 y Grupo 4. Los datos de metilación del ADN fueron obtenidos mediante tecnología de microarray de alta densidad (*Illumina Human Methylation BeadChip 450K, HM450K*) (*Northcott PA et al. Medulloblastoma Comprises Four Distinct Molecular Variants. Journal of Clinical Oncology 2011, 29(11):1408-1414; Kool M et al. Molecular subgroups of medulloblastoma: an international meta-analysis of transcriptome, genetic aberrations, and clinical data of WNT, SHH, Group 3, and Group 4 medulloblastomas. Acta Neuropathologica 2012, 123: 473-484; Taylor MD et al. Molecular subgroups of medulloblastoma: the current consensus. Acta Neuropathologica 2012, 123:465-472*; *Northcott PA et al Subgroup-specific structural variation across 1,000 medulloblastoma genomes. Nature 2012, 488:49-56; Northcott PA. et al. Medulloblastomics: the end of the beginning. Nature Reviews Cancer 2012, 12: 818-834; Northcott PA et al. Rapid, reliable, and reproducible molecular sub-grouping of clinical medulloblastoma samples. Acta Neuropathologica 2012, 123:615-626; Hovestadt V et al. Robust molecular subgrouping and copy-number profiling of medulloblastoma from small amounts of archival tumor material using high-density DNA methylation arrays. Acta Neuropathologica 2013, 125:913-916; Wang X et al. Medulloblastoma subgroups remain stable across primary and metastatic compartments. Acta Neuropathologica 2015, 129:449-457; Thompson EM et al. Prognostic value of medulloblastoma extent of resection after accounting for molecular subgroup: a retrospective integrated clinical and molecular analysis. The Lancet Oncology 2016; 17:485-495)*.

El empleo del perfil de metilación de las citosinas del Panel WNT-SHH y del Panel G3-G4, de forma combinada, puede ser empleado como marcador para la estratificación en los cuatros principales subgrupos moleculares de pacientes con MB.

La metilación del ADN es una modificación post-replicativa que implica la unión covalente de un grupo metilo [-CH_3] al carbono de la posición 5 de citosinas que preceden guaninas (dinucleótidos citosina-guanina o CpG). Estos no se encuentran uniformemente distribuidos en el genoma humano, existen regiones donde su concentración es elevada denominadas “islas citosina-guanina” (iCpG). La metilación del ADN es un proceso muy bien caracterizado. Cuando las células se dividen, además de heredar la secuencia de su genoma, heredan los patrones de metilación presentes en la célula de origen. A diferencia de la información genética, la cual es transmitida de células madres a hijas con una tasa de

variación baja, la información epigenética presenta mayor dinámica.

La metilación del genoma en dinucleótidos CpG es un mecanismo epigenético de regulación génica implicado en procesos celulares primordiales para el desarrollo embrionario de los mamíferos (*Smith ZD et al. DNA methylation: roles in mammalian development. Nat Rev Genet (2013) 14(3), 204-20*). La epigenética comprende todos aquellos mecanismos celulares (metilación del ADN, modificaciones de las histonas o ARN no codificante) que influyen sobre la regulación genética, sin alterar la secuencia de los genes o del genoma. Los procesos epigenéticos constituyen una programación esencial para el desarrollo y la diferenciación. Durante el desarrollo, el genoma sufre modificaciones que son cruciales para la determinación del linaje celular y la diferenciación (*Smith ZD et al. DNA methylation: roles in mammalian development. Nat Rev Genet (2013) 14(3), 204-20*). Estas modificaciones ocurren de forma natural en la célula pero pueden verse moduladas por diversos factores como la edad, el medio ambiente y las enfermedades. Estudios recientes están poniendo de manifiesto el papel clave que juegan las alteraciones epigenéticas en enfermedades como el cáncer *(Esteller M et al. Epigenetics in cancer. New England Journal of Medicine (2008) 358:1148-59; Lister R et al. Human DNA methylomes at base resolution show widespread epigenomic differences. Nature (2009) 462:315-22)*.

La modificación epigenética más estudiada en humanos es la metilación del ADN. El análisis de la metilación ha experimentado una revolución durante la última década, especialmente desde la adaptación de la tecnología de *microarray* al estudio de la metilación y a la aparición de la secuenciación de nueva generación. Dado que la información de la metilación del ADN se borra tras la reacción en cadena de la polimerasa (PCR, del inglés *Polymerase Chain Reaction*) (debido a la ausencia de metiltransferasas que mantengan el patrón de metilación), la gran mayoría de técnicas se basan en un tratamiento metil-dependiente previo a la amplificación o hibridación (*Lister R et al. Human DNA methylomes at base resolution show widespread epigenomic differences. Nature (2009) 462:315-22; Laird PW et al. Principles and challenges of genome-wide DNA methylation analysis. Nature Reviews Genetics (2010) 11:191-203*; *Balaguer F et al. Epigenómica. Nuevos Métodos de diagnóstico Molecular (2010) 9(4):165-71*).

Existen múltiples aproximaciones posibles para el análisis de la metilación, basadas en diferentes estrategias enzimáticas y químicas (tratamiento con bisulfito de sodio ($NaHSO_3$),

tratamiento con enzimas de restricción y enriquecimiento por afinidad, entre otras).

El tratamiento con bisulfito de sodio (BS) convierte las citosinas no metiladas en uracilos, y timinas y por consiguiente, la gran mayoría del genoma se reduce a tres bases (A, G, y T) en lugar de cuatro. Por tanto, para analizar el patrón de metilación es necesario el diseño de ensayos específicos para el ADN convertido por BS. Este tratamiento convierte una modificación epigenética en una diferencia genética y, en consecuencia, analizable mediante diferentes técnicas.

La conversión por bisulfito sódico se considera el "*gold standard*" para el análisis de la metilación del ADN, dada su potencial alta resolución cuando se combina con métodos de secuenciación.

Dentro de las técnicas de análisis locus-especifico se encuentran, entre otras, la metilación específica mediante PCR (MSP, del inglés *Methyl Specific PCR*), la secuenciación por bisulfito (BSP, del inglés *Bisulfite Sequencing PCR*) y la pirosecuenciación por bisulfito.

Los autores de la invención han desarrollado una estrategia para la clasificación molecular del MB basada en el análisis de los patrones de metilación de un grupo de citosinas diferencialmente metiladas (Panel WNT-SHH y Panel G3-G4). El patrón de metilación de dichas citosinas puede ser analizado mediante diversas técnicas aplicables para el análisis de metilación del ADN. Los autores de la invención han corroborado la validez de los Paneles de citosinas utilizando datos de metilación del ADN generados mediantes diversas aproximaciones, entre éstas la tecnología de microarrays y técnicas moleculares como son las aproximaciones basadas en la conversión del ADN con bisulfito complementadas con la amplificación por una reacción en cadena de la ADN polimerasa (PCR, del inglés *Polymerase Chain Reaction*) o métodos de secuenciación (secuenciación por bisulfito *y* Pirosecuenciación por bisulfito).

Asimismo, los autores de la invención han demostrado que la estrategia propuesta para la clasificación molecular del MB puede ser aplicada a ADN extraído a partir de todo tipo de muestras con una representación adecuada de ADN tumoral, como pueden ser biopsias de tejido tumoral obtenido en fresco (F) y congelado y conservado a -80ºC (FF, del inglés *fresh frozen*) o fijado en formalina tamponada 10% y embebido en parafina (FFPE, del

inglés *formalin fixed, paraffin-embedded*).

El valor de esta estrategia de clasificación viene dado tanto por el número reducido de citosinas que componen el Panel WNT-SHH y Panel G3-G4, como por la viabilidad a nivel técnico (pirosecuenciación, MSP, BSP o todas aquellas técnicas que permitan determinar de forma directa o indirecta, el patrón de metilación de una secuencia de interés), la aplicabilidad a biopsias de tejido tumoral pequeñas obtenidas en F/FF, FFPE y/o biopsias líquidas, la elevada precisión, rapidez, fácil interpretación, reproducibilidad de los resultados, y por el bajo coste económico.

Descripción de las figuras

Figura 1.- Normalización, control de calidad y filtrado de los datos brutos de metilación generados mediante tecnología de microarray (micromatriz) de alta densidad *Illumina Human Methylation BeadChip 450K*. Cohorte de estudio, 106 meduloblastomas en F/FF. (**A**) Diagrama de densidades del conjunto de datos de metilación; (**B**) Representación grafica del control de calidad de la conversión por bisulfito del ADN; (**C**) Diagrama de densidades de los datos normalizados mediante la metodología SWAN.

Valor β (β –value): estimación del nivel de metilación mediante la proporción entre el valor del alelo metilado y el no-metilado (metilado / no-metilado + metilado +100).

Figura 2.- Análisis no supervisado de los niveles de metilación de la cohorte de estudio, 106 meduloblastomas en F/FF. Se definen el conjunto de los perfiles de metilación de todas las muestras. (**A**) Análisis de la distribución de la variabilidad (density *plot*) de metilación de ADN de las muestras; (**B**) Análisis de Componentes Principales (ACP) y (**C**) análisis de *clustering* jerárquico de todas las CpGs con desviación estándar mayor o igual a 0,3 (5.904 CpGs).

Figura 3.- Análisis no supervisado empleando el conjunto de las nueve citosinas que componen el Panel WNT-SHH. Cohorte de estudio, 106 muestras de meduloblastomas en F/FF. (**A**) ACP no supervisado con las 9 CpGs del Panel WNT-SHH (3 grupos); (**B**) Representación gráfica (gráfico de violín) del patrón de metilación diferencial de las citosinas del Panel WNT-SHH en los subgrupos WNT, SHH y no-WNT/no-SHH; (**C**) Comparación de los valores de metilación de las citosinas del Panel WNT-SHH en otros

tejidos normales y tumorales.

Acrónimos. GS: glándula suprarrenal; ESC: células madre embrionarias (*embryonal stem cells*); IPSC: células madre pluripotentes inducidas (*induced pluripotent stem cells*); NPSC: células neuronales progenitoras; GPSC: células gliales progenitoras; GB: glioblastoma; DIPG: glioma difuso de protuberancia (*Difused intrinsic pontine glioma*); PA: astrocitoma pilocitico (*pilocytic astrocitoma*); ATRT: tumor teradoide/rabdoide atípico (*atypical teradoid/rhabdoid tumor*); NB: neuroblastoma; GN: ganglioneuroma.

Figura 4. Análisis no supervisado empleando el conjunto de las ocho citosinas que componen el Panel G3-G4. Meduloblastomas Grupo 3 y Grupo 4 de la cohorte de estudio, 106 tumores en F/FF. (A) ACP no supervisado con las 8 CpGs del Panel G3-G4 (2 grupos); (**B**) Representación gráfica (gráfico de violín) del patrón de metilación diferencial de las citosinas del Panel G3-G4 en los subgrupos Grupo 3 y Grupo 4; (**C**) Comparación de los valores de metilación de las citosinas del Panel G3-G4 en otros tejidos normales y tumorales.

Acrónimos. GS: glándula suprarrenal; ESC: células madre embrionarias (*embryonal stem cells*); IPSC: células madre pluripotentes inducidas (*induced pluripotent stem cells*); NPSC: células neuronales progenitoras; GPSC: células gliales progenitoras; GB: glioblastoma; DIPG: glioma difuso de protuberancia (*Difused intrinsic pontine glioma*); PA: astrocitoma pilocitico (*pilocytic astrocitoma*); ATRT: tumor teradoide/rabdoide atípico (*atypical teradoid/rhabdoid tumor)*; NB: neuroblastoma; GN: ganglioneuroma.

Figura 5.- Validación del Panel WNT-SHH y Panel G3-G4 mediante el empleo de la base de datos HM450k de metilación del ADN. Cohorte de validación, 169 muestras de meduloblastoma FFPE. (A) Análisis no supervisado mediante ACP empleando el conjunto de las nueve citosinas que componen el Panel WNT-SHH (9 CpGs); (**B**) ACP de los valores de metilación de las citosinas identificadas en el Panel G3-G4 (8 CpGs) en muestras de meduloblastoma FFPE.

Figura 6.- Análisis de patrón de metilación del Panel WNT-SHH mediante metodología de secuenciación por bisulfito (BSP) en ADN de tejido F/FF y FFPE de meduloblastoma. Los círculos muestran el patrón de metilación diferencial de las nueve citosinas de interés del Panel WNT-SHH, (rojo) estado identificativo y (verde) estado excluyente del subgrupo. (**A**) Subgrupo WNT; (**B**) Subgrupo SHH y (**C**) Subgrupo no-

WNT/no-SHH.

Figura 7.- Ejemplo gráfico de los niveles de metilación de las citosinas del Panel WNT-SHH obtenidos mediante pirosecuenciación por bisulfito en ADN de tejido F/FF y FFPE de meduloblastoma.

Descripción de la invención

La presente invención tiene como principal objetivo identificar un marcador para la clasificación de pacientes con meduloblastoma (MB) que constituya una prueba más fácilmente aplicable que los sistemas de clasificación existentes, que sea reproducible y con una buena relación coste-efectividad en la práctica clínica.

En la última revisión de la clasificación de la Organización Mundial de la Salud (OMS) de los tumores del sistema nervioso central publicado en 2016, se introdujeron las siguientes entidades definidas genéticamente: WNT, SHH y Grupo no-WNT/no-SHH. El Grupo 3 y Grupo 4 al tener un cierto grado de similitud y al coincidir algunas de las características genéticas, fueron incluidas de forma provisional en el subgrupo de MBs “no-WNT/no-SHH”.

En respuesta a la necesidad de aplicar en la práctica clínica este sistema de clasificación molecular de pacientes con MB para determinar el riesgo clínico y poder definir el tratamiento más adecuado para cada paciente, en la presente invención se definen dos paneles de citosinas que, en combinación, actúan como marcador de clasificación molecular eficaz de pacientes con MB en cuatro subgrupos moleculares: WNT, SHH, Grupo 3 y Grupo 4.

Para ello, los autores de la presente invención han corroborado que existe en MB una asociación del patrón de metilación del ADN con las entidades genéticas WNT, SHH, y no-WNT/no-SHH. A partir de estos patrones de metilación, los autores han seleccionado un primer panel de nueve citosinas, con un patrón de metilación diferencial, que se asocia de forma significativa y precisa con cada uno de los subgrupos WNT, SHH, y no-WNT/no-SHH. Han demostrado que este panel de nueve citosinas (de aquí en adelante Panel WNT-SHH) (Tabla 1) es eficaz para establecer las tres entidades genéticas definidas por la OMS (2016): WNT, SHH y Grupo no-WNT/no-SHH.

Diversas combinaciones de dos o más de estas citosinas tienen la capacidad de clasificar correctamente los MBs en estos subgrupos, siendo dichas combinaciones susceptibles de representar potenciales marcadores adecuados para la clasificación de estos tumores.

Tabla 1. Panel WNT-SHH.

Subgrupo	ID citosina	ID Illumina	Cromosoma	Posición inicio	Posición final
WNT	WNT1_MB	cg25542041	9	124982087	124982088
WNT	WNT2_MB	cg24280645	17	48636900	48636901
WNT	WNT3_MB	cg02227036	16	50425329	50425330
no-WNT/no-SHH	N-WS1_MB	cg18849583	14	32836157	32836158
no-WNT/no-SHH	N-WS2_MB	cg19828869	2	171552304	171552305
no-WNT/no-SHH	N-WS3_MB	cg01268345	7	138603645	138603646
SHH	SHH1_MB	cg10333416	16	844474	844475
SHH	SHH2_MB	cg10959440	6	148701916	148701917
SHH	SHH3_MB	cg12925355	2	234386471	234386472

Tal y como se puede observar en la Tabla 1, el panel WNT-SHH está formado por 9 citosinas denominadas como WNT1_MB, WNT2_MB, WNT3_MB, N-WS1_MB, N-WS2_MB, N-WS3_MB, SHH1_MB, SHH2_MB y SHH3_MB.

Cada subgrupo molecular de MB (WNT, SHH y no-WNT/no-SHH) está asociado de forma específica y unívoca con un patrón de metilación diferencial de las citosinas del Panel WNT-SHH. Cada citosina muestra un patrón de metilación bimodal específico: niveles muy elevados de metilación (promedio valor metilación ≥ 80%) o al contrario, niveles muy bajos (promedio valor metilación ≤ 17%) para cada uno de los subgrupos.

Aquellos tumores con un patrón de metilación con valores elevados en las citosinas WNT1_MB y WNT2_MB y niveles bajos de metilación en WNT3_MB, se asocian de forma específica y univoca con el subgrupo WNT de MBs. Cuando se observan valores de metilación elevados en las citosinas SHH1_MB y SHH2_MB y bajos en SHH3_MB, este patrón define de forma univoca y directa el subgrupo SHH. Valores elevados en N-WS1_MB y N-WS2_MB, y bajos en N-WS3_MB son indicadores de un tumor que pertenece al subgrupo no-WNT/no-SHH de MB. En la tabla esquemática descrita a continuación (Tabla 2) pueden verse los patrones de metilación referencia para el panel

WNT-SHH.

Tabla 2. Patrón de metilación referencia de las citosinas que constituyen el Panel WNT-SHH para los subgrupos WNT, SHH y no-WNT/no-SHH.

ID Citosina	no-WNT/no-SHH
WNT1_MB	-
WNT2_MB	-
WNT3_MB	+
N-WS1_MB	+
N-WS2_MB	+
N-WS3_MB	-
SHH1_MB	-
SHH2_MB	-
SHH3_MB	+

ID Citosina	SHH
WNT1_MB	-
WNT2_MB	-
WNT3_MB	+
N-WS1_MB	-
N-WS2_MB	-
N-WS3_MB	+
SHH1_MB	+
SHH2_MB	+
SHH3_MB	-

ID Citosina	WNT
WNT1_MB	+
WNT2_MB	+
WNT3_MB	-
N-WS1_MB	-
N-WS2_MB	-
N-WS3_MB	+
SHH1_MB	-
SHH2_MB	-
SHH3_MB	+

El símbolo “+” representa niveles muy elevados de metilación (promedio valor metilación ≥ 80%), mientras que el símbolo “-” representa niveles muy bajos de metilación (promedio valor metilación ≤ 17%).

Asimismo, los autores de la invención han identificado un segundo panel de 8 citosinas (de aquí en adelante, Panel G3-G4) como marcador para diferenciar de forma eficaz las dos entidades genéticas Grupo 3 y Grupo 4, actualmente incluidas de forma provisional en el subgrupo no-WNT/no-SHH de la OMS.

Tabla 3. Panel G3-G4

Subgrupo	ID Citosina	ID Illumina	Cromosoma	Posición Inicio	Posición Final
Grupo 3	Gr3-A_MB	cg13548946	12	123350077	123350078
Grupo 3	Gr3-B_MB	cg05679609	12	30671926	30671927
Grupo 3	Gr3-C_MB	cg09929238	17	78560916	78560917
Grupo 3	Gr3-D_MB	cg24044478	8	145035191	145035192

Grupo 4	Gr4-A_MB	cg08129331	17	78560478	78560479
Grupo 4	Gr4-B_MB	cg10400652	19	46996516	46996517
Grupo 4	Gr4-C_MB	cg12565585	8	105235943	105235944
Grupo 4	Gr4-D_MB	cg16167052	19	46996347	46996348

Diversas combinaciones de dos o más de estas citosinas tienen la capacidad de clasificar correctamente los MBs en estos subgrupos, siendo dichas combinaciones susceptibles de representar potenciales marcadores adecuados para la clasificación de estos tumores.

Tal y como se puede observar en la Tabla 3, el Panel G3-G4 está formado por 8 citosinas denominadas como Gr3-A_MB, Gr3-B_MB, Gr3-C_MB, Gr3-D_MB, Gr4-A_MB, Gr4-B_MB, Gr4-C_MB y Gr4-D_MB.

Cada subgrupo molecular de MB está asociado de forma específica y unívoca con un patrón de metilación diferencial de las citosinas del Panel G3-G4. Cada citosina muestra un patrón de metilación bimodal específico: niveles muy elevados de metilación (promedio valor metilación ≥ 75%) o al contrario, niveles muy bajos (promedio valor metilación ≤ 20%) para cada uno de los subgrupos.

Aquellos tumores con un patrón de metilación con valores elevados (≥ 75%) en las citosinas Gr3-A_MB, Gr3-B_MB, Gr3-C_MB, Gr3-D_MB, Gr4-A_MB, Gr4-B_MB, Gr4-C_MB y Gr4-D_MB, se asocian de forma específica y unívoca con el subgrupo Grupo 3 de MBs. Mientras que valores bajos en las citosinas Gr3-A_MB, Gr3-B_MB, Gr3-C_MB, Gr3-C_MB, Gr3-D_MB, Gr4-A_MB, Gr4-B_MB, Gr4-C_MB y Gr4-D_MB son indicadores de un tumor que pertenece al subgrupo Grupo 4. En la tabla esquemática descrita a continuación (Tabla 4) pueden verse los patrones de metilación referencia para el panel G3-G4.

Tabla 4. Patrón de metilación de referencia de las citosinas que constituyen el Panel G3-G4 para los subgrupos Grupo 3 y Grupo 4.

ID Citosina	**Grupo 3**
Gr3-A_MB	+
Gr3-B_MB	+
Gr3-C_MB	+
Gr3-D_MB	+
Gr4-A_MB	+

ID Citosina	**Grupo 4**
Gr3-A_MB	-
Gr3-B_MB	-
Gr3-C_MB	-
Gr3-D_MB	-
Gr4-A_MB	-

Gr4-B_MB	+	Gr4-B_MB	-
Gr4-C_MB	+	Gr4-C_MB	-
Gr4-D_MB	+	Gr4-D_MB	-

El símbolo “+” representa niveles muy elevados de metilación (promedio valor metilación ≥ 75%), mientras que el símbolo “-” representa niveles muy bajos de metilación (promedio valor metilación ≤ 20%).

En base a estos desarrollos, en un aspecto principal de la invención se contempla el perfil de metilación de las citosinas del panel WNT-SHH (y sus diferentes combinaciones) para su empleo como marcador para la clasificación de pacientes con MB en los tres subgrupos moleculares definidos por la OMS (2016): WNT, SHH y Grupo no-WNT/no-SHH. Adicionalmente, para aquellos MBs clasificados como no-WNT/no-SHH con el Panel WNT-SHH, se contempla el perfil de metilación de las citosinas del Panel G3-G4 (y sus diferentes combinaciones) para su empleo como marcador para la clasificación de pacientes con MB en los subgrupos moleculares Grupo 3 y Grupo 4.

El análisis del patrón de metilación de las citosinas propuestas permite contrastar los niveles de metilación diferencial entre subgrupos de MB con comportamiento clínico distinto, lo que permite clasificar los tumores según su evolución clínica, y establecer el tratamiento más adecuado para cada paciente.

Los autores de la invención han demostrado que el análisis de dichos marcadores (Panel WNT-SHH y Panel G3-G4) es fácilmente aplicable en la práctica clínica y mejora la relación coste-efectividad de los métodos propuestos hasta la fecha.

Así, en otro aspecto principal de la invención se contempla un método *in vitro* para la clasificación de un paciente con meduloblastoma en uno de los subgrupos moleculares WNT, SHH y grupo no-WNT/no-SHH que comprende los siguientes pasos:

a) Análisis de los niveles de metilación de las citosinas WNT1_MB, WNT2_MB, WNT3_MB, N-WS1_MB, N-WS2_MB, N-WS3_MB, SHH1_MB, SHH2_MB y SHH3_MB, que forman el panel WNT-SHH, o una combinación de las mismas, en el ADN extraído de una muestra biológica aislada del paciente, y

b) Clasificación del paciente en uno de los subgrupos moleculares WNT, SHH y grupo no-WNT/no-SHH en base a los niveles de metilación de las citosinas analizadas del panel WNT-SHH, según los valores de referencia de la Tabla 2.

En una realización particular, para aquellos pacientes clasificados en el paso b) del método de la invención como no-WNT/no-SHH, se llevan a cabo los siguientes pasos adicionales:

c) Análisis de los niveles de metilación de las citosinas Gr3-A_MB, Gr3-B_MB, Gr3-C_MB, Gr3-D_MB, Gr4-A_MB, Gr4-B_MB, Gr4-C_MB y Gr4-D_MB, o una combinación de las mismas, que forman el panel G3-G4, en el ADN extraído de la muestra biológica aislada del paciente, y

d) Clasificación del paciente en uno de los subgrupos moleculares Grupo 3 y Grupo 4 en base a los niveles de metilación de las citosinas analizadas del panel G3-G4, según los valores de referencia de la Tabla 4.

En otro aspecto principal de la invención se contempla el método para la clasificación de un paciente con meduloblastoma en uno de los subgrupos moleculares WNT, SHH, Grupo 3 y Grupo 4, que comprende:

A. Análisis de forma combinada de los niveles de metilación de las citosinas del panel WNT-SHH, o una combinación de las mismas, y del panel G3-G4, o una combinación de las mismas, en el ADN extraído de una muestra biológica aislada del paciente, y

B. Clasificación del paciente en uno de los subgrupos moleculares WNT, SHH, Grupo 3 y Grupo 4, en base a los niveles de metilación las citosinas analizadas del panel WNT-SHH y del panel G3-G4, según los valores de referencia de las Tablas 2 y 4.

A efectos de la presente invención, la expresión “una combinación de las mismas” se refiere a cualquier combinación de dos o más citosinas de aquellas que forman los paneles WNT-SHH o G3-G4.

Para la realización del método de clasificación de la invención se parte de una muestra biológica aislada de un paciente y se procede con la extracción de ADN, mediante

protocolos convencionales, tratamiento del ADN y posterior análisis de los niveles de metilación de cada una de las citosina de interés. Los datos obtenidos se comparan con el panel de metilación referencia de citosinas para así establecer el subgrupo molecular al cual pertenece el tumor.

El método de clasificación de la invención puede ser realizado mediante diversas metodologías moleculares y aplicables a diversos tipos de tejido. De esta forma, el método de la invención permite su aplicación en la práctica clínica de la mayoría de los centros hospitalarios que tratan tumores pediátricos del sistema nervioso.

En una realización preferida del método de clasificación de la invención, la muestra biológica empleada es tejido tumoral. En este caso, el método de clasificación molecular comprende obtener una muestra de tejido tumoral de meduloblastoma para el análisis del patrón de metilación de las citosinas del Panel WNT-SHH, del Panel G3-G4 o de la combinación de citosinas de ambos paneles.

La muestra tumoral del paciente representa una porción de la pieza de tumor obtenida mediante cirugía o una biopsia del tejido tumoral. De forma preferida, la muestra tumoral utilizada para la realización del método de la invención tiene un contenido de célula tumoral viable superior al 70% (determinado por un anatomopatólogo).

Dicha muestra puede ser obtenida bien a partir de biopsia tumoral en fresco sin fijar (F), o de biopsia tumoral congelada (FF, del inglés fresh frozen) conservada a -80ºC o bien fijada en formalina tamponada al 10% y embebida en parafina (FFPE, del inglés formalin fixed paraffin embedded).

En una realización particular del método de clasificación de la invención, la muestra biológica es tejido tumoral en fresco (F). En este caso, el método de clasificación de MB comprende utilizar una muestra de tejido tumoral en fresco de meduloblastoma para el análisis del patrón de metilación de la combinación de citosinas del Panel WNT-SHH y Panel G3-G4.

En otra realización particular del método de clasificación de la invención la muestra biológica es tejido tumoral congelado (FF) y almacenado a -80ºC hasta su uso. En este

caso, el método de clasificación de MB comprende utilizar una muestra de tejido tumoral almacenado congelado de MB para el análisis del patrón de metilación de las diferentes combinaciones de citosinas del Panel WNT-SHH y Panel G3-G4.

En otra realización particular del método de clasificación de la invención la muestra biológica es tejido tumoral fijado en formalina tamponada al 10% y embebido en parafina (FFPE), por lo que pueden evaluarse muestras obtenidas en un laboratorio de anatomía-patológica estándar.

A los fines de la invención, la cuantificación/análisis de los niveles de metilación de las citosinas que constituyen la invención se puede llevar a cabo mediante técnicas que permitan determinar de forma directa o indirecta el estado de metilación de una secuencia de interés.

Así, el patrón de metilación de las citosinas del Panel WNT-SHH y/o Panel G3-G4 puede ser analizado mediante diversas técnicas aplicables al análisis de metilación del ADN como, por ejemplo, la tecnología de microarrays y técnicas moleculares basadas en la conversión del ADN con bisulfito de sodio, complementadas con la amplificación por una reacción en cadena de la ADN polimerasa (PCR, del inglés Polymerase Chain Reaction) y métodos de secuenciación (secuenciación por bisulfito y pirosecuenciación por bisulfito).

La conversión del ADN con bisulfito de sodio ($NaHSO_3$) es el paso inicial de varias técnicas, la mayoría de las cuales son complementadas con la amplificación por una reacción en cadena de la ADN polimerasa (PCR). La PCR es una técnica de amplificación selectiva *in vitro* de un fragmento concreto de ADN. El método se basa en una fase de desnaturalización de la doble hélice de ADN y la unión específica de dos oligonucleótidos (primers) que flanquean la región a amplificar y sirven de cebadores para iniciar la síntesis del fragmento. La extensión de la cadena a partir de los cebadores se obtiene por acción de una polimerasa específica que soporta altas temperaturas sin desnaturalizarse. Este proceso en 3 pasos se repite durante 25-40 ciclos en un aparato específico (termociclador) de forma que se consigue una amplificación exponencial del fragmento de interés.

El bisulfito induce la desaminación de las citosinas no metiladas las cuales se convierten en uracilos, mientras que las 5-metil citosinas no se ven afectadas y permanecen como citosinas. A continuación se procede con la amplificación con PCR de los fragmentos

génicos de interés mediante el empleo de cebadores específicos para alelos metilados y alelos no metilados. A partir de aquí, cualquier método para detectar un cambio de nucleótido (secuenciación) puede ser utilizado para identificar la metilación en la secuencia de interés.

La secuenciación específica por bisulfito (BSP) permite realizar un mapeo de metilaciones alelo-específicas en citosinas de interés, añadiendo la posibilidad de observar las metilaciones, además de la secuencia nucleotídica. Para el análisis de citosinas metiladas, se compara la secuencia tratada con bisulfito con la secuencia control que no ha sido sometida a la acción del bisulfito. Aquellas citosinas que estuviesen metiladas aparecerán tras la PCR y la secuenciación como citosinas, mientras que en la muestra donde el bisulfito las ha trasformado en uracilo, serán observadas como una timina (*Darst RP et al. Bisulfite Sequencing of DNA. Current Protocols of Molecular Biology (2010) doi:10.1002/0471142727.mb0709s91*). La secuenciación por bisulfito es una variante de la secuenciación automatizada, según el método Sanger.

La secuenciación de ácidos nucleicos según el método Sanger es una metodología empleada para determinar el orden de los nucleótidos en un fragmento de ADN. El principio del método Sanger es la utilización de dideoxinucleótidos trifosfatos (ddNTPs) (*Sanger F, Nicklen S and Coulson AR. (1977) DNA sequencing with chain-terminating inhibitor. Proc Natl Acad Sci USA, 74(12): 5463-5467*). Estos carecen del grupo hidroxilo del carbono 3' y su uso en una reacción de elongación de ADN implica que al incorporarse a la cadena esta no puede continuar la elongación, produciéndose varios fragmentos de ADN truncados de longitud variable. La identidad del nucleótido que termina la cadena en cada posición puede identificarse realizando cuatro reacciones por separado utilizando en cada una de ellas un ddNTP distinto (ddATP, ddCTP, ddTTP o ddGTP) (*França LT et al. A review of DNA sequencing techniques. Q Rev Biophys 2002; 35(2):169-200*). Actualmente se utilizan ddNTPs marcados con fluorescencia, cada uno de ellos con un fluoróforo distinto, lo que permite realizar una única reacción de secuencia que incluye todos los ddNTPs (*França LT et al*). Así mismo, se ha automatizado el proceso. Para determinar la secuencia de ADN se carga la mezcla de síntesis en una máquina de secuenciación automatizada basada en electroforesis capilar. Estas máquinas utilizan un sistema capilar para la separación rápida de los fragmentos y un detector óptico que registra la emisión fluorescente, dando como resultado un cromatograma o electroferograma (gráfico de picos de colores, T rojo, G

negro, C azul y A verde), de manera que viendo la sucesión de picos se puede leer (existen programas informáticos específicos) la secuencia que ha pasado por el capilar. De esta manera permite detectar la presencia de modificaciones respecto a una secuencia referencia normal.

Así, en realizaciones particulares de la invención, el análisis de los niveles de metilación de las citosinas de interés, en ADN previamente tratado con bisulfito, se lleva a cabo por secuenciación específica de ADN tratado con bisulfito (BSP).

La pirosecuenciación es un método de secuenciación del ADN que permite cuantificar en tiempo real la liberación de los pirofosfatos (PPi) que tiene lugar en el momento en que los nucleótidos son incorporados en la reacción de síntesis del ADN. Se parte, como en el método Sanger, de una secuencia de interés y unos cebadores específicos, con enzimas y substrato, y nucleótidos sin marcar. La ADN polimerasa une un dNTP liberando PPi en el proceso. La enzima ATP-sulfurilasa convierte el PPi en ATP con ayuda del adenosin-fosfosulfato (APS). La luciferasa convierte el ATP en luz, con ayuda de la luciferina. El resultado final es, como con el método Sanger, picos de intensidad que permiten leer la secuencia del ADN. El análisis de los patrones de metilación del ADN mediante pirosecuenciación combina la sencillez del protocolo con la reproducibilidad, especificidad y la precisión del análisis, comparable con metodologías de alta resolución. La pirosecuenciación de ADN tratado con bisulfito permite un análisis cuantitativo y preciso de la metilación basándose en la secuenciación por síntesis.

Así, en otra realización particular del método de clasificación de la invención, el análisis de los niveles de metilación de las combinaciones de citosinas que constituyen el Panel WNT-SHH y/o Panel G3-G4 se lleva a cabo mediante la metodología de pirosecuenciación del ADN convertido por bisulfito.

El valor de esta estrategia de clasificación molecular viene dado tanto por el número reducido de citosinas que componen el Panel WNT-SHH y Panel G3-G4, como por la viabilidad a nivel técnico (pirosecuenciación, BSP u otras técnicas que permitan determinar de forma directa o indirecta el estado de metilación del ADN), la aplicabilidad a biopsias de tejido tumoral pequeñas obtenidas F y/o FF (F/FF) y/o FFPE, la elevada precisión, rapidez, fácil interpretación y reproducibilidad de los resultados, y por el bajo coste económico.

En otro aspecto principal de la invención se contempla un kit para llevar a cabo el método *in vitro* para la clasificación de un paciente con meduloblastoma en uno de los subgrupos moleculares WNT, SHH y grupo no-WNT/no-SHH que comprende:

- Un set de oligonucleótidos adecuado para el análisis de los niveles de metilación de las citosinas del panel WNT-SHH; y
- Todos los reactivos adecuados para la metodología empleada en el análisis de la metilación de dichas citosinas.

El set de oligonucleótidos empleado para analizar el estado de metilación de las citosinas que constituyen el Panel WNT-SHH, mediante metodología BSP, son cebadores para secuenciación específicos para las citosinas de interés (citosinas problema y citosinas para el control de la eficiencia de la reacción de conversión del ADN con bisulfito sódico). En realizaciones preferidas, los oligonucleótidos empleados se seleccionan de aquellos que presentan las secuencias mostradas en SEQ ID No 1-18, específicas para las citosinas problema, y SEQ ID No 48, 49, 51, 52, 54, 55, 57, 58, 60, 61, 63, 64, 66, 67, 69 y 70, específicas para las citosinas control, y sus combinaciones.

Los oligonucleótidos empleados para analizar el estado de metilación de las citosinas que constituyen el Panel WNT-SHH mediante metodología de pirosecuenciación, son cebadores y/o sondas de hibridación biotiniladas específicas para las citosinas de interés (citosinas problema y citosinas control de la conversión del ADN con bisulfito). En realizaciones preferidas, los oligonucleótidos empleados se seleccionan de aquellos que presentan las secuencias mostradas en SEQ ID 1-6, 9-14, 17, 18 y 35-47, específicas para las citosinas problema, y SEQ ID NO 48-71, específicas para las citosinas control, y sus combinaciones.

En otro aspecto principal de la invención se contempla un kit para llevar a cabo el método *in vitro* para la clasificación de un paciente con meduloblastoma en uno de los subgrupos moleculares WNT, SHH, grupo 3 y grupo 4 que comprende:

- Un set de oligonucleótidos adecuado para el análisis de los niveles de metilación de las citosinas del Panel WNT-SHH y G3-G4, en combinación; y
- Reactivos adecuados para la metodología empleada en el

análisis de la metilación de dichas citosinas.

En realizaciones particulares, el set de oligonucléotidos empleado para analizar el estado de metilación de las citosinas que constituyen el Panel WNT-SHH y el Panel G3-G4 mediante metodología BSP, son cebadores para secuenciación, específicos para las citosinas de interés (citosinas problema y citosinas para el control de la eficiencia de la reacción de conversión del ADN con bisulfito sódico). En realizaciones preferidas, los oligonucleótidos empleados se seleccionan de aquellos que presentan secuencias mostradas en SEQ ID NO 1-34, siendo los oligonucleótidos de secuencias SEQ ID NO 1-18 específicos para las citosinas problema del panel WNT-SHH, y los oligonucleótidos de secuencias SEQ ID NO 19-34 específicos para las citosinas problema del panel G3-G4, y oligonucleótidos de secuencias SEQ ID No 48, 49, 51, 52, 54, 55, 57, 58, 60, 61, 63, 64, 66, 67, 69 y 70, específicos para las citosinas control, y sus combinaciones.

En otra realización particular del método de clasificación de la invención, el set de oligonucleótidos empleado para analizar el estado de metilación de las citosinas que constituyen el Panel WNT-SHH y el Panel G3-G4 mediante metodología de pirosecuenciación, son cebadores y/o sondas de hibridación biotinilados específicos para las citosinas de interés (citosinas problema y citosinas control de la conversión del ADN con bisulfito). En realizaciones preferidas, los oligonucleótidos empleados se seleccionan de aquellos que presentan secuencias mostradas en SEQ ID NO 1-6, 9-14, 17-47 y 72-79, siendo los oligonucleótidos de secuencias SEQ ID NO 1-6, 9-14, 17, 18, 35-47, específicos para las citosinas problema del panel WNT-SHH y los oligonucleótidos de secuencias SEQ ID NO 19-34 y 72-79, específicos para las citosinas problema del panel G3-G4, y los oligonucleótidos de secuencias SEQ ID NO 48-71, específicos para las citosinas control, y combinaciones de los mismos.

En una realización preferida, el kit de la presente invención incluye: oligonucleótidos de tipo específicos para la metodología empleada, para la combinación de citosinas del Panel WNT-SHH y/o Panel G3-G4, oligonucleótidos de tipo específicos para las citosinas referencia control positivo/negativo, una mezcla maestra (*master mix*) que contiene una Taq polimerasa termoestable, un tampón adecuado y $MgCl_2$ a concentraciones optimas, además de los dNTPs optimizados para la metodología.

Finalmente, en otro aspecto principal, la presente invención contempla el conjunto de oligonucleótidos, de secuencias SEQ ID NO 1-79, diseñados para su empleo en el análisis de los niveles de metilación de las citosinas del panel WNT-SHH y/o G3-G4.

EJEMPLOS

Ejemplo 1

Identificación del panel de citosinas con metilación diferencial capaces de discriminar los subgrupos moleculares de meduloblastoma.

El estudio partió de la hipótesis de que existen patrones de metilación diferencial entre los subgrupos moleculares de meduloblastoma (MB) con claras diferencias de comportamiento clínico o biológicamente distintos, y que estos perfiles de metilación son susceptibles de poder representar un marcador molecular de clasificación en pacientes con MB.

Patrones de metilación

En primer lugar se realizó un análisis de los patrones de metilación del ADN de un total de 106 meduloblastomas primarios obtenidos en fresco y/o FF en el momento del diagnóstico. Los datos de metilación del ADN fueron obtenidos mediante tecnología de microarray de alta densidad (*Illumina Human Methylation BeadChip 450K, HM450K*). Estos datos de metilación fueron generados en el contexto de estudios genómicos que han identificado y descrito la presencia de cuatro subgrupos moleculares principales de MB: *wingless* (WNT), *Sonic hedgehog* (SHH), *Grupo 3* y *Grupo 4*.

Como parte de la validación de los resultados se realizaron estudios comparativos con diversos tumores del SNC y tejidos normales, utilizando diversas bases de datos de metilación generadas mediante HM450k. Los datos genómicos de metilación del ADN utilizados en el estudio, junto a datos clínico-biológicos y clasificación molecular de las muestras, se encuentran disponibles en el repositorio público del National Center of Biotechnology Information (NCBI) Gene Expression Omnibus (GEO) (www.ncbi.nlm.nih.gov/gds). Las bases de datos utilizadas se muestran en las Tablas 5 y 6.

Tabla 5. Bases de datos de Meduloblastoma empleadas en el estudio

GEO* ID	Título	Muestras	Enlace
GSE54880	*Microarray-based DNA methylation profiling of medulloblastoma and normal cerebellum samples*	106	https://www.ncbi.nlm.nih.gov/geo/query/acc.cgi?acc=GSE54880
GSE54880	*Microarray-based DNA methylation profiling of medulloblastoma and normal cerebellum samples*	169	https://www.ncbi.nlm.nih.gov/geo/query/acc.cgi?acc=GSE54880

**Gene Expression Omnibus* (GEO): repositorio de bases de datos genómicas. https://www.ncbi.nlm.nih.gov/geo

Tabla 6. Bases de datos de tumores y tejidos normales empleadas en el estudio

GEO ID	Título	Muestras	Enlace
GSE30654	*Recurrent Variations in DNA Methylation in Human Pluripotent Stem Cells and their Differentiated Derivatives*	40	https://www.ncbi.nlm.nih.gov/geo/query/acc.cgi?acc=GSE30654
GSE36278	*Methylation data from glioblastoma tumor samples*	126	https://www.ncbi.nlm.nih.gov/geo/query/acc.cgi?acc=GSE36278
GSE44684	*DNA methylation data from pilocytic astrocytoma tumor samples and normal cerebellum controls*	54	https://www.ncbi.nlm.nih.gov/geo/query/acc.cgi?acc=GSE44684
GSE45353	*Epigenomic Alterations Define Lethal CIMP-positive Ependymomas of Infancy*	48	https://www.ncbi.nlm.nih.gov/geo/query/acc.cgi?acc=GSE45353
GSE50022	*Illumina Infinium 450K array data for Diffuse Intrinsic Pontine Glioma*	24	https://www.ncbi.nlm.nih.gov/geo/query/acc.cgi?acc=GSE50022
GSE50798	*Differences in DNA methylation between human neuronal and glial cells are concentrated in enhancers and non-CpG sites*	24	https://www.ncbi.nlm.nih.gov/geo/query/acc.cgi?acc=GSE50798
GSE54719	*DNA methylation changes at CpG and non-CpG sites are associated with development and clinical behavior in neuroblastoma*	41	https://www.ncbi.nlm.nih.gov/geo/query/acc.cgi?acc=GSE54719
GSE54880	*Microarray-based DNA methylation profiling of medulloblastoma and*	8	https://www.ncbi.nlm.nih.gov/geo/query/acc.cgi?acc=GSE54880

	normal cerebellum samples		
GSE55712	*Genome wide methylation profliling of pediatric glioblastomas*	98	https://www.ncbi.nlm.nih.gov/geo/query/acc.cgi?acc=GSE55712
GSE65306	*Comprehensive genomic analysis of relapse neuroblastoma*	14	https://www.ncbi.nlm.nih.gov/geo/query/acc.cgi?acc=GSE65306
GSE70460	*The genomic and epigenomic landscape of atypical teratoid rhabdoid tumors*	150	https://www.ncbi.nlm.nih.gov/geo/query/acc.cgi?acc=GSE70460
GSE70737	*An integrative analysis of reprogramming in human isogenic system identified a clone selection criterion*	7	https://www.ncbi.nlm.nih.gov/geo/query/acc.cgi?acc=GSE70737

**Gene Expression Omnibus* (GEO): repositorio de bases de datos genómicas. https://www.ncbi.nlm.nih.gov/geo

El estudio realizado partió de los datos genómicos brutos (archivos denominados *Intensity Data files* - iDat) incluidos en la base de datos GSE54880, generados a partir de un total de 106 meduloblastomas (cohorte de estudio) primarios obtenidos en fresco en el momento del diagnóstico (Tabla 5). A partir de los archivos iDat de la cohorte de estudio se generó una única base de datos. A continuación, se procedió con la normalización, el control de calidad y filtrado de los datos de metilación, según se ha descrito previamente (*Gomez S et al. DNA methylation fingerprint of neuroblastoma reveals new biological and clinical insights. Genomics Data 2015, 5: 360-363 Gomez S et al. DNA methylation fingerprint of neuroblastoma reveals new biological and clinical insights. Epigenomics 2015: 1-17; Kulis et al., Epigenomic analysis detects widespread gene-body DNA hypomethylation in chronic lymphocytic leukemia. Nature Genetics 2012, 44(11):1236-1242*). Para ello se utilizaron paquetes de herramientas de bioinformática disponibles a través de R/Bioconductor (http://www.bioconductor.org/).

La calidad de las muestras fue evaluada utilizando el logaritmo de la mediana de las diversas capturas de intensidad de metilación. Se procedió con un análisis de la distribución de la dispersión de los datos brutos mediante *density plots* (diagrama de distribución de la variabilidad) (Figura 1A) y *scatter plots* (diagrama de dispersión) (Figura 1B) con el fin de identificar muestras con valores de metilación que se alejan respecto a la media. La normalización se llevó a cabo utilizando la función SWAN (*subset-quantile within*

array normalization) en el contexto de la metodología de normalización específica para el *microarray* HM450k, que puede obtenerse de los paquetes *minfi* (*Aryee MJ. et al. Bioinformatics 2014; 30(10), 1363-1369*) y ChAMP (*Morris TJ et al. ChAMP: 450k Chip Analysis Methylation Pipeline. Bioinformatics 2014, 30(3):428-430; Morris TJ et al. The ChAMP Package (2016) Human Methylation EPIC Analysis* www.bioconductor.org/packages/devel/bioc/vignettes/ChAMP/inst/doc/ChAMP.pdf); *Butcher LM and Beck S Probe Lasso: A novel method to rope in differentially methylated regions with 450K DNA methylation data. Methods 2015, 72, pp. 21-28. doi: 10.1016*) entre otros (Figura 1C).

A partir de este punto se procedió con el filtrado de los datos. Para ello se utilizó un *"pipeline*" (cadena de elementos de procesamiento) que incluyó diversos filtros, con el fin de evitar un sesgo (*Kulis et al., Epigenomic analysis detects widespread gene-body DNA hypomethylation in chronic lymphocytic leukemia. Nature Genetics 2012, 44(11):1236-1242; Gomez S et al. DNA methylation fingerprint of neuroblastoma reveals new biological and clinical insights. Genomics Data 2015, 5: 360-363 Gomez S et al. DNA methylation fingerprint of neuroblastoma reveals new biological and clinical insights. Epigenomics 2015: 1-17)*. Las citosinas con valores de detección con un valor P > 0.01 en más del 10% de las muestras, así como aquellos datos de metilación asociados a la impronta de metilación establecida de manera sexo-específica, fueron excluidas de la base de datos inicial (485,512 citosinas por cada muestra). Los restantes valores (n=475.038 CpG) constituyeron la base de datos de partida para el estudio.

Tras la normalización y filtrado de los datos se procedió con el análisis de los patrones de metilación del ADN mediante el método estadístico multivariante no supervisado denominado Análisis de Componentes Principales (ACP).

El Análisis de Componentes Principales es una técnica matemática lineal de síntesis de la información, o reducción de la dimensión de un conjunto de datos (número de variables). Es decir, ante una base de datos con muchas variables (en este caso, listas de citosinas con distintos estados de metilación), el objetivo será reducirlas a un menor número perdiendo la menor cantidad de información posible. Los nuevos componentes principales o factores serán una combinación lineal de las variables originales, y además serán independientes entre sí.

Un aspecto clave en ACP es la interpretación de los factores, ya que ésta no viene dada a priori, sino que será deducida tras observar la relación de los factores con las variables iniciales. Al tratarse de un método estadístico no-supervisado el ACP no tiene en cuenta las variables clínicas.

Un análisis de componentes principales tiene sentido si existen altas correlaciones entre las variables, ya que esto es indicativo de que existe información redundante y, por tanto, pocos factores explicarán gran parte de la variabilidad total.

Se llevó a cabo un análisis de la distribución de la variabilidad (*densisty plot*) de los niveles de metilación de ADN en las muestras, con el fin de identificar las citosinas con mayor variabilidad y por tanto más significativas. Se identificaron 5.904 citosinas (1,2% de la totalidad de la citosinas estudiadas) aplicando una desviación estándar mayor o igual a 0,30 (Figura 2A).

El análisis mediante ACP muestra como los niveles de metilación de las 5.904 citosinas seleccionadas (SD≥0,3) reagrupan las muestras de MB en subgrupos distintos; dos subgrupos claramente diferenciados y distanciados de los otros dos localizados más adyacentes entre ellos (Figura 2B).

Asimismo, se aplicó otro método no supervisado denominado de *clustering* (agrupación) jerárquico. El *clustering* no supervisado es un conjunto de técnicas que reagrupan los datos en función de una distancia sin utilizar ningún tipo de información externa para organizar los grupos. El *clustering* jerárquico es un método basado en una matriz de distancias. Establece grupos de condiciones que tienen un patrón común/similar y construye un dendrograma (representación gráfica de un grupo de relaciones basada en la cercanía o similitud de los datos). El dendrograma establece una relación ordenada de los grupos previamente definidos y la longitud de sus ramas es una representación de la distancia entre los distintos nodos del mismo.

Para el análisis de *clustering* jerarquico no supervisado, se utilizaron los niveles de metilación de las citosinas con SD≥0,3 (5.904 citosinas). De forma similar a los resultados obtenidos mediante ACP, el dendrograma generado por el *clustering* jerárquico mostró cuatro subgrupos con patrones de metilación diferencial, siendo dos de ellos más similares

y heterogéneos entre ellos (Figura 2C).

Tras un análisis comparativo entre los subgrupos generados mediante ACP y *clustering* jerárquico y los datos clínico-biológicos disponibles, se corroboró como los subgrupos de muestras se asociaban de forma significativa con los subgrupos moleculares descritos previamente: WNT, SHH, Grupo 3 y Grupo 4 (Figura 2C).

A continuación los autores de la invención ahondaron en el análisis de los datos de metilación de las 5.904 citosinas más significativas, con el fin de perfilar los patrones de metilación diferencial y conseguir reducirlos a un menor número de citosinas perdiendo la menor cantidad de información posible. El objetivo principal era reducir la información de metilación del ADN redundante para identificar un patrón de metilación compuesto de pocos factores (citosinas) que explicarán gran parte de la variabilidad total del MB.

Partiendo del análisis no supervisado (SD≥0,3) de 5.904 citosinas en 106 muestras F/FF de MB, se seleccionaron aquellas citosinas que cumplían los siguientes criterios: 1) SD menor de 0,1 entre las citosinas del mismo subgrupo de MB y 2) el promedio de cada subgrupo con mayor diferencia con los otros subgrupos de interés.

A partir de los patrones de metilación de las 5.904 citosinas, se identificaron dos conjuntos de citosinas que cumplían los criterios de selección deseados. A partir de estos patrones de metilación, se seleccionó un primer panel de nueve citosinas diferencialmente metiladas, con un patrón de metilación diferencial que se asoció de forma significativa y precisa con cada uno de los subgrupos moleculares definidos de acuerdo a la clasificación de los tumores del sistema nervioso central de la OMS (2016): WNT, SHH y Grupo no-WNT/no-SHH.

El análisis mediante ACP utilizando únicamente las nueve citosinas seleccionadas, mostró la capacidad de estas citosinas de distinguir los tres subgrupos de MBs de forma similar a las 5.904 citosinas (Figura 3A).

De esta forma se demostró que este panel de nueve citosinas (Panel WNT-SHH) es eficaz para establecer las tres entidades genéticas WNT, SHH, y no-WNT/no-SHH y puede representar un marcador de clasificación útil en pacientes con MB.

Cada subgrupo se asoció de forma específica y univoca con un patrón de metilación diferencial de las citosinas del Panel WNT-SHH. Cada citosina mostró un patrón de metilación bimodal especifico (niveles muy elevados de metilación; promedio valor metilación ≥ 80%), o al contrario, niveles muy bajos; promedio valor metilación ≤ 17%) para cada uno de los subgrupos, tal y como se recoge en la Tabla 7 y Figura 3B.

Tabla 7. Ejemplo del patrón y porcentaje de metilación de las citosinas del panel WNT-SHH en la cohorte de estudio F/FF (n=106)

	No-WNT/no-SHH	**SHH**	**WNT**
WNT1_MB	8%	9%	88%
WNT2_MB	2%	2%	85%
WNT3_MB	92%	91%	12%
N-WS1_MB	89%	16%	17%
N-WS2_MB	80%	11%	15%
N-WS3_MB	9%	88%	87%
SHH1_MB	14%	90%	13%
SHH2_MB	6%	88%	18%
SHH3_MB	96%	11%	96%

Aquellos tumores con un patrón de metilación con valores elevados en las citosinas WNT1_MB y WNT2_MB y niveles bajos de metilación en WNT3_MB, se asociaron de forma específica e univoca con el subgrupo WNT de MBs. Cuando se observaron valores de metilación elevados en las citosinas SHH1_MB y SHH2_MB y bajos en SHH3_MB, este patrón definía de forma univoca y directa el subgrupo SHH. Valores elevados en N-WS1_MB y N-WS2_MB, y bajos en N-WS3_MB era indicador de un tumor que pertenece al subgrupo no-WNT/no-SHH de MB (Tabla 7 y Figura 3B).

Con el fin de investigar la capacidad de clasificación del panel de nueve citosinas, se procedió con la determinación del subgrupo molecular de la cohorte de estudio de 106 MBs según el patrón de metilación del Panel WNT-SHH (Tabla 7). Se realizó el análisis de los datos de metilación mediante un Análisis Discriminante.

El Análisis Discriminante Lineal (LDA, del inglés *Lineal Discriminant Analysis*) es una técnica estadística que permite identificar las características que diferencian (discriminan) a dos o más grupos y a crear una función capaz de distinguir con mayor precisión posible los miembros de dos o más grupos. El LDA permite identificar qué variables permiten diferenciar a los grupos y cuántas de estas variables son necesarias para alcanzar la mejor clasificación posible. La pertenencia a los grupos, conocida de antemano, se utiliza como variable dependiente (variable categórica). Las variables (variables continuas) que diferencian los grupos se utilizan como variables de clasificación (variables discriminantes).

El análisis discriminante se realizó mediante la función LDA contenida en el paquete MASS (*Modern Applied Statistics with S, Venables and Ripley, 2002*) en R (https://cran.r-project.org/), según se ha descrito previamente (*Queirós AC et al. Leukemia (2015) 29,598-605*).

Se utilizaron los valores de metilación de las nueve citosinas del Panel WNT-SHH de la cohorte de estudio para entrenar la función LDA y generar un modelo LDA de clasificación. Se aplicó la función LDA también para testar todas las posibles combinaciones (2^9 combinaciones) para definir qué citosinas y cuántas de éstas eran necesarias para obtener la mejor clasificación posible. Tanto las nueve citosinas como todas las posibles combinaciones (2^9 combinaciones) permitieron clasificar la totalidad de las muestras de la cohorte y se observó una concordancia del 100% entre la clasificación realizada con las diversas combinaciones del Panel WNT-SHH y los datos publicados previamente con la misma cohorte de MB. Esto resultados demuestran como diversas combinaciones de estas citosinas tienen la capacidad de clasificar correctamente los MBs y que dichas combinaciones son susceptibles de representar potenciales marcadores adecuados para la clasificación de estos tumores.

Posteriormente se evaluó la especificidad del patrón de metilación. Un análisis comparativo de los valores de metilación de las nueve citosinas en otros tumores y tejido humanos normales, mostró una elevada especificidad del patrón de metilación del Panel WNT-SHH para MB (Figura 3C).

Para identificar el segundo patrón de metilación de ADN que se asocia de forma significativa y específica con los subgrupos Grupo 3 y Grupo 4 se aplicaron los siguientes

criterios de selección: 1) SD menor de 0,1 entre las citosinas del mismo subgrupo de MB y 2) el promedio de cada subgrupo con mayor diferencia con el otro subgrupo, obteniendo el patrón de metilación diferencial de 8 citosinas que constituyen el Panel G3-G4 (Tabla 8).

Para aquellos MBs clasificados como no-WNT/no-SHH con el Panel WNT-SHH de nueve citosinas, se contempló a continuación el empleo conjunto de los niveles de metilación del Panel G3-G4 para poder distinguir y clasificar los tumores no-WNT/no-SHH en Grupo 3 o Grupo 4.

El análisis mediante PCA mostró la capacidad del Panel G3-G4 de discriminar el Grupo 3 y el Grupo 4 de forma significativa (Figura 4A). El Panel G3-G4 es susceptible de poder representar un marcador útil para la clasificación de MBs pertenecientes a las entidades genéticas Grupo 3 y Grupo 4 (Tabla 8).

Aquellos tumores con un patrón de metilación con valores elevados (≥ 75%) en las citosinas Gr3-A_MB, Gr3-B_MB, Gr3-C_MB, Gr3-D_MB, Gr4-A_MB, Gr4-B_MB, Gr4-C_MB y Gr4-D_MB, se asocian de forma específica y unívoca con el subgrupo Grupo 3 de MBs. Mientras que valores bajos en las citosinas Gr3-A_MB, Gr3-B_MB, Gr3-C_MB, Gr3-D_MB, Gr4-A_MB, Gr4-B_MB, Gr4-C_MB y Gr4-D_MB es indicador de un tumor que pertenece al subgrupo Grupo 4 (Tabla 8 y Figura 4B).

Tabla 8. Ejemplo del patrón y porcentajes de metilación de las citosinas del panel G3-G4 en la cohorte de estudio F/FF (n=106)

	G3	**G4**
Gr3-A_MB	82%	26%
Gr3-B_MB	84%	22%
Gr-3-C_MB	79%	18%
Gr-3-D_MB	86%	28%
Gr-4-A_MB	66%	14%
Gr-4-B_MB	72%	19%
Gr-4-C_MB	72%	7%
Gr-4-D_MB	78%	27%

Del mismo modo que con el Panel WNT-SHH, se procedió con el desarrollo de un modelo

LDA de predicción de los subgrupos 3 y 4 utilizando los datos de metilación de la cohorte de estudio de las citosinas de Panel G3-G4. Asimismo se testaron todas las posibles combinaciones (2^8 combinaciones) para definir qué citosinas y cuántas de estas son necesarias para obtener la mejor clasificación posible. Tanto las ocho citosinas, como sus posibles combinaciones, permitieron clasificar la totalidad de las muestras de la cohorte y se observó una concordancia del 100% entre la clasificación realizada con las diversas combinaciones del Panel G3-G4 y los datos publicados previamente con la misma cohorte de MB. Esto resultados demuestran como diversas combinaciones de estas citosinas tienen la capacidad de clasificar correctamente los MBs y que dichas combinaciones son susceptibles de representar potenciales marcadores adecuados para la clasificación de estos tumores.

De forma similar al Panel WNT-SHH, el Panel G3-G4 mostró una elevada especificidad del patrón de metilación de las ocho citosinas en MB en comparación con los valores de metilación en otros tumores y tejido humanos normales (Figura 4C).

Conclusión ejemplo 1:

Existen perfiles de metilación del ADN específicos capaces de discriminar nítidamente entre subgrupos moleculares de MB. Estos patrones de metilación asociados con el comportamiento clínico de los tumores meduloblastoma, son susceptibles de poder representar un marcador molecular de estratificación que contribuya a una clasificación más precisa y rápida de los diferentes subtipos de MB.

Ejemplo 2

Validación de un método de clasificación de Meduloblastoma utilizando bases de datos de microarrays de metilación del ADN.

A partir de este punto el objetivo del estudio fue comprobar si las citosinas seleccionadas para el Panel WNT-SHH y Panel G3-G4 eran eficaces para distinguir y clasificar las entidades genéticas descritas como WNT, SHH, Grupo 3 y Grupo 4 en MB.

Validación: base de datos de microarrays de MB primarios fijados en formalina e incluidos en parafina.

Para ello, los autores de la invención partieron de una base de datos de metilación del ADN

generada con una primera cohorte independiente de muestras (cohorte de validación) (n = 169; 15 WNT, 39 SHH, 42 G3 y 73 G4) de MB fijados en formalina e incluidos en parafina (FFPE) en el momento del diagnóstico. Los datos de metilación del ADN fueron obtenidos mediante tecnología de microarray de alta densidad (*Illumina HumanMethylation BeadChip450k*, HM450K). Estos datos de metilación fueron generados en el contexto de estudios genómicos previamente publicados (*Hovestadt V et al. Robust molecular subgrouping and copy-number profiling of medulloblastoma from small amounts of archival tumor material using high-density DNA methylation arrays. Acta Neuropathologica 2013, 125:913-916*). Dichos datos genómicos de metilación del ADN, junto a datos clínico-biológicos de las muestras, se encuentran disponibles en el repositorio público del National Center of Biotechnology Information (NCBI) Gene Expression Omnibus (GEO) (www.ncbi.nlm.nih.gov/gds); número de referencia de la base de datos: GSE54880. Las bases de datos utilizadas por los autores de la invención se muestran en la Tablas 5 y 6.

El estudio realizado por los autores de la invención partió de los datos genómicos brutos (archivos denominados iDat files del inglés Intensity Data files) de la cohorte de validación (Tabla 5 y 6). A partir de los archivos iDat se generó una única base de datos. A continuación, se procedió con la normalización, el control de calidad y filtrado de los datos de metilación, según los procedimientos descritos en el Ejemplo 1.

A partir de este punto, se extrajeron los datos de metilación correspondientes a las citosinas incluidas en el Panel WNT-SHH y Panel G3-G4, y se procedió con el análisis de los patrones de metilación y con la comparación con los datos de los subgrupos moleculares.

El análisis mediante ACP utilizando únicamente las nueve citosinas de la base de datos de validación correspondientes al Panel WNT-SHH, mostraban distribución de las muestras equivalente a la obtenida con la de la cohorte de estudio (Figura 3A y 5A). De forma similar, las citosinas de la cohorte de validación se asociaban de forma significativa y específica con las tres entidades genéticas definidas por la OMS (2016): WNT, SHH y Grupo no-WNT/no-SHH de MB (Tabla 9).

Similar al patrón original del Panel WNT-SHH (Tabla 7), en la cohorte de validación cada subgrupo se asoció de forma específica e univoca con un patrón de metilación bimodal

diferencial de las citosinas (Tabla 9).

Tabla 9. Comparación del patrón y porcentaje de metilación del panel WNT-SHH en la base de datos de la cohorte de estudio F/FF (n=106) y la base de datos de la cohorte de validación FFPE (n=169)

	No-WNT/no-SHH		**WNT**		**SHH**	
	F/FF	FFPE	F/FF	FFPE	F/FF	FFPE
WNT1_MB	8%	11%	9%	11%	88%	79%
WNT2_MB	2%	2%	2%	5%	85%	66%
WNT3_MB	92%	90%	91%	90%	12%	21%
N-WS1_MB	89%	89%	16%	24%	17%	28%
N-WS2_MB	80%	76%	11%	16%	15%	20%
N-WS3_MB	9%	12%	88%	87%	87%	83%
SHH1_MB	14%	15%	90%	87%	13%	19%
SHH2_MB	6%	6%	88%	86%	18%	19%
SHH3_MB	96%	96%	11%	13%	96%	95%

Con el fin de investigar la capacidad de clasificación del Panel WNT-SHH, se procedió con la determinación del subgrupo molecular de la cohorte de validación aplicando el modelo LDA de clasificación. Se observó como las citosinas discriminaban de forma clara y eran capaces de clasificar la totalidad de las muestras con un 100% de concordancia con los datos de clasificación publicados previamente con la misma cohorte de MB (*Hovestadt V et al. Robust molecular subgrouping and copy-number profiling of medulloblastoma from small amounts of archival tumor material using high-density DNA methylation arrays. Acta Neuropathologica 2013, 125:913-916*).

A continuación, se analizaron las citosinas de las base de datos de validación correspondientes al Panel G3-G4. Dichas citosinas mostraron un patrón de metilación equivalente al patrón de la cohorte de estudio del Panel G3-G4, asociado de forma significativa y específica con los subgrupos Grupo 3 y Grupo 4 (Figura 5B y Tabla 10).

Tabla 10. Ejemplo del patrón y porcentaje de metilación del panel G3-G4 en la base de la cohorte de estudio F/FF (n=106) y la base de datos de la cohorte de validación FFPE (n=169)

	G3		**G4**	
	F/FF	FFPE	F/FF	FFPE
Gr3-A_MB	82%	82%	26%	33%
Gr3-B_MB	84%	79%	22%	24%

Gr-3-C_MB	79%	76%	18%	24%
Gr-3-D_MB	86%	87%	28%	35%
Gr-4-A_MB	66%	60%	14%	18%
Gr-4-B_MB	72%	63%	19%	25%
Gr-4-C_MB	72%	61%	7%	14%
Gr-4-D_MB	78%	65%	27%	28%

Para evaluar la capacidad de clasificación, se aplicó el modelo LDA de clasificación del Panel G3-G4 a las muestras clasificadas como no-WNT/no-SHH (n=115) por el Panel WNT-SHH. Se observó como el Panel G3-G4 era capaz de diferenciar de forma eficaz las dos entidades Grupo 3 y Grupo 4 con un 97% de concordancia (41/42 G3 y 71/73 G4) con los datos de clasificación publicados previamente con la misma cohorte de MB (*Hovestadt V et al. Robust molecular subgrouping and copy-number profiling of medulloblastoma from small amounts of archival tumor material using high-density DNA methylation arrays. Acta Neuropathologica 2013, 125:913-916*).

Conclusiones Ejemplo 2:

Al utilizar diversas bases de datos de metilación del ADN, se demostró cómo las citosinas del Panel WNT-SHH son eficaces para establecer los subgrupos moleculares de las entidades genéticas WNT, SHH y Grupo no-WNT/no-SHH de MB.

De esta forma se demostró también como el patrón de metilación diferencial de las citosinas que constituyen el Panel G3-G4 representa un marcador eficaz para la clasificación molecular de MBs pertenecientes a las entidades genéticas Grupo 3 y Grupo 4.

Asimismo, se demostró que el perfil de metilación de las citosinas de interés de tejido tumoral fijado en formalina e incluido en parafina es comparable al tejido obtenido en fresco y/o conservado congelado a -80ºC. Por lo tanto, al mantenerse estable el patrón de metilación de las citosinas los marcadores propuestos, Panel WNT-SHH y Panel G3-G4, el método de clasificación propuesto es aplicable a este tipo de material biológico.

Ejemplo 3

Validación de un método de clasificación de MB primarios utilizando diversas metodologías

y cohortes independientes

A partir de este punto el objetivo del estudio fue validar el análisis de las citosinas de interés (Panel WNT-SHH y Panel G3-G4) mediantes técnicas moleculares tales como la secuenciación por bisulfito (BSP) y la pirosecuenciación por bisulfito, u otras técnicas moleculares similares adecuadas para realizar un análisis del estado de metilación del ADN.

Para ello utilizaron 108 muestras de MB primarios. De cada una de las muestras se analizaron y compararon los resultados generados del análisis de fragmentos de tejido tumoral obtenido tanto en fresco y conservados congelados (F/FF) como fijados en formalina e incluidos en parafina (FFPE).

El objetivo final era demostrar que el método de clasificación de MB primarios puede ser analizado mediante diversas metodologías moleculares y aplicables a diversos tipos de tejido.

Para la realización del método de clasificación de la invención se partió de una muestra biológica aislada de un paciente. Se procedió con la extracción de ADN mediante protocolos convencionales, tratamiento del ADN y posterior análisis de los niveles de metilación de cada una de las citosina de interés.

Se utilizaron dos grupos aislados de muestras independientes de MB primarios.

- Grupo 1: 96 MB congelados a -80ºC (21 WNT, 26 SHH, 26 Grupo 3 y 23 Grupo 4)
- Grupo 2: 12 MB FFPE (2 WNT, 2 SHH, 6 Grupo 3 y 2 Grupo 4)

Para el control de la validez y eficiencia del procedimiento de conversión del ADN con bisulfito de sodio, se seleccionaron ocho citosinas control. Estas citosinas control mostraron un perfil de metilación muy consistente en muestras de ADN de sangre periférica normal, cuatro citosinas como control positivo metilado y cuatro como control negativo no metilado (Tabla 11).

Tabla 11. Citosinas de control (Sangre Periférica normal n=40).

subgrupo	id citosina	id illumina	cromosoma	inicio de inicio	final de inicio	promedio metilación

						normal (n=40)
control positivo	CP1_MB	cg13458561	10	134558389	134558390	97%
control positivo	CP2_MB	cg19602374	1	15833485	15833486	97%
control positivo	CP3_MB	cg01724941	7	132192778	132192779	97%
control positivo	CP4_MB	cg12203543	7	75484879	75484880	97%
control negativo	CN1_MB	cg22885965	6	107077115	107077116	4%
control negativo	CN2_MB	cg05854826	5	138774918	138774919	2%
control negativo	CN3_MB	cg05584166	8	145582547	145582548	2%
control negativo	CN4_MB	cg06319390	1	156308183	156308184	2%

*Promedio de valor de metilación en ADN de muestra de sangre periférica normal

Como primer paso se procedió con la extracción del ADN de las muestras congeladas en fresco utilizando el kit *Gentra Puregene Tissue* (Qiagen Technologies) o similar, siguiendo las instrucciones del fabricante. La cuantificación del ADN se realizó por lectura de la absorbancia a 260nm de longitud de onda, en un espectrofotómetro (Nanodrop N-1000, Thermo Scientific) o similar. La pureza del ADN se evaluó mediante la absorbancia 260nm y el coeficiente de absorbancia a 260/280 nm, considerándose los valores óptimos entre 1,6 -1,9 unidades de densidad óptica (D.O.).

En aquellos tumores fijados en formalina e incluidos en parafina (FFPE) se procedió con la extracción del ADN de las muestras utilizando el kit *QIAamp DNA FFPE* (Qiagen Technologies) o similar, siguiendo las instrucciones del fabricante.

El paso inicial de las técnicas moleculares utilizadas para analizar el estado de metilación es la conversión del ADN con bisulfito de sodio ($NaHSO_3$). Para ello se partió de 1ng – 2µg de ADN y se procedió con la conversión del ADN utilizando el kit *EpiTect Plus Bisulfite Conversion* (Qiagen Technologies) o similar, siguiendo las instrucciones del proveedor (Tabla 12 y Tabla 13). Véase además descripción detallada de la metodología en el artículo del autor *Darst RP et al. Bisulfite Sequencing of DNA. Current Protocols of Molecular Biology (2010) doi:10.1002/0471142727.mb0709s91*.

Tabla 12. Componentes de la reacción de bisulfito.

Componente	Muestras de alta concentración (1ng-2µg) Volumen por reacción (µl)	Muestras de baja concentración (1-500 ng) Volumen por reacción (µl)
Solución de ADN	Variable (máximo 20 µl)	Variable (máximo 40 µl)
Agua libre de ARN-asa	Variable	Variable
Mezcla de bisulfito (disuelto), ver paso 1	85	85
Tampón de protección de ADN	35	15
Volumen total	140	140

Tabla 13. Condiciones del termociclador para conversión de bisulfito.

Paso	Tiempo	Temperatura
Desnaturalización	5 minutos	95ºC
Incubación	25 minutos	60ºC
Desnaturalización	5 minutos	95ºC
Incubación	85 minutos (1 h 25 minutos)	60ºC
Desnaturalización	5 minutos	95ºC
Incubación	175 minutos (2 h 55 minutos)	60ºC
Modo de espera	Indefinido	20ºC

Amplificación selectiva de fragmentos de ADN de interés mediante reacción en cadena de la polimerasa (PCR).

Como primer paso se procedió con el diseño bioinformático de cebadores específicos para alelos metilados y alelos no metilados (Tablas 14, 15 y 16). Para el diseño de los cebadores se utilizó la secuencia de *GenBank* (https://www.ncbi.nlm.nih.gov/genbank/) correspondiente a la localización de cada una de las citosinas de interés. Los cebadores fueron diseñados manualmente utilizando las secuencias modificadas en todas las citosinas y posteriormente analizados mediante los programas para diseño y análisis de cebadores tales como: Methyl Primer Express Software (Thermo Fisher Scientific), MethPrimer (http://www.urogene.org/methprimer2/), BiSearch (http://bisearch.enzim.hu/), entre otros.

Tabla 14. Tabla de cebadores de BSP del Panel WNT-SHH

ID Citosina	ID Illumina	Cebador	Producto PCR	Tª anillamiento
WNT1_MB	cg25542041	(SEQ ID NO 1) (SEQ ID NO 2)	261	58
WNT2_MB	cg24280645	(SEQ ID NO 3) (SEQ ID NO 4)	254	60
WNT3_MB	cg02227036	(SEQ ID NO 5) (SEQ ID NO 6)	196	58
N-WS1_MB	cg18849583	(SEQ ID NO 7) (SEQ ID NO 8)	161	55
N-WS2_MB	cg19828869	(SEQ ID NO 9) (SEQ ID NO 10)	196	58
N-WS3_MB	cg01268345	(SEQ ID NO 11) (SEQ ID NO 12)	220	58
SHH1_MB	cg10333416	(SEQ ID NO 13) (SEQ ID NO 14)	231	58
SHH2_MB	cg10959440	(SEQ ID NO 15) (SEQ ID NO 16)	207	60
SHH3_MB	cg12925355	(SEQ ID NO 17) (SEQ ID NO 18)	162	58

Tabla 15. Tabla de cebadores de BSP del Panel G3-G4

ID Citosina	ID Illumina	Cebador	Producto PCR	Tª anillamiento
Gr3-A_MB	cg13548946	(SEQ ID NO 19) (SEQ ID NO 20)	220	58
Gr3-B_MB	cg05679609	(SEQ ID NO 21) (SEQ ID NO 22)	189	58
Gr3-C_MB	cg09929238	(SEQ ID NO 23) (SEQ ID NO 24)	365	58
Gr3-D_MB	cg24044478	(SEQ ID NO 25) (SEQ ID NO 26)	206	60
Gr4-A_MB	cg08129331	(SEQ ID NO 27) (SEQ ID NO 28)	181	60
Gr4-B_MB	cg10400652	(SEQ ID NO 29) (SEQ ID NO 30)	230	60
Gr4-C_MB	cg12565585	(SEQ ID NO 31) (SEQ ID NO 32)	232	58
Gr4-D_MB	cg16167052	(SEQ ID NO 33) (SEQ ID NO 34)	256	60

Tabla 16. Cebadores control para BSP

ID Citosina	ID Illumina	Cebador	Producto PCR	Tª anillamiento
CP1_MB	cg13458561	(SEQ ID NO 48)	210	58
		(SEQ ID NO 49)		
CP2_MB	cg19602374	(SEQ ID NO 51)	159	58
		(SEQ ID NO 52)		
CP3_MB	cg01724941	(SEQ ID NO 54)	201	58
		(SEQ ID NO 55)		
CP4_MB	cg12203543	(SEQ ID NO 57)	223	60
		(SEQ ID NO 58)		
CN1_MB	cg22885965	(SEQ ID NO 60)	194	60
		(SEQ ID NO 61)		
CN2_MB	cg05854826	(SEQ ID NO 63)	205	58
		(SEQ ID NO 64)		
CN3_MB	cg05584166	(SEQ ID NO 66)	226	60
		(SEQ ID NO 67)		
CN4_MB	cg06319390	(SEQ ID NO 69)	188	60
		(SEQ ID NO 70)		

Sucesivamente se procedió con la preparación de la mezcla de reactivos de PCR (Tabla 17).

Tabla 17. Mezcla reactivos para PCR.

Reactivo	1x (µl)
Agua	ajustar para un volumen final de 24µl
Tampón PCR	5
$MgCl_2$	1.5
dNTP	1.5
Primer 5' (10µM)	0.5
Primer 3' (10µM)	0.5
ADN Polimerasa	0.13

En tubos de PCR de 0.2 ml se dispensaron 24µl de mezcla de reactivos (Tabla 17) y 1µl del ADN convertido con bisulfito correspondiente (a 50ng/µl). Cada reacción contaba con su control negativo en el cual en vez de muestra de ADN se añadió agua estéril.

Se aplicaron las siguientes condiciones del termociclador: desnaturalización inicial a 95ºC, 5 minutos (35 ciclos); desnaturalización a 95ºC, 15 segundos, anillamiento a temperatura adecuada (temperaturas de anillado varían según el fragmento a analizar, Tablas 14, 15 y 16), 15 segundos, extensión a 72ºC, 30 segundos, extensión final a 72ºC, 7 minutos. Al final se programó la máquina para que mantuviera los tubos a 4ºC (modo de espera). Finalmente, se procedió con la electroforesis de las muestras en gel de agarosa al 2%. Los tiempos y número de ciclos de la reacción de PCR pueden variar según optimización.

Secuenciación de ADN convertido con bisulfito

A partir del producto amplificado de ADN convertido con bisulfito se procedió con el análisis de los patrones de metilación de las citosinas de interés (Panel WNT-SHH y Panel G3-G4) mediante secuenciación automatizada específica de ADN convertido por bisulfito (BSP).

Como primer paso se procedió con la purificación del producto amplificado por PCR mediante el kit ExoSAP-IT® (USB-Affymetrix) o similar, siguiendo las instrucciones del proveedor. A continuación, se añadió a cada tubo 2.5µl de producto de PCR y 1µl ExoSAP-IT®. Se colocaron los tubos en un termociclador a 37ºC, 15 minutos (1 ciclo) y posteriormente, 80ºC, 15 minutos (1 ciclo). Finalmente, se añadieron 22µl de agua al producto purificado.

A continuación se realizó la reacción de secuencia utilizando los mismos cebadores utilizados para la reacción de amplificación por PCR (Tabla 18). En la mezcla de reactivos se utilizaron por separado los cebadores *Forward* (Fw) y *Reverse* (Rv) para alelos metilados y alelos no metilados. Por cada secuencia se añadió 1µl de producto de PCR purificado mediante ExoSAP-IT® los siguientes reactivos:

Tabla 18. Componentes de la reacción de secuenciación.

Reactivo	1x (µL)
Agua	ajustar para un volumen final de 10uL
Big Dye Buffer	1
Big Dye	1
Sonda Fw o Rv	0.5

** Big Dye Terminator v3.1 Cycle Sequencing Kit (Applied Biosystems) o similar.*

Se colocaron los tubos en un termociclador y se procedió según las siguientes condiciones de temperatura y ciclos: desnaturalización inicial del ADN templado a 96ºC, 1 minuto. A continuación, 25 ciclos de desnaturalización a 96ºC, 10 segundos, anillamiento a 50ºC, 5 segundos, extensión a 60ºC, 4 minutos.

Posteriormente, se procedió con la precipitación del producto de la reacción de secuencia mediante Sephadex G-50® (GE Healthcare Life Science) o similar, siguiendo las instrucciones del proveedor. De forma resumida, se añadieron 10 µl del producto de secuenciación a la columna AutoSeqTM G-50© del kit (GE Healthcare Life Science) o similar, previamente preparada con la solución Sephadex G-50© y se procedió a centrifugar 2 minutos a 4,500 rpm a temperatura ambiente. Se transfirió el eluído a una placa de secuenciación. Finalmente, se analizaron las muestras mediante una máquina de secuenciación automatizada. El análisis del electroferograma de la secuencia se realizó mediante el software *Chromas Lite* (Technelysium) o similar (Figura 6).

Los autores de la invención observaron como el resultado del análisis mediante BSP de las citosinas de la base de datos de validación correspondientes al Panel WNT-SHH, mostraban un patrón de metilación equivalente a las citosinas seleccionadas/originales. De forma similar, las citosinas de validación se asociaban de forma significativa y específica (concordancia 100%) con las tres entidades genéticas definidas por la OMS (2016): WNT, SHH y Grupo no-WNT/no-SHH de MB. Se obtuvieron los mismos resultados partiendo tanto de ADN extraído de tejido tumoral en F/FF como de tejido FFPE (Figura 6).

El análisis mediante la metodología BSP de las citosinas correspondientes al Panel G3-G4, mostró una especificidad moderada del patrón de metilación y capacidad de discriminar los tumores del Grupo 3 y el Grupo 4. Debido al patrón de metilación no claramente bimodal de las citosinas del Panel G3-G4, se observó la presencia de dobles picos en el electroferograma de algunas de las secuencias BSP. En algún caso, esto dificultó la interpretación del resultado. Los autores de la invención constataron como la metodología BSP no era la más adecuada para el análisis del perfil de metilación del Grupo 3 y el Grupo 4.

Pirosecuenciación por bisulfito

A partir del ADN convertido con bisulfito sódico, también se procedió con la cuantificación de los niveles de metilación de las citosinas de interés (Panel WNT-SHH y Panel G3-G4) mediante el método de pirosecuenciación de bisulfito. Para ello se emplearon muestras de ADN extraído tanto de tejido tumoral en F/FF como en FFPE.

Para poder analizar las citosinas de interés se diseñaron parejas de cebadores biotinilados (en 5'-terminal), específicos para alelos metilados y alelos no metilados (Tabla 19, 20 y 21). Para ello se utilizó la herramienta *PyroMark Assay Design* (Qiagen Technologies) o similar.

Tabla 19. Cebadores de pirosecuenciación para el Panel WNT-SHH

D Citosina	ID Illumina	Tipo de Cebador	Cebadores/Sondas 5' – 3'
WNT1_MB	cg25542041	Cebador	(SEQ ID NO 1)
		Cebador + Biotina	(SEQ ID NO 2)
		Sonda	(SEQ ID NO 39)
WNT2_MB	cg24280645	Cebador + Biotina	(SEQ ID NO 3)
		Cebador	(SEQ ID NO 4)
		Sonda	(SEQ ID NO 40)
WNT3_MB	cg02227036	Cebador	(SEQ ID NO 5)
		Cebador + Biotina	(SEQ ID NO 6)
		Sonda	(SEQ ID NO 41)
N-WS1_MB	cg18849583	Cebador	(SEQ ID NO 35)
		Cebador + Biotina	(SEQ ID NO 36)
		Sonda	(SEQ ID NO 42)
N-WS2_MB	cg19828869	Cebador	(SEQ ID NO 9)
		Cebador + Biotina	(SEQ ID NO 10)
		Sonda	(SEQ ID NO 43)
N-WS3_MB	cg01268345	Cebador	(SEQ ID NO 11)
		Cebador + Biotina	(SEQ ID NO 12)
		Sonda	(SEQ ID NO 44)
SHH1_MB	cg10333416	Cebador	(SEQ ID NO 13)
		Cebador + Biotina	(SEQ ID NO 14)
		Sonda	(SEQ ID NO 45)
SHH2_MB	cg10959440	Cebador	(SEQ ID NO 37)
		Cebador + Biotina	(SEQ ID NO 38)
		Sonda	(SEQ ID NO 46)
SHH3_MB	cg12925355	Cebador	(SEQ ID NO 17)

		Cebador + Biotina	(SEQ ID NO 18)
		Sonda	(SEQ ID NO 47)

Tabla 20. Cebadores de pirosecuenciación para el Panel G3-G4

ID Citosina	ID Illumina	Tipo de Cebador	Cebadores/Sondas 5' – 3'
Gr3-A_MB	cg13548946	Cebador	(SEQ ID NO 19)
		Cebador + Biotina	(SEQ ID NO 20)
		Sonda	(SEQ ID NO 72)
Gr3-B_MB	cg05679609	Cebador	(SEQ ID NO 21)
		Cebador + Biotina	(SEQ ID NO 22)
		Sonda	(SEQ ID NO 73)
Gr3-C_MB	cg09929238	Cebador	(SEQ ID NO 23)
		Cebador + Biotina	(SEQ ID NO 24)
		Sonda	(SEQ ID NO 74)
Gr3-D_MB	cg24044478	Cebador	(SEQ ID NO 25)
		Cebador + Biotina	(SEQ ID NO 26)
		Sonda	(SEQ ID NO 75)
Gr4-A_MB	cg08129331	Cebador	(SEQ ID NO 27)
		Cebador + Biotina	(SEQ ID NO 28)
		Sonda	(SEQ ID NO 76)
Gr4-B_MB	cg10400652	Cebador	(SEQ ID NO 29)
		Cebador + Biotina	(SEQ ID NO 30)
		Sonda	(SEQ ID NO 77)
Gr4-C_MB	cg12565585	Cebador	(SEQ ID NO 31)
		Cebador + Biotina	(SEQ ID NO 32)
		Sonda	(SEQ ID NO 78)
Gr4-D_MB	cg16167052	Cebador	(SEQ ID NO 33)
		Cebador + Biotina	(SEQ ID NO 34)
		Sonda	(SEQ ID NO 79)

Tabla 21. Cebadores control para pirosecuenciación

ID citosina	**ID illumina**	Tipo de cebador	**Cebadores 5'-3'**
CP1_MB	cg13458561	Cebador	(SEQ ID NO 48)
		Cebador + Biotina	(SEQ ID NO 49)
		Sonda	(SEQ ID NO 50)
CP2_MB	cg19602374	Cebador	(SEQ ID NO 51)
		Cebador + Biotina	(SEQ ID NO 52)
		Sonda	(SEQ ID NO 53)

CP3_MB	cg01724941	Cebador	(SEQ ID NO 54)
		Cebador + Biotina	(SEQ ID NO 55)
		Sonda	(SEQ ID NO 56)
CP4_MB	cg12203543	Cebador	(SEQ ID NO 57)
		Cebador + Biotina	(SEQ ID NO 58)
		Sonda	(SEQ ID NO 59)
CN1_MB	cg22885965	Cebador	(SEQ ID NO 60)
		Cebador + Biotina	(SEQ ID NO 61)
		Sonda	(SEQ ID NO 62)
CN2_MB	cg05854826	Cebador	(SEQ ID NO 63)
		Cebador + Biotina	(SEQ ID NO 64)
		Sonda	(SEQ ID NO 65)
CN3_MB	cg05584166	Cebador	(SEQ ID NO 66)
		Cebador + Biotina	(SEQ ID NO 67)
		Sonda	(SEQ ID NO 68)
CN4_MB	cg06319390	Cebador	(SEQ ID NO 69)
		Cebador + Biotina	(SEQ ID NO 70)
		Sonda	(SEQ ID NO 71)

Se partió primero con la amplificación de los fragmentos de ADN de interés que se llevó a cabo con el kit *PyroMark® PCR* (Qiagen Techologies) o similar, siguiendo las instrucciones del proveedor (Tabla 19, 20 y 21). A continuación, se mezclaron los reactivos necesarios para la amplificación por PCR según los volúmenes y concentraciones descritas en la Tabla 22.

Tabla 22. Composición de la mezcla de reactivos para la amplificación de una región de ADN convertida con bisulfito para pirosecuenciación.

Componente	Volumen por reacción	Concentración final
PyroMark PCR Master Mix, 2x	12.5 µl	1x
CoralLoad Concentrate, 10x	2.5	1x
25 mM MgCl2 (opcional)	Variable	≥1.5 mM
Solución-Q, 5x (opcional)	5 µl	1x
Cebador A/Cebador B	Variable/variable	0.2 µM/0.2 µM
Agua libre de ARN-asa	Variable	-
Volumen total (tras la adición del molde de ADN)	25	

Se introdujeron los tubos de PCR en el termociclador y se procedió según las condiciones descritas en la Tabla 23, protocolo estándar sujeto a optimización.

Tabla 23. Protocolo estandar para PyroMark PCR Master Mix

			Comentarios
Paso de activación inicial:	15 minutos	95 °C	La enzima HotStarTaq ADN polimerasa se activa con este paso de calentamiento.
Ciclado en 3 pasos:			
Desnaturalización	20 segundos	95 °C	
Hibridación	30 segundos	53 °C	
Extensión	20 segundos	72 °C	
Número de ciclos	42		
Extensión final:	5 minutos	72 °C	

Una vez terminada la amplificación, se procedió con la inmovilización de los productos de PCR con microesferas Streptavidin Sepharose High Performance (GE Helthcare) o similar, antes de proceder al análisis por pirosecuenciación.

Se preparó la muestra maestra con las microesferas “Streptavidin Sepharose High Performance” y los reactivos para la inmovilización de ADN según los datos de la Tabla 24. Se añadieron 70µl de mezcla maestra a cada uno de los pocillos de una placa de PCR junto a 10µl de PCR biotinilado (volumen total por pocillo 80µl) y se centrifugó la placa (1.400rpm) durante 5-10 minutos, según protocolo estándar sujeto a optimización.

Tabla 24. Streptavidin Sepharose High Performance PCR Master Mix

Componente	Volumen/Muestra (µl)
Streptavidin Sepharose High Performance	2
Tampón de unión PyroMark	40
Agua (H_2O, suministrada)	28
Volumen total	**70**

A continuación, se procedió con la preparación de las muestras previa al análisis por pirosecuenciación en el PyroMark Q24 (Qiagen) o similar. En la placa PyroMark Q24 (Qiagen) o similar, se añadieron en cada pocillo 40µl de tampón de aliniamento y 0,5µl de cebador especifico para la los productos de PCR. Se posicionó la placa PyroMark Q96 Plate Low en el lugar correspondiente en la estación de vacío (Qiagen) o similar.

De la misma forma se colocó la placa de PCR en la correspondiente posición en la estación

de vacío. Se introdujeron las sondas de vacío en la placa de PCR para capturar las microesferas con los productos de PCR inmovilizados. Tras una serie de lavados, se liberaron las microesferas en la placa PyroMark Q24, siguiendo las recomendaciones del fabricante (Manual del usuario PyroMark Q24, Qiagen). Finalmente, se calentó la placa a 85ºC, 2 minutos.

A continuación se procedió con la carga de los reactivos en el cartucho PyroMark Q24 (Qiagen) o similar, y posicionamiento de dicho cartucho en el sistema PyroMark Q24. Los reactivos incluyen una mezcla de enzimas, mezcla de substratos y nucleótidos (A, T, G, C), según las recomendaciones del fabricante (Manual del usuario PyroMark Q24, Qiagen).

Asimismo, se introdujo la placa en el bloque térmico del sistema PyoMark Q24 y se procedió a ejecutar el ensayo de pirosecuenciación. Al finalizar el ensayo, se procedió a documentar e interpretar los resultados de la cuantificación de la metilación en el pirograma/histograma obtenido (Tablas 25, 26 y Figura 7).

Los resultados del análisis mediante pirosecuenciación de las citosinas de la base de datos de validación correspondientes al Panel WNT-SHH mostraban un patrón de metilación equivalente a las citosinas de la cohorte de estudio (Figuras 3A y 3B). De forma similar, las citosinas de validación se asociaban de forma significativa y específica con las tres entidades genéticas definidas por la OMS (2016): WNT, SHH y Grupo no-WNT/no-SHH de MB. Asimismo los resultados del Panel G3-G4 mostraron un patrón de metilación específico, similar a las citosinas de la cohorte de estudio (Figuras 4A y 4B). La aplicación de la función LDA a los valores de pirosecuenciación del Panel WNT-SHH permitió clasificar la totalidad de las muestras con una concordancia del 100% (Tablas 25 y 26).

Tabla 25. Ejemplo de la capacidad de clasificación del Panel WNT-SHH en tejido tumoral en F/FF.

Muestras	no-WNT/no-SHH	SHH	WNT	Predicción Panel WNT-SHH
no-WNT/no-SHH	100%	0%	0%	no-WNT/no-SHH
no-WNT/no-SHH	100%	0%	0%	no-WNT/no-SHH
no-WNT/no-SHH	100%	0%	0%	no-WNT/no-SHH
no-WNT/no-SHH	100%	0%	0%	no-WNT/no-SHH
no-WNT/no-SHH	100%	0%	0%	no-WNT/no-SHH

no-WNT/no-SHH	100%	0%	0%	no-WNT/no-SHH
no-WNT/no-SHH	100%	0%	0%	no-WNT/no-SHH
no-WNT/no-SHH	100%	0%	0%	no-WNT/no-SHH
no-WNT/no-SHH	100%	0%	0%	no-WNT/no-SHH
no-WNT/no-SHH	100%	0%	0%	no-WNT/no-SHH
no-WNT/no-SHH	100%	0%	0%	no-WNT/no-SHH
no-WNT/no-SHH	100%	0%	0%	no-WNT/no-SHH
no-WNT/no-SHH	100%	0%	0%	no-WNT/no-SHH
no-WNT/no-SHH	100%	0%	0%	no-WNT/no-SHH
no-WNT/no-SHH	100%	0%	0%	no-WNT/no-SHH
no-WNT/no-SHH	100%	0%	0%	no-WNT/no-SHH
no-WNT/no-SHH	100%	0%	0%	no-WNT/no-SHH
no-WNT/no-SHH	100%	0%	0%	no-WNT/no-SHH
no-WNT/no-SHH	100%	0%	0%	no-WNT/no-SHH
no-WNT/no-SHH	100%	0%	0%	no-WNT/no-SHH
no-WNT/no-SHH	100%	0%	0%	no-WNT/no-SHH
no-WNT/no-SHH	100%	0%	0%	no-WNT/no-SHH
no-WNT/no-SHH	100%	0%	0%	no-WNT/no-SHH
no-WNT/no-SHH	100%	0%	0%	no-WNT/no-SHH
no-WNT/no-SHH	100%	0%	0%	no-WNT/no-SHH
no-WNT/no-SHH	100%	0%	0%	no-WNT/no-SHH
no-WNT/no-SHH	100%	0%	0%	no-WNT/no-SHH
no-WNT/no-SHH	100%	0%	0%	no-WNT/no-SHH
no-WNT/no-SHH	100%	0%	0%	no-WNT/no-SHH
no-WNT/no-SHH	100%	0%	0%	no-WNT/no-SHH
no-WNT/no-SHH	100%	0%	0%	no-WNT/no-SHH
no-WNT/no-SHH	100%	0%	0%	no-WNT/no-SHH
no-WNT/no-SHH	100%	0%	0%	no-WNT/no-SHH
no-WNT/no-SHH	100%	0%	0%	no-WNT/no-SHH
no-WNT/no-SHH	100%	0%	0%	no-WNT/no-SHH
no-WNT/no-SHH	100%	0%	0%	no-WNT/no-SHH
no-WNT/no-SHH	100%	0%	0%	no-WNT/no-SHH
no-WNT/no-SHH	100%	0%	0%	no-WNT/no-SHH
no-WNT/no-SHH	100%	0%	0%	no-WNT/no-SHH
no-WNT/no-SHH	100%	0%	0%	no-WNT/no-SHH
no-WNT/no-SHH	100%	0%	0%	no-WNT/no-SHH
no-WNT/no-SHH	100%	0%	0%	no-WNT/no-SHH
no-WNT/no-SHH	100%	0%	0%	no-WNT/no-SHH
no-WNT/no-SHH	100%	0%	0%	no-WNT/no-SHH
no-WNT/no-SHH	100%	0%	0%	no-WNT/no-SHH
no-WNT/no-SHH	100%	0%	0%	no-WNT/no-SHH
no-WNT/no-SHH	100%	0%	0%	no-WNT/no-SHH
no-WNT/no-SHH	100%	0%	0%	no-WNT/no-SHH

no-WNT/no-SHH	100%	0%	0%	no-WNT/no-SHH
no-WNT/no-SHH	100%	0%	0%	no-WNT/no-SHH
no-WNT/no-SHH	100%	0%	0%	no-WNT/no-SHH
SHH	0%	100%	0%	SHH
SHH	0%	100%	0%	SHH
SHH	0%	100%	0%	SHH
SHH	0%	100%	0%	SHH
SHH	0%	100%	0%	SHH
SHH	0%	100%	0%	SHH
SHH	0%	100%	0%	SHH
SHH	0%	100%	0%	SHH
SHH	0%	100%	0%	SHH
SHH	0%	100%	0%	SHH
SHH	0%	100%	0%	SHH
SHH	0%	100%	0%	SHH
SHH	0%	100%	0%	SHH
SHH	0%	100%	0%	SHH
SHH	0%	100%	0%	SHH
SHH	0%	100%	0%	SHH
SHH	0%	100%	0%	SHH
SHH	0%	100%	0%	SHH
SHH	0%	100%	0%	SHH
SHH	0%	100%	0%	SHH
SHH	0%	100%	0%	SHH
SHH	0%	100%	0%	SHH
SHH	0%	100%	0%	SHH
SHH	0%	100%	0%	SHH
SHH	0%	100%	0%	SHH
WNT	0%	0%	100%	WNT
WNT	0%	0%	100%	WNT
WNT	0%	0%	100%	WNT
WNT	0%	0%	100%	WNT
WNT	0%	0%	100%	WNT
WNT	0%	0%	100%	WNT
WNT	0%	0%	100%	WNT
WNT	0%	0%	100%	WNT
WNT	0%	0%	100%	WNT
WNT	0%	0%	100%	WNT
WNT	0%	0%	100%	WNT
WNT	0%	0%	100%	WNT
WNT	0%	0%	100%	WNT

WNT	0%	0%	100%	WNT
WNT	0%	0%	100%	WNT
WNT	0%	0%	100%	WNT
WNT	0%	0%	100%	WNT
WNT	0%	0%	100%	WNT
WNT	0%	0%	100%	WNT
WNT	0%	0%	100%	WNT
WNT	0%	0%	100%	WNT
WNT	0%	0%	100%	WNT
WNT	0%	0%	100%	WNT

Tabla 26. Ejemplo de la capacidad de clasificación del Panel WNT-SHH en tejido tumoral en FFPE.

Muestras	No-WNT/no-SHH	SHH	WNT	Predicción panel WNT-SHH
No-WNT/no-SHH FFPE	100%	0%	0%	No-WNT/no-SHH
No-WNT/no-SHH FFPE	100%	0%	0%	No-WNT/no-SHH
No-WNT/no-SHH FFPE	100%	0%	0%	No-WNT/no-SHH
SHH FFPE	0%	100 %	0%	SHH
WNT FFPE	0%	0%	100%	WNT

En las Tablas 25 y 26, la Columna izquierda representa la clasificación molecular según datos publicados ((*Northcott PA et al. Medulloblastoma Comprises Four Distinct Molecular Variants. Journal of Clinical Oncology 2011, 29(11):1408-1414)*). En el centro, la afiliación según los resultados de pirosecuenciación y en la derecha la clasificación según el panel WNT-SHH.

Aplicaron el mismo procedimiento a los valores del Panel G3-G4 a las muestras clasificadas como grupo no-WNT/no-SHH por el Panel WNT-SHH. Se clasificaron correctamente 47 de 49 de las muestras analizadas de ADN extraído de tejido en FF y 6 de las 8 muestras de FFPE.

En las siguientes tablas se muestra el resumen de resultados del análisis de los niveles de

metilación del panel G3-G4 mediante pirosecuenciación por bisulfito en ADN de tejido F/FF y FFPE de meduloblastoma (Tablas 27 y 28).

Tabla 27. Ejemplo de la capacidad de clasificación del Panel G3-G4 en tejido tumoral en F/FF

Muestras	Grupo 3	Grupo 4	Predicción Panel G3-G4
Grupo 3	100%	0%	Grupo 3
Grupo 4	97%	3%	Grupo 3
Grupo 3	100%	0%	Grupo 3
Grupo 3	100%	0%	Grupo 3
Grupo 3	100%	0%	Grupo 3
Grupo 3	100%	0%	Grupo 3
Grupo 3	100%	0%	Grupo 3
Grupo 3	100%	0%	Grupo 3
Grupo 3	100%	0%	Grupo 3
Grupo 3	100%	0%	Grupo 3
Grupo 3	100%	0%	Grupo 3
Grupo 3	100%	0%	Grupo 3
Grupo 3	100%	0%	Grupo 3
Grupo 3	100%	0%	Grupo 3
Grupo 3	100%	0%	Grupo 3
Grupo 3	100%	0%	Grupo 3
Grupo 3	100%	0%	Grupo 3
Grupo 3	100%	0%	Grupo 3
Grupo 3	100%	0%	Grupo 3
Grupo 3	100%	0%	Grupo 3
Grupo 3	100%	0%	Grupo 3
Grupo 3	100%	0%	Grupo 3
Grupo 3	100%	0%	Grupo 3
Grupo 3	100%	0%	Grupo 3
Grupo 3	100%	0%	Grupo 3
Grupo 3	100%	0%	Grupo 3
Grupo 3	100%	0%	Grupo 3
Grupo 3	100%	0%	Grupo 3
Grupo 3	100%	0%	Grupo 3
Grupo 3	0%	100%	Grupo 4
Grupo 3	0%	100%	Grupo 4
Grupo 4	25%	75%	Grupo 4
Grupo 4	4%	96%	Grupo 4
Grupo 4	0%	100%	Grupo 4
Grupo 4	0%	100%	Grupo 4
Grupo 4	0%	100%	Grupo 4
Grupo 4	0%	100%	Grupo 4

Grupo 4	0%	100%	Grupo 4
Grupo 4	0%	100%	Grupo 4
Grupo 4	0%	100%	Grupo 4
Grupo 4	0%	100%	Grupo 4
Grupo 4	0%	100%	Grupo 4
Grupo 4	0%	100%	Grupo 4
Grupo 4	0%	100%	Grupo 4
Grupo 4	0%	100%	Grupo 4
Grupo 4	0%	100%	Grupo 4
Grupo 4	0%	100%	Grupo 4
Grupo 4	0%	100%	Grupo 4
Grupo 4	0%	100%	Grupo 4
Grupo 4	0%	100%	Grupo 4
Grupo 4	0%	100%	Grupo 4
Grupo 4	0%	100%	Grupo 4
Grupo 4	0%	100%	Grupo 4

Tabla 28. Ejemplo de la capacidad de clasificación del Panel G3-G4 en tejido tumoral en FFPE.

Muestras	Grupo 3	Grupo 4	Predicción panel G3-G4
Grupo 3 FFPE	100%	0%	Grupo 3 FFPE
Grupo 3 FFPE	100%	0%	Grupo 3 FFPE
Grupo 3 FFPE	100%	0%	Grupo 3 FFPE
Grupo 3 FFPE	100%	0%	Grupo 3 FFPE
Grupo 3 FFPE	0%	100%	Grupo 4 FFPE
Grupo 3 FFPE	0%	100%	Grupo 4 FFPE
Grupo 4 FFPE	0%	100%	Grupo 4 FFPE
Grupo 4 FFPE	0%	100%	Grupo 4 FFPE

En la columna a la izquierda de las Tablas 27 y 28 se puede ver la clasificación molecular según datos publicados (*Northcott PA et al. Medulloblastoma Comprises Four Distinct Molecular Variants. Journal of Clinical Oncology 2011, 29(11):1408-1414*). En las columnas en el centro se muestra la afiliación según los resultados de la pirosecuenciación y en la columna de la derecha, la clasificación según el Panel G3-G4.

Se obtuvieron los mismos resultados partiendo tanto de ADN extraído de tejido tumoral en F/FF como de tejido FFPE (Tablas 27 y 28). De esta forma, los resultados confirmaron la validez de los perfiles de metilación identificados mediante tecnologia de microarray.

Asimismo, se demostró que el perfil de metilación de las citosinas de interés de tejido tumoral fijado en formalina e incluido en parafina es comparable al tejido obtenido en fresco y/o conservado congelado a -80ºC. Por lo tanto, al mantenerse estable el patrón de metilación de las citosinas de los marcadores propuestos, Panel WNT-SHH y Panel G3-G4, el método de clasificación propuesto es aplicable a este tipo de material biológico.

Conclusiones Ejemplo 3:

Al utilizar diversas técnicas moleculares para el análisis del patrón de metilación del ADN, se demostró como las citosinas del Panel WNT-SHH y Panel G3-G4 son eficaces para establecer los subgrupos moleculares de las entidades genéticas WNT, SHH, Grupo 3 y Grupo 4 de MB. De esta forma, los resultados confirmaron la validez de los perfiles de metilación identificados mediante tecnologia de microarray.

Asimismo, se demostró como el patrón de metilación diferencial de las citosinas que constituyen el Panel WNT-SHH y Panel G3-G4 representa un marcador eficaz para la clasificación molecular de MBs pertenecientes a las entidades genéticas WNT, SHH, Grupo 3 y Grupo 4.

Finalmente, se demostró que el perfil de metilación de las citosinas de interés de tejido tumoral fijado en formalina e incluido en parafina es comparable al tejido obtenido en fresco y/o conservado congelado a -80ºC. Por lo tanto, al mantenerse estable el patrón de metilación de las citosinas de los marcadores propuestos, Panel WNT-SHH y Panel G3-G4, se comprobó que el método de clasificación propuesto es aplicable a este tipo de material biológico.

REIVINDICACIONES

1. Método *in vitro* para la clasificación de un paciente con meduloblastoma en uno de los subgrupos moleculares WNT, SHH y grupo no-WNT/no-SHH que comprende:

   a) Análisis de los niveles de metilación de las citosinas WNT1_MB, WNT2_MB, WNT3_MB, N-WS1_MB, N-WS2_MB, N-WS3_MB, SHH1_MB, SHH2_MB y SHH3_MB, que forman el Panel WNT-SHH, o una combinación de las mismas, en el ADN extraído de una muestra biológica aislada del paciente, y

   b) Clasificación del paciente en uno de los subgrupos moleculares WNT, SHH y grupo no-WNT/no-SHH en base a los niveles de metilación de las citosinas del Panel WNT-SHH analizadas en a), según valores de referencia (Tabla 2).

2. Método, según la reivindicación 1, en el que, para aquellos pacientes clasificados como no-WNT/no-SHH, se llevan a cabo los siguientes pasos adicionales:

   c) Análisis de los niveles de metilación de las citosinas Gr3-A_MB, Gr3-B_MB, Gr3-C_MB, Gr3-D_MB, Gr4-A_MB, Gr4-B_MB, Gr4-C_MB y Gr4-D_MB, que forman el Panel G3-G4, o una combinación de las mismas, en el ADN extraído de la muestra biológica aislada del paciente, y

   d) Clasificación del paciente en uno de los subgrupos moleculares Grupo 3 y Grupo 4 en base a los niveles de metilación de las citosinas del Panel G3-G4 analizadas en c), según valores de referencia (Tabla 4).

3. Método para la clasificación de un paciente con meduloblastoma en uno de los subgrupos moleculares WNT, SHH, Grupo 3 y Grupo 4, que comprende:

   A. Análisis de forma combinada de los niveles de metilación de las citosinas del panel WNT-SHH, o una combinación de las mismas, y del Panel G3-G4, o una combinación de las mismas, en el ADN extraído de una muestra biológica aislada del paciente, y

   B. Clasificación del paciente en uno de los subgrupos moleculares WNT, SHH, Grupo 3 y Grupo 4, en base a los niveles de metilación de las

citosinas del Panel WNT-SHH y del Panel G3-G4 analizadas en A), según valores de referencia (Tablas 2 y 4).

4. Método, según cualquiera de las reivindicaciones anteriores, donde la muestra biológica empleada es tejido tumoral.

5. Método, según la reivindicación 4, donde el contenido de célula tumoral viable en la muestra de tejido tumoral es al menos del 70%.

6. Método, según la reivindicación 4 ó 5, donde el tejido tumoral es tejido tumoral fresco, congelado ó fijado en formalina y embebido en parafina.

7. Método, según una cualquiera de las reivindicaciones 1-6, donde el análisis de los niveles de metilación de las citosinas se lleva a cabo mediante secuenciación específica de ADN convertido por bisulfito.

8. Método según una cualquiera de las reivindicaciones 1-6 donde el análisis de los niveles de metilación de las citosinas se lleva a cabo mediante la tecnología de pirosecuenciación del ADN convertido por bisulfito.

9. Oligonucleótidos de secuencias SEQ ID NO 1-79 para su empleo en el análisis de los niveles de metilación de las citosinas de los Paneles WNT-SHH y/o Gr3-G4.

10. Perfil de metilación de las citosinas del Panel WNT-SHH para su empleo como marcador de clasificación de pacientes con meduloblastoma en los tres subgrupos moleculares, WNT, SHH y no-WNT/no-SHH.

11. Perfil de metilación de las citosinas del Panel G3-G4 para su empleo como marcador de clasificación de pacientes con meduloblastoma en los subgrupos moleculares, Grupo 3 y Grupo 4.

12. Combinación de los perfiles de metilación de las citosinas del Panel WNT-SHH y Panel G3-G4 para su empleo como marcador de clasificación de pacientes con meduloblastoma en los subgrupos moleculares WNT, SHH, Grupo 3 y Grupo 4.

13. Kit para llevar a cabo el método de la reivindicación 1 que comprende:

- Un set de oligonucleótidos para el análisis de los niveles de metilación de las citosinas del Panel WNT-SHH; y
- Reactivos adecuados para la metodología empleada en el análisis de la metilación de las citosinas.

14. Kit según la reivindicación 13, caracterizado porque comprende un set de oligonucléotidos seleccionados de entre los oligonucleótidos de secuencias SEQ ID NO 1-18, 48, 49, 51, 52, 54, 55, 57, 58, 60, 61, 63, 64, 66, 67, 69, 70 y sus combinaciones, para el análisis de los niveles de metilación de las citosinas del Panel WNT-SHH mediante secuenciación específica de ADN convertido por bisulfito.

15. Kit según la reivindicación 13, caracterizado porque comprende un set de oligonucleótidos seleccionados de entre los oligonucleótidos de secuencias SEQ ID NO 1-6, 9-14, 17, 18, 35-71 y sus combinaciones, para el análisis de los niveles de metilación de las citosinas del Panel WNT-SHH mediante pirosecuenciación de ADN convertido por bisulfito.

16. Kit para llevar a cabo el método de la reivindicación 2 ó 3 que comprende:

- Un set de oligonucleótidos para el análisis de los niveles de metilación de las citosinas de los Paneles WNT-SHH y G3-G4; y
- Reactivos adecuados para la metodología empleada en el análisis de la metilación de las citosinas.

17. Kit, según la reivindicación 16, caracterizado porque comprende oligonucleótidos seleccionados de entre los oligonucleótidos de secuencias SEQ ID NO 1-34 y 48, 49, 51, 52, 54, 55, 57, 58, 60, 61, 63, 64, 66, 67, 69, 70 y sus combinaciones para el análisis de los niveles de metilación de las citosinas del Panel WNT-SHH y G3-G4 mediante secuenciación específica de ADN convertido por bisulfito.

18. Kit según la reivindicación 16, caracterizado porque comprende los oligonucleótidos seleccionados de entre los oligonucleótidos de secuencias SEQ ID NO 1-6, 9-14,

17-79 y sus combinaciones para el análisis de los niveles de metilación de las citosinas del Panel WNT-SHH y G3-G4 por pirosecuenciación de ADN convertido por bisulfito.

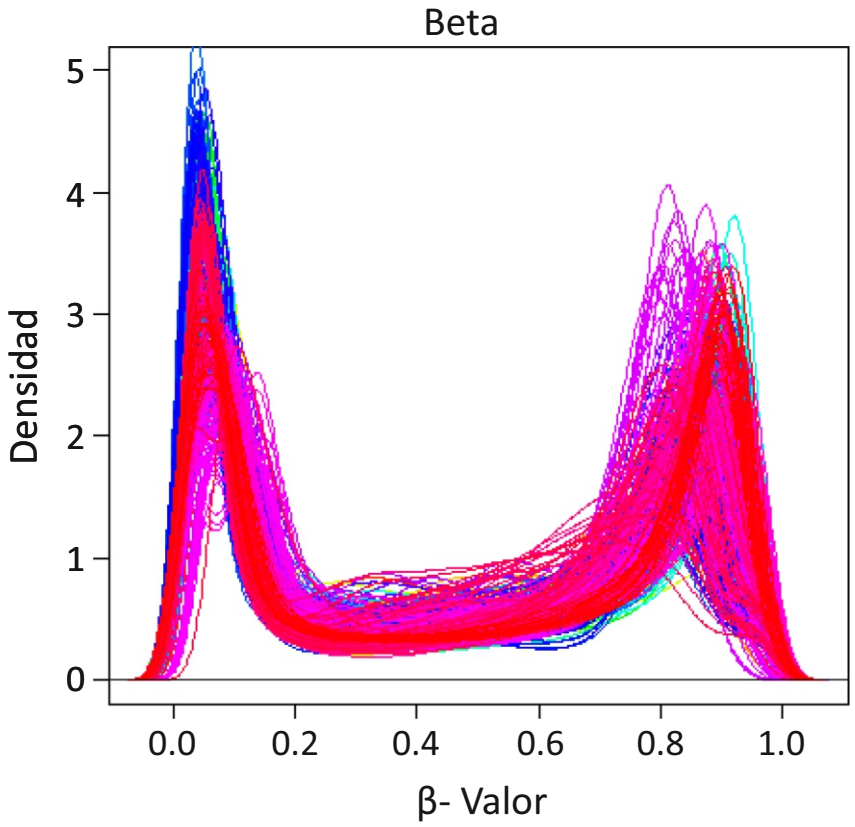


FIG. 1A

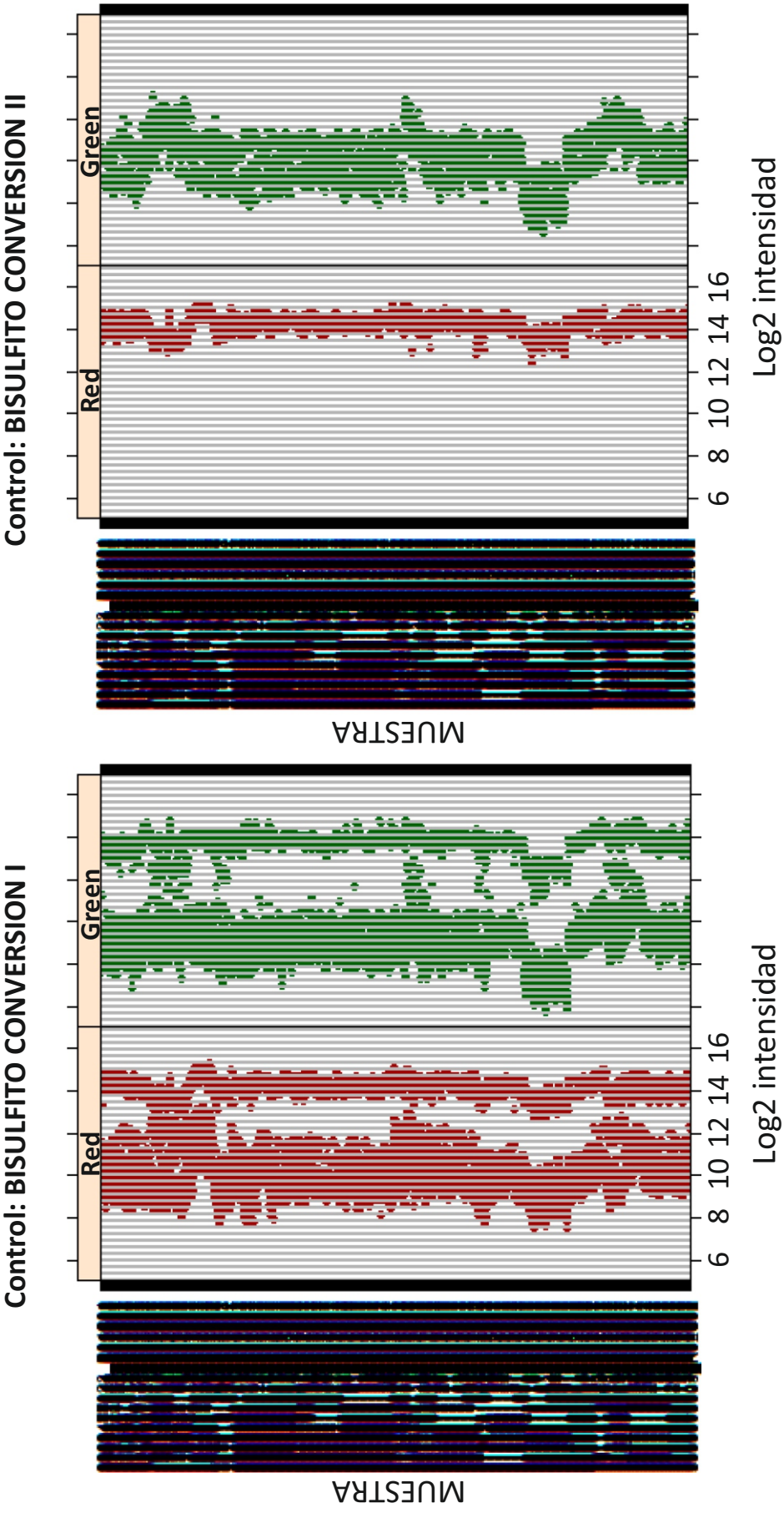

Control: BISULFITO CONVERSION II
Green
Red
6 8 10 12 14 16
Log2 intensidad
MUESTRA
Control: BISULFITO CONVERSION I
Green
Red
6 8 10 12 14 16
Log2 intensidad
MUESTRA

FIG. 1B

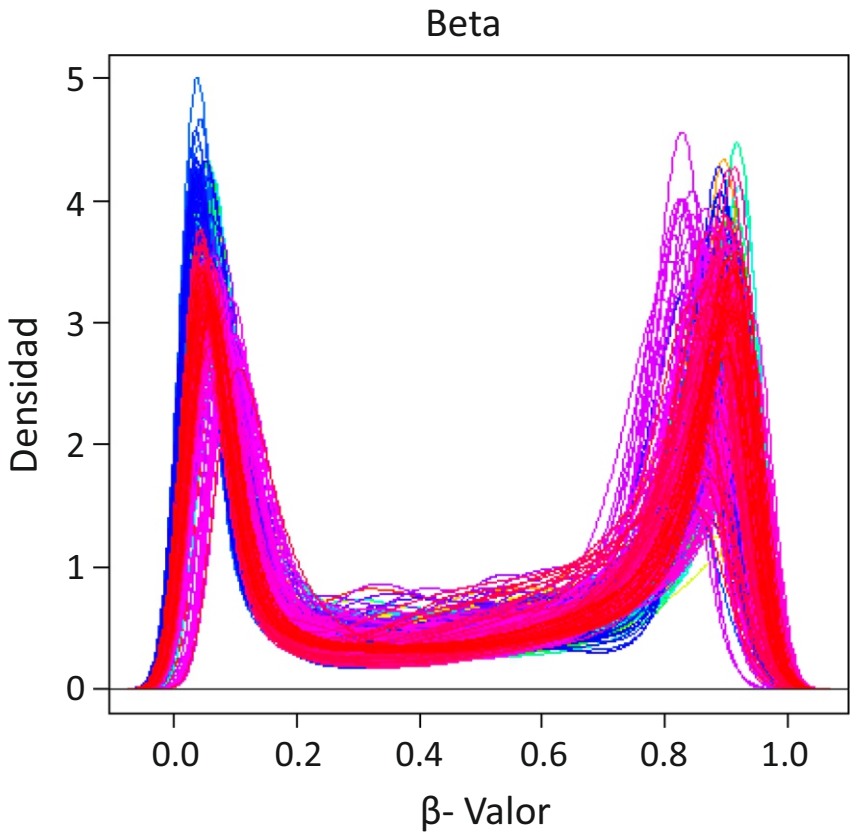


FIG. 1C

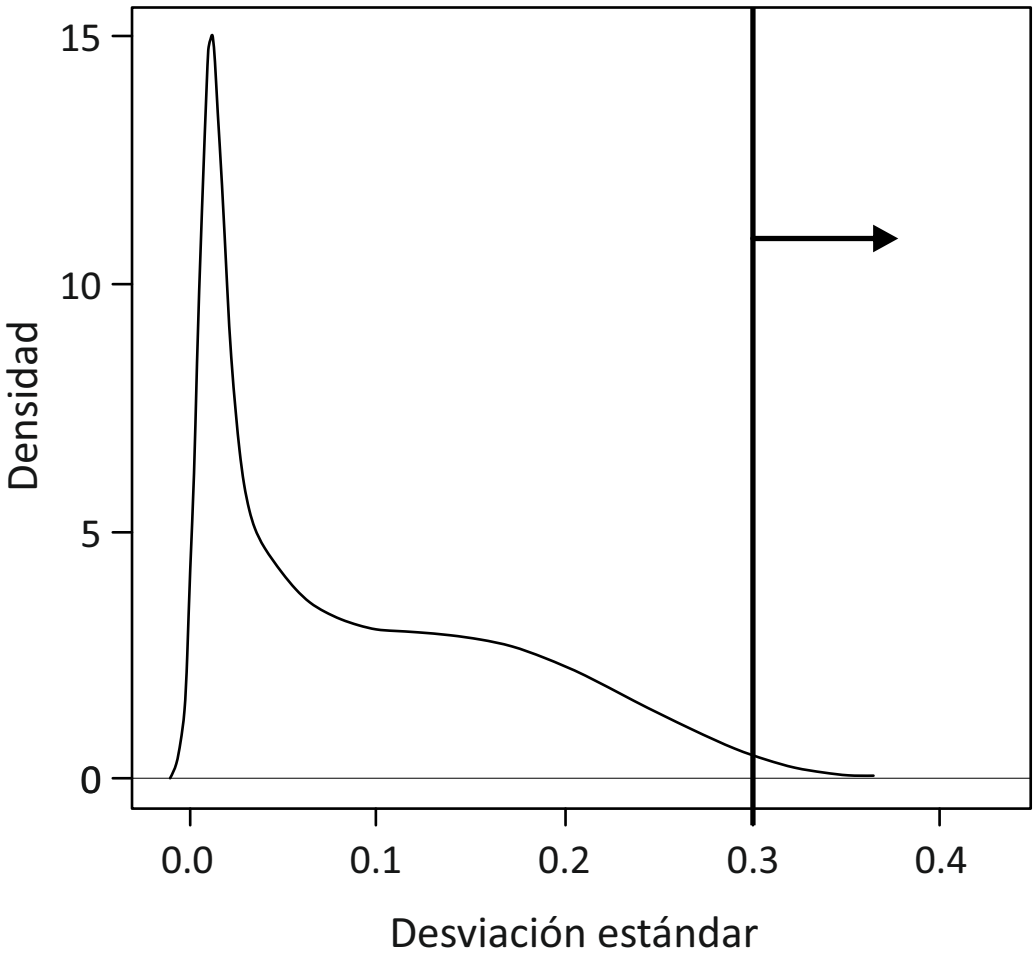


FIG. 2A

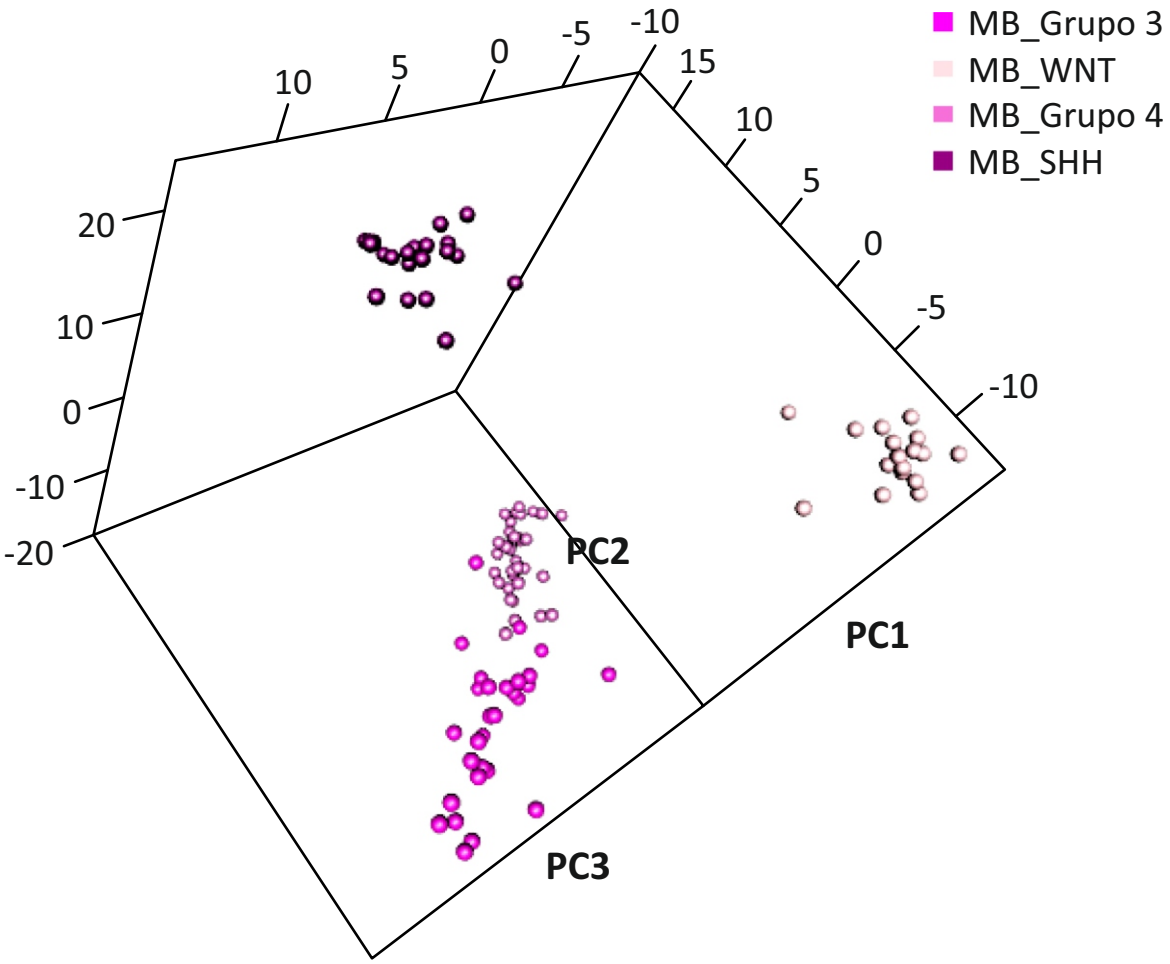

MB_Grupo 3
MB_WNT
MB_Grupo 4
MB_SHH
10
5
0
-5
-10
15
10
5
0
-5
-10
20
10
0
-10
-20
PC2
PC1
PC3

FIG. 2B

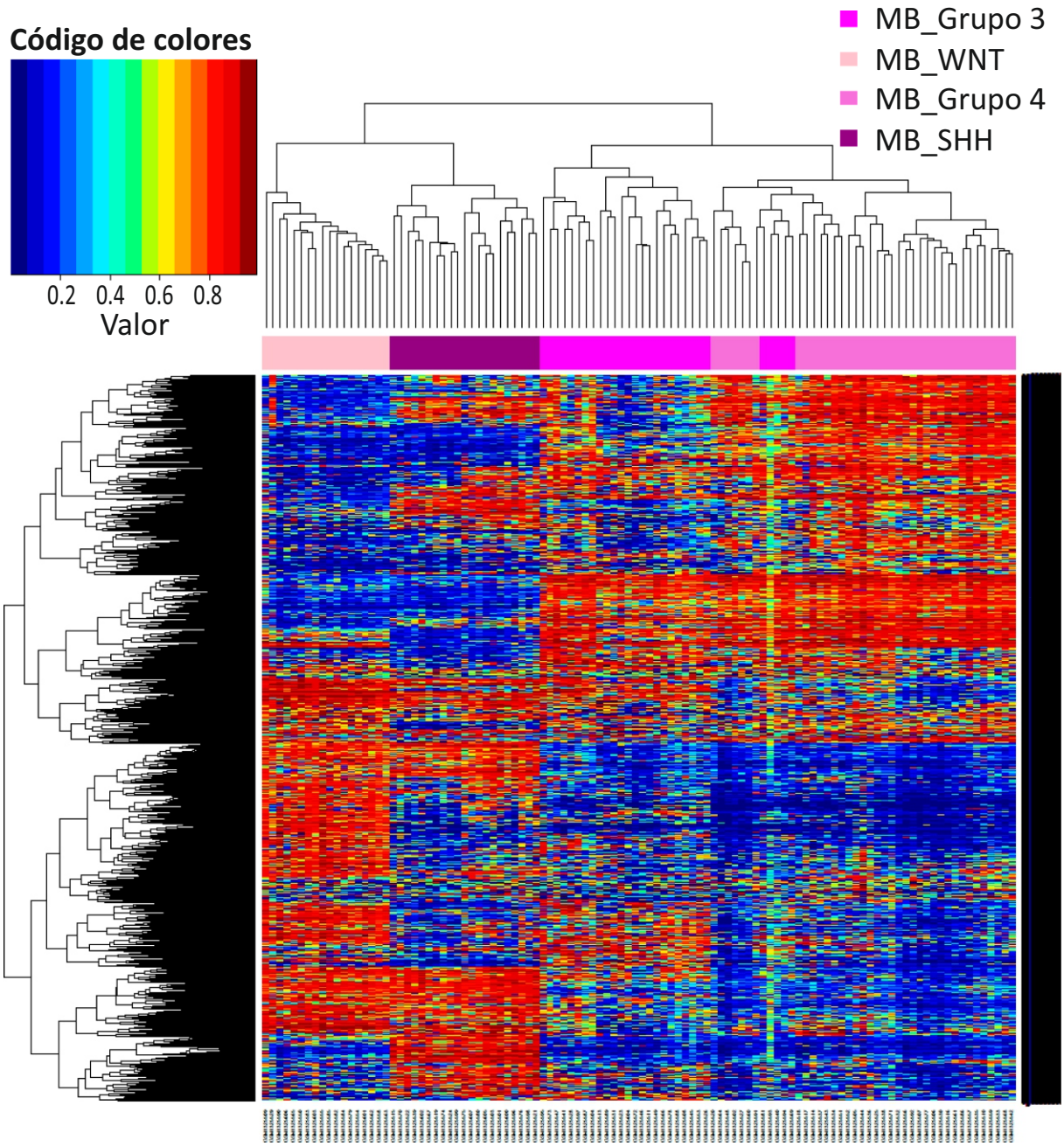

Código de colores
0.2
0.4
0.6
0.8
Valor
MB_Grupo 3
MB_WNT
MB_Grupo 4
MB_SHH

FIG. 2C

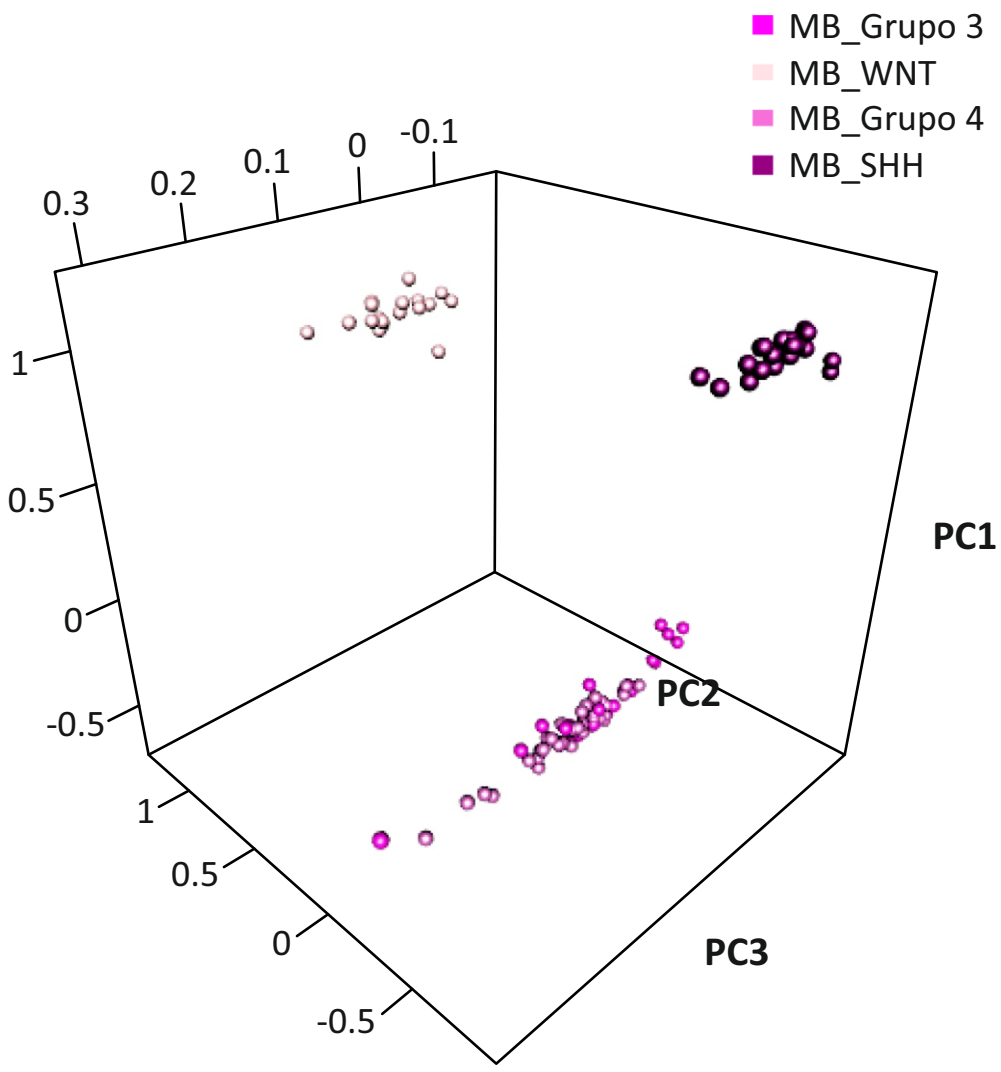
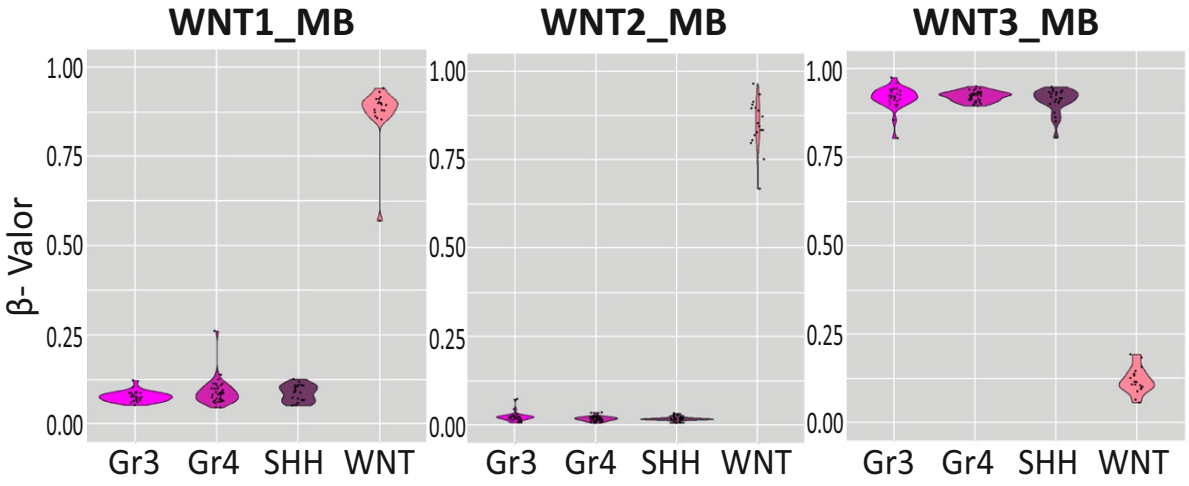
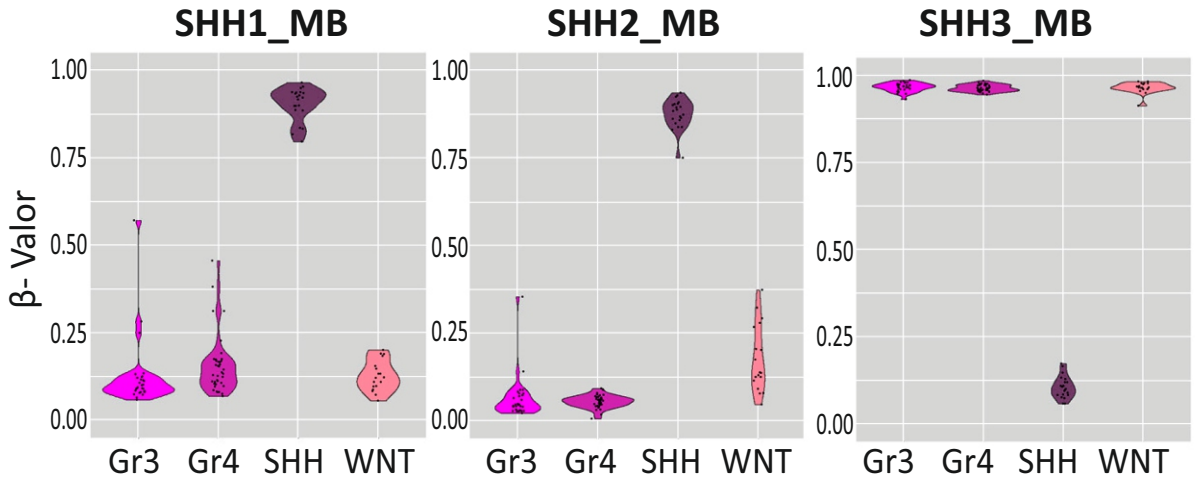

MB_Grupo 3
MB_WNT
MB_Grupo 4
MB_SHH
0.3
0.2
0.1
0
-0.1
1
0.5
0
-0.5
PC1
PC2
1
0.5
0
-0.5
PC3

FIG. 3A

Subgrupo WNT



Subgrupo SHH.



Subgrupo no-WNT/no-SHH.

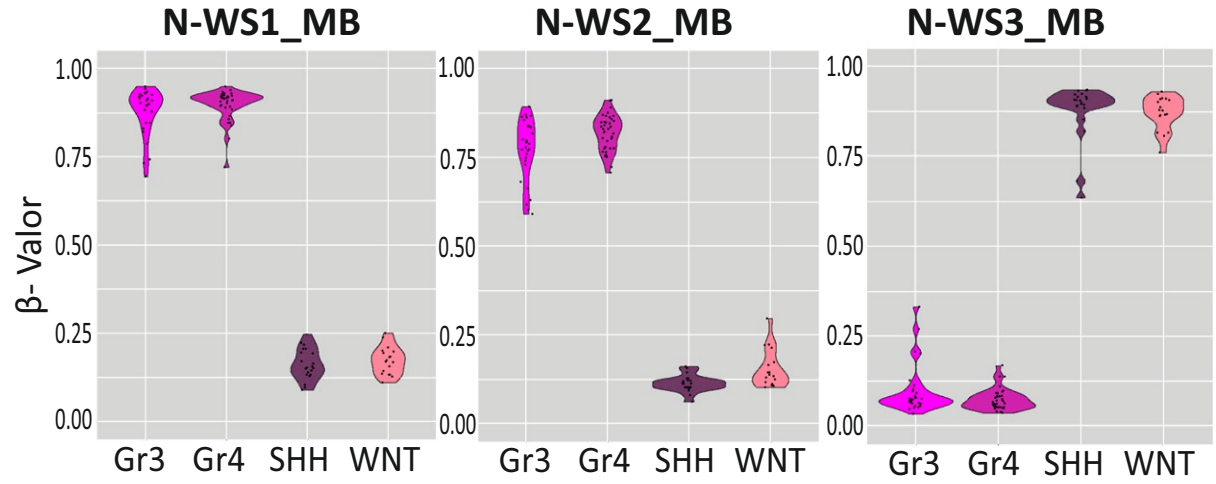


FIG. 3B

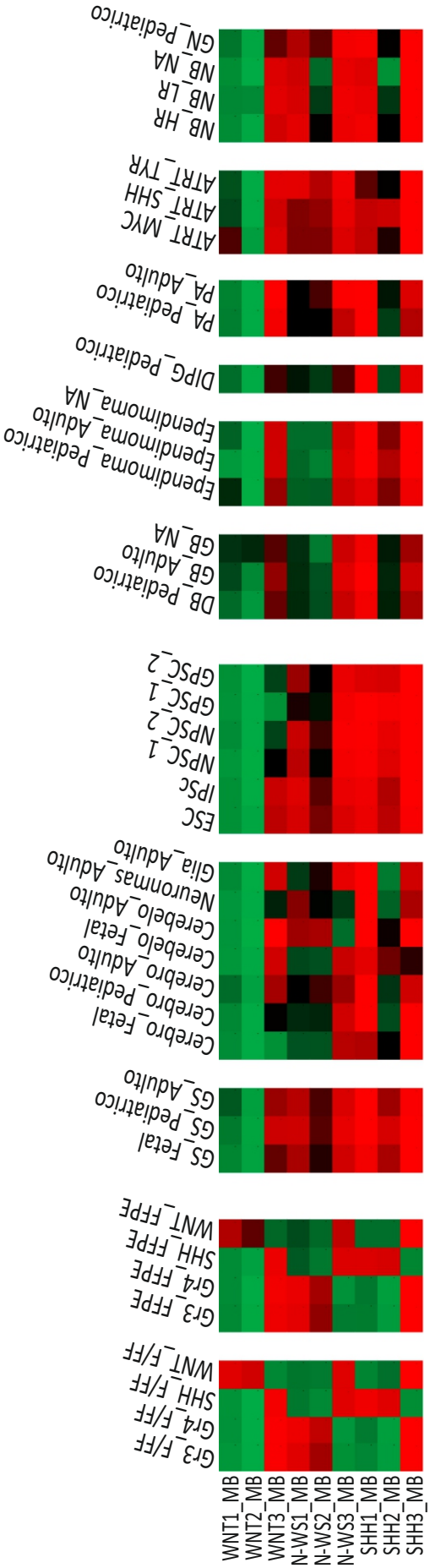

WNT1_MB
WNT2_MB
WNT3_MB
N-WS1_MB
N-WS2_MB
N-WS3_MB
SHH1_MB
SHH2_MB
SHH3_MB
Gr3_F/FF
Gr4_F/FF
SHH_F/FF
WNT_F/FF
Gr3_FFPE
Gr4_FFPE
SHH_FFPE
WNT_FFPE
GS_Fetal
GS_Pediatrico
GS_Adulto
Cerebro_Fetal
Cerebro_Pediatrico
Cerebro_Adulto
Cerebelo_Fetal
Cerebelo_Adulto
Neuronmas_Adulto
Glia_Adulto
ESC
IPSC
NPSC_1
NPSC_2
GPSC_1
GPSC_2
DB_Pediatrico
GB_Adulto
GB_NA
Ependimoma_Pediatrico
Ependimoma_Adulto
Ependimoma_NA
DIPG_Pediatrico
PA_Pediatrico
PA_Adulto
ATRT_MYC
ATRT_SHH
ATRT_TYR
NB_HR
NB_LR
NB_NA
GN_Pediatrico

FIG. 3C

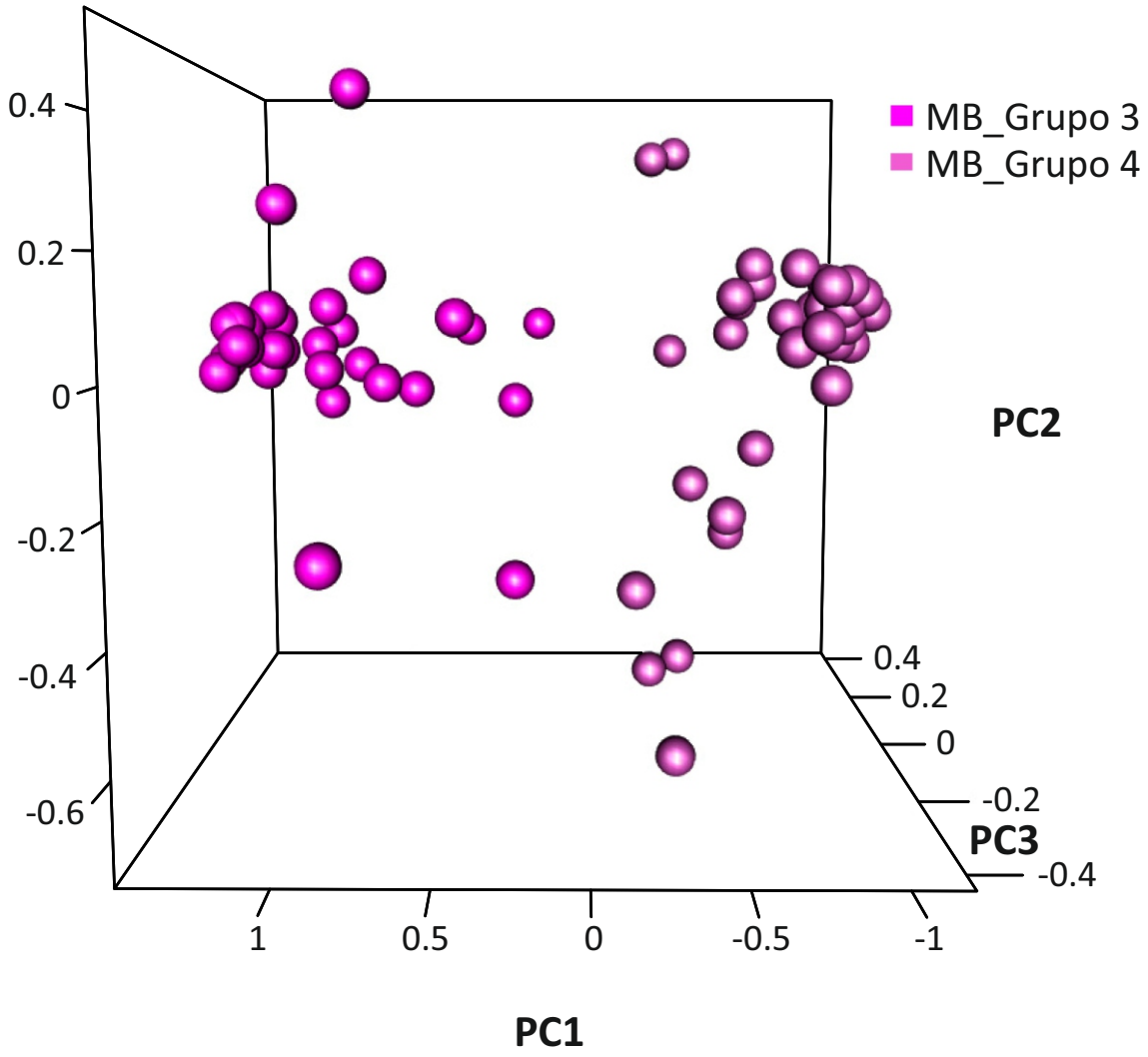

MB_Grupo 3
MB_Grupo 4
0.4
0.2
0
-0.2
-0.4
-0.6
PC2
0.4
0.2
0
-0.2
PC3
-0.4
1
0.5
0
-0.5
-1
PC1

FIG. 4A

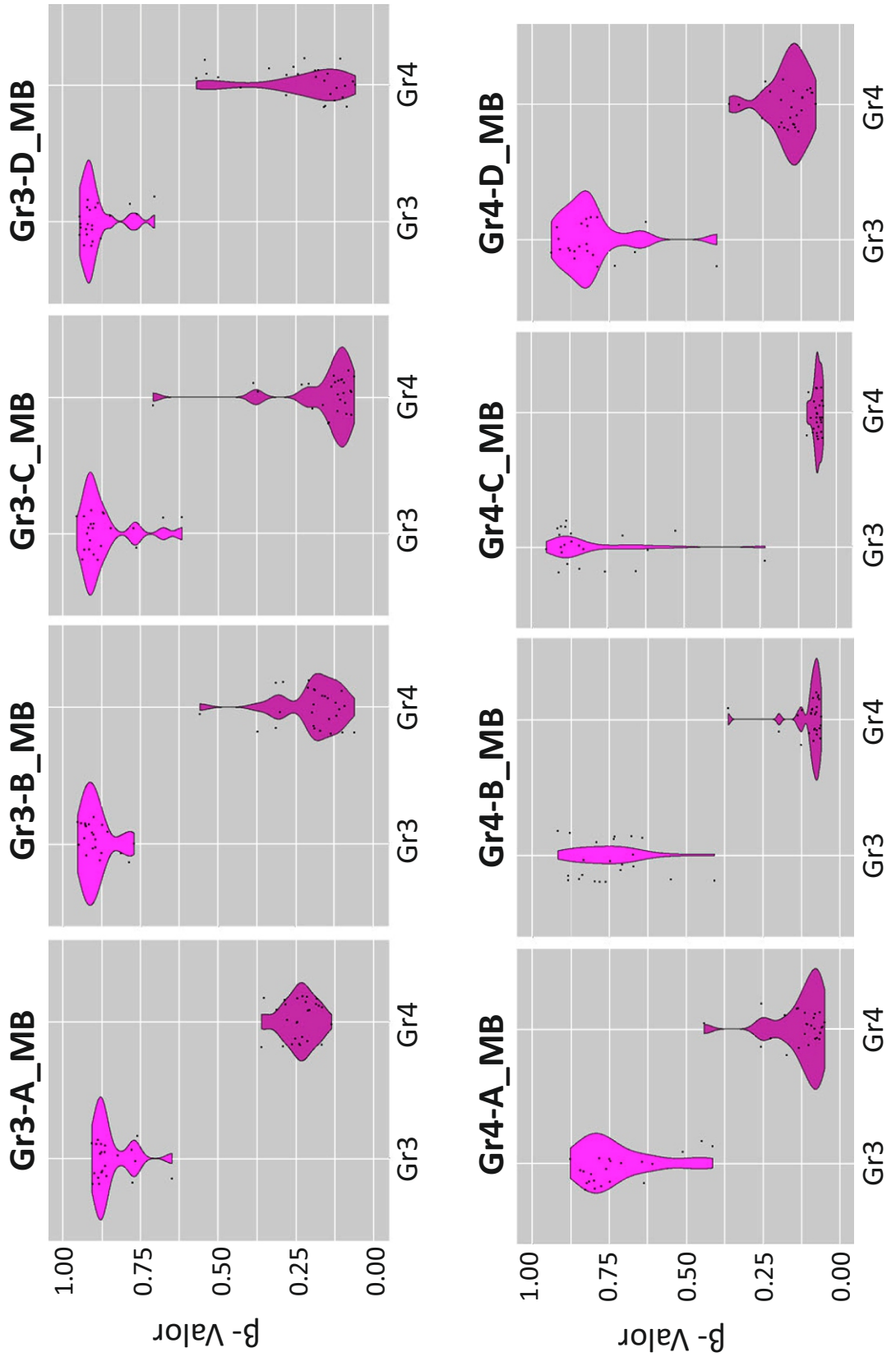

Gr3-A_MB
Gr3-B_MB
Gr3-C_MB
Gr3-D_MB
Gr4-A_MB
Gr4-B_MB
Gr4-C_MB
Gr4-D_MB
Gr3
Gr4
β- Valor
1.00
0.75
0.50
0.25
0.00

FIG. 4B

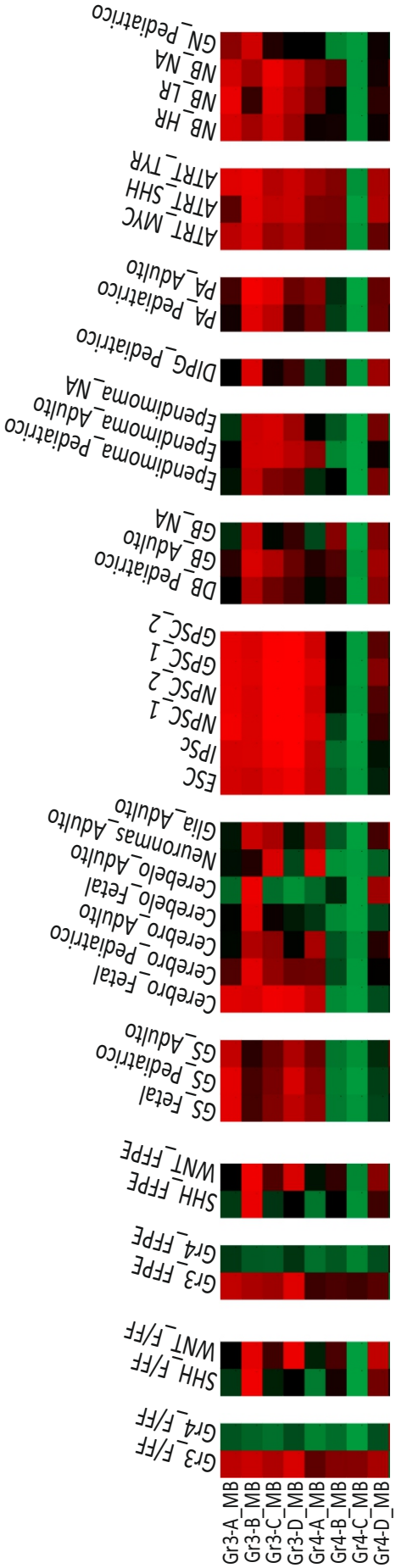

Gr3_F/FF
Gr4_F/FF
SHH_F/FF
WNT_F/FF
Gr3_FFPE
Gr4_FFPE
SHH_FFPE
WNT_FFPE
GS_Fetal
GS_Pediatrico
GS_Adulto
Cerebro_Fetal
Cerebro_Pediatrico
Cerebro_Adulto
Cerebelo_Fetal
Cerebelo_Adulto
Neuronmas_Adulto
Glia_Adulto
ESC
IPSc
NPSC_1
NPSC_2
GPSC_1
GPSC_2
DB_Pediatrico
GB_Adulto
GB_NA
Ependimoma_Pediatrico
Ependimoma_Adulto
Ependimoma_NA
DIPG_Pediatrico
PA_Pediatrico
PA_Adulto
ATRT_MYC
ATRT_SHH
ATRT_TYR
NB_HR
NB_LR
NB_NA
GN_Pediatrico
Gr3-A_MB
Gr3-B_MB
Gr3-C_MB
Gr3-D_MB
Gr4-A_MB
Gr4-B_MB
Gr4-C_MB
Gr4-D_MB

FIG. 4C

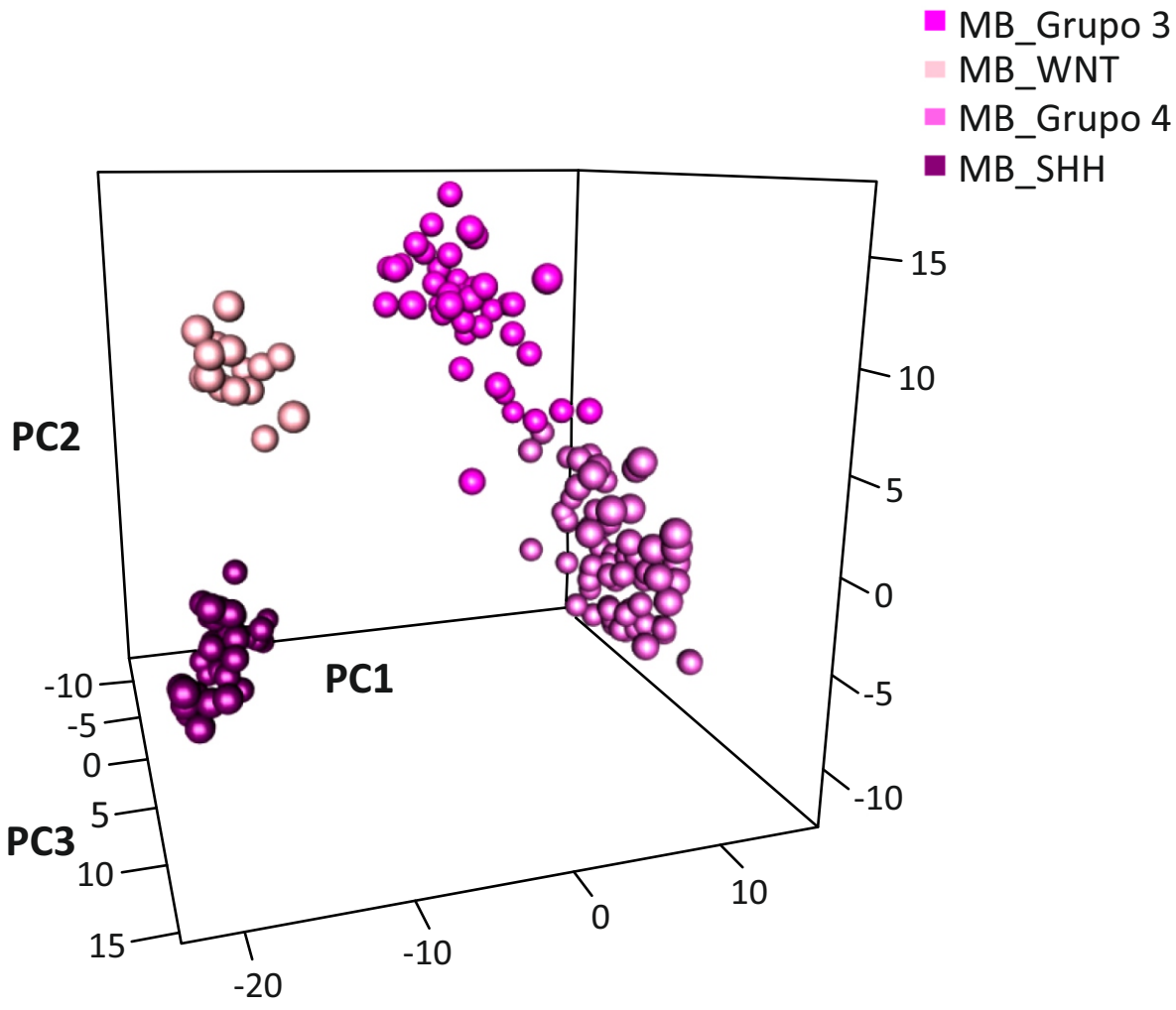

MB_Grupo 3
MB_WNT
MB_Grupo 4
MB_SHH
PC2
PC1
PC3
-10
-5
0
5
10
15
-20
-10
0
10
15
10
5
0
-5
-10

FIG. 5A

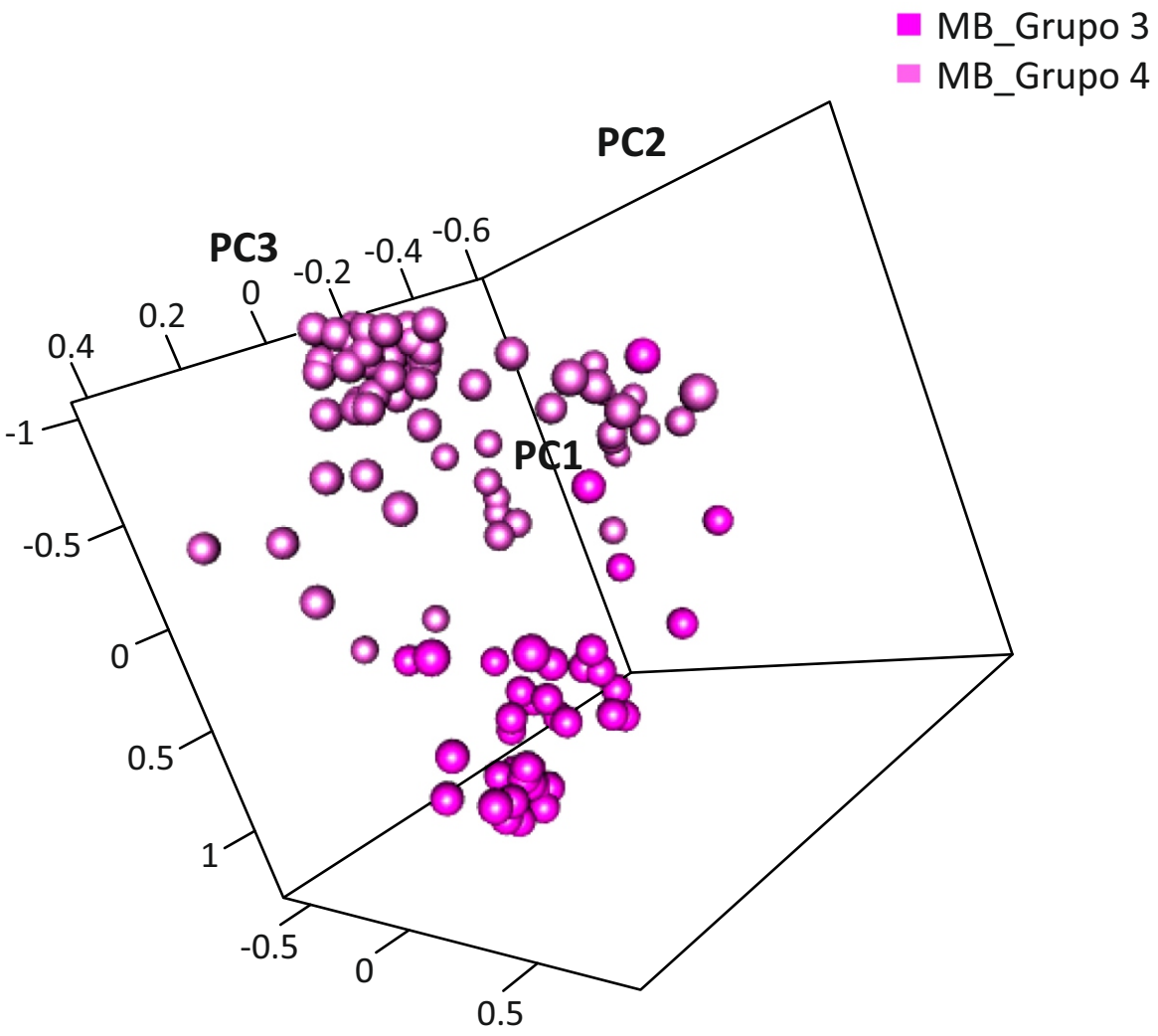


FIG. 5B

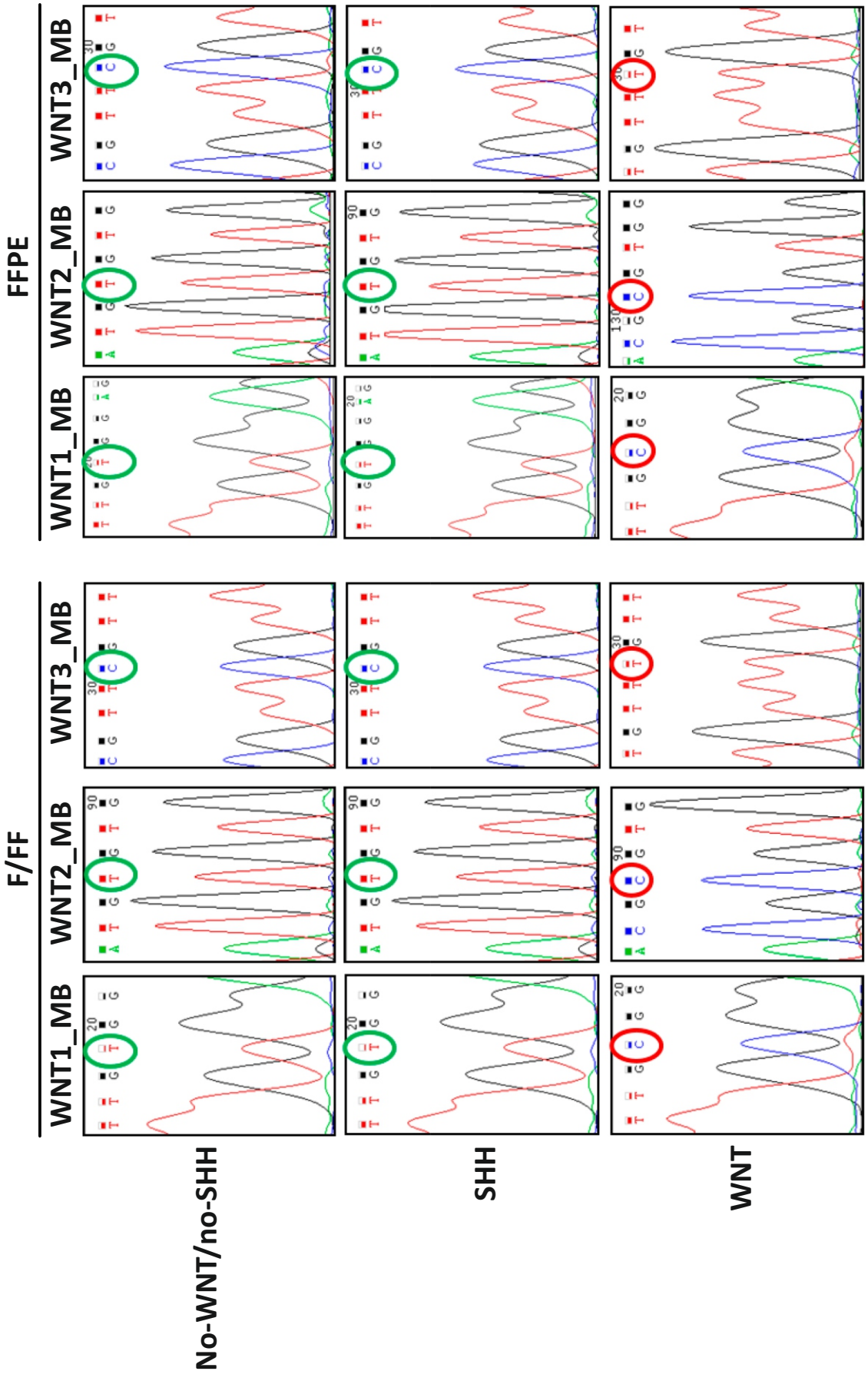


FIG. 6A

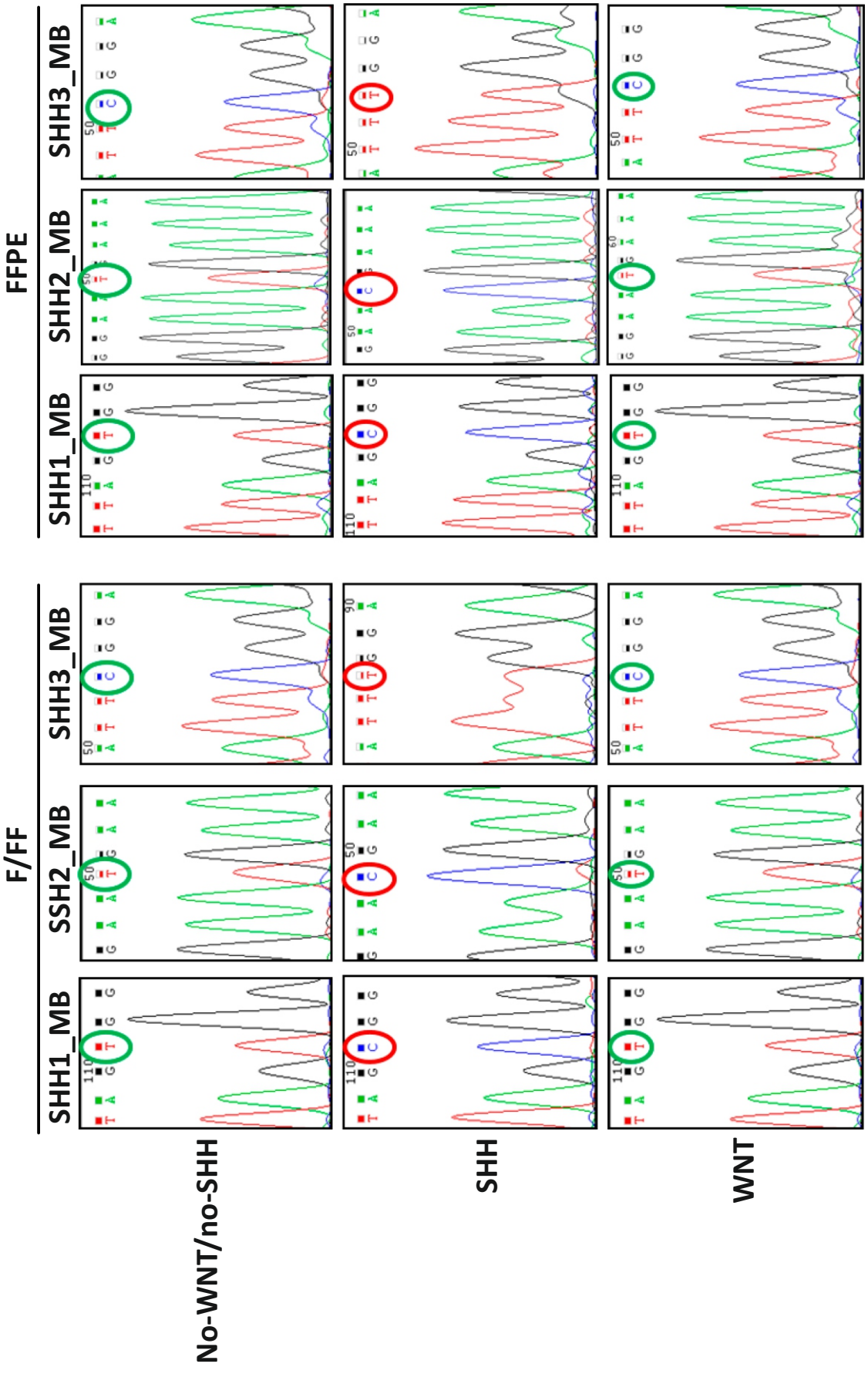


FIG. 6B

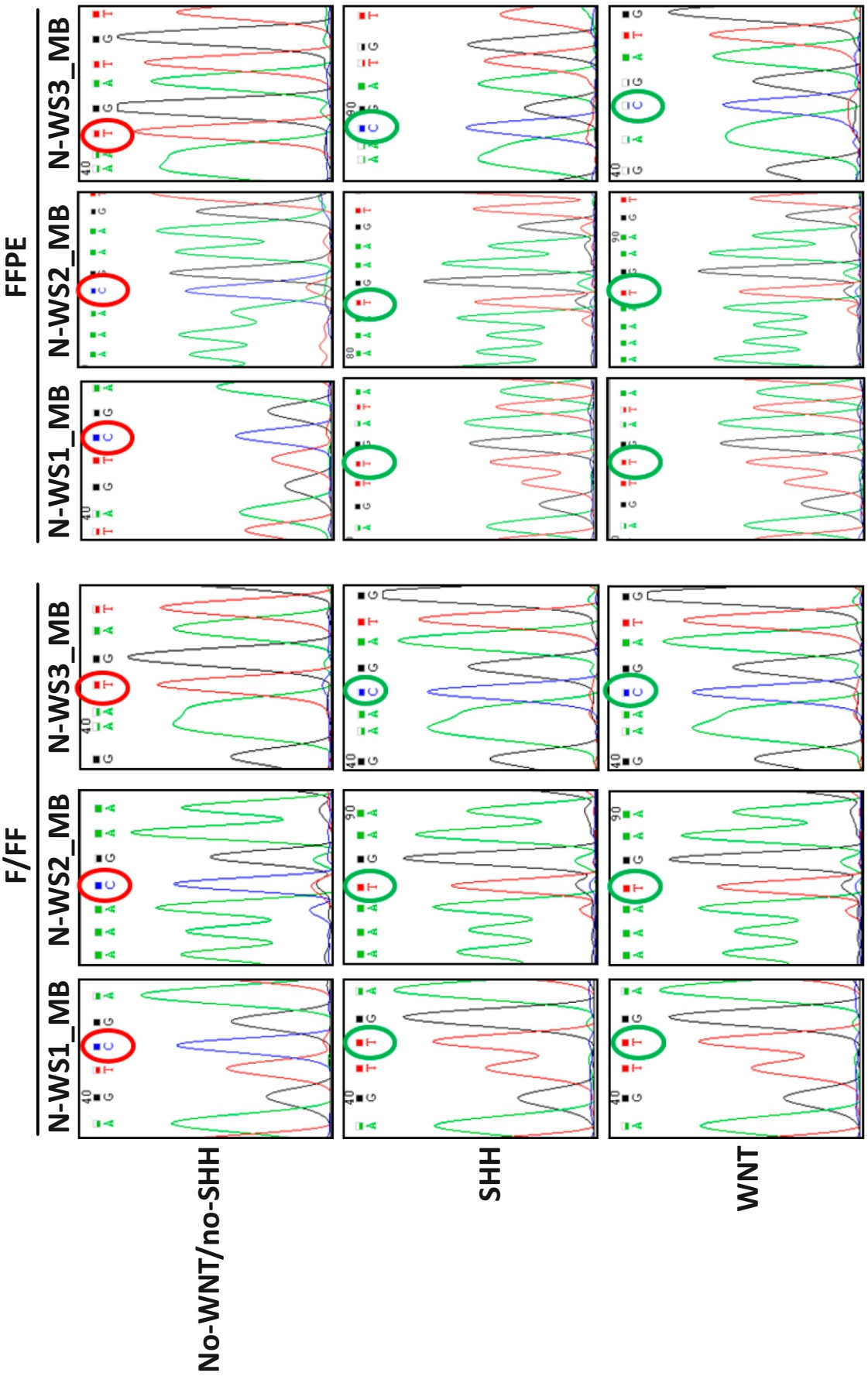

F/FF
FFPE
N-WS1_MB
N-WS2_MB
N-WS3_MB
N-WS1_MB
N-WS2_MB
N-WS3_MB
No-WNT/no-SHH
SHH
WNT

FIG. 6C

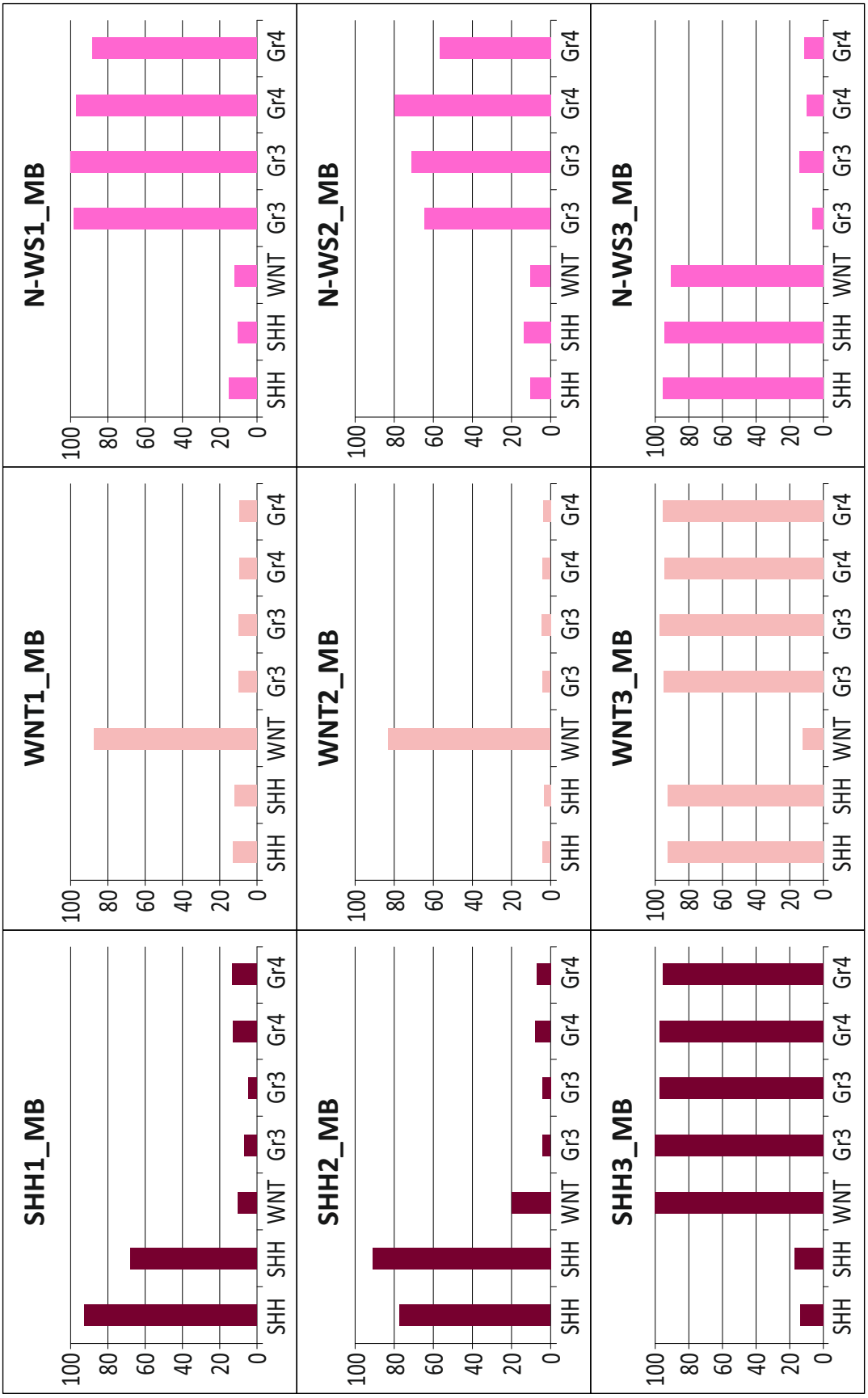

SHH1_MB
WNT1_MB
N-WS1_MB
SHH2_MB
WNT2_MB
N-WS2_MB
SHH3_MB
WNT3_MB
N-WS3_MB
100
80
60
40
20
0
SHH
SHH
WNT
Gr3
Gr3
Gr4
Gr4

FIG. 7

OFICINA ESPAÑOLA
DE PATENTES Y MARCAS

ESPAÑA

(21) N.º solicitud: 201730701

(22) Fecha de presentación de la solicitud: 17.05.2017

(32) Fecha de prioridad:

INFORME SOBRE EL ESTADO DE LA TECNICA

(51) **Int. CI. :** ***C12Q1/68*** (2006.01)

DOCUMENTOS RELEVANTES

Categoría	**(56) Documentos citados**	**Reivindicaciones afectadas**
A	SCHWALBE EDWARD C *et al*. DNA methylation profiling of medulloblastoma allows robust sub-classification and improved outcome prediction using formalin-fixed biopsies. Acta Neuropathologica. 2013, Vol. 125, Nº 3, Páginas 359-371. todo el documento.	1-12, 14, 15, 17, 18
A	WO 2016142533 A1 (DEUTSCHES KREBSFORSCHUNGSZENTRUM STIFTUNG DES ÖFFENTLICHEN RECHTS [DE/DE] & RUPRECHT-KARLS-UNIVERSITÄT HEIDELBERG [DE/DE]) 15/09/2016, página 18, Ejemplo 1; Reivindicaciones 1-5.	1-12, 14, 15, 17, 18
A	ES 2272504 T3 (EPIGENOMICS AG.) 01/05/2007, página 2, líneas 5-41; página 7, líneas 59- 68.	1-12, 14, 15, 17, 18

Categoría de los documentos citados
X: de particular relevancia
Y: de particular relevancia combinado con otro/s de la misma categoría
A: refleja el estado de la técnica
O: referido a divulgación no escrita
P: publicado entre la fecha de prioridad y la de presentación de la solicitud
E: documento anterior, pero publicado después de la fecha de presentación de la solicitud

El presente informe ha sido realizado

☒ para todas las reivindicaciones ☐ para las reivindicaciones nº:

Fecha de realización del informe	**Examinador**	**Página**
28.11.2017	M. D. García Grávalos	1/2

Documentación mínima buscada (sistema de clasificación seguido de los símbolos de clasificación)

C12Q

Bases de datos electrónicas consultadas durante la búsqueda (nombre de la base de datos y, si es posible, términos de búsqueda utilizados)

INVENES, EPODOC, WPI, BIOSIS, MEDLINE, EMBASE, EBI, USPTO PATENT DATABASE, GOOGLE PATENTS.