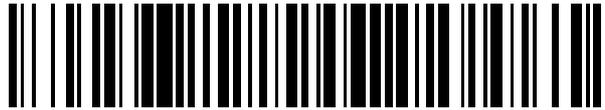


19



OFICINA ESPAÑOLA DE
PATENTES Y MARCAS

ESPAÑA



11 Número de publicación: **2 720 195**

51 Int. Cl.:

C12Q 1/6851 (2008.01)

C12Q 1/6886 (2008.01)

12

TRADUCCIÓN DE PATENTE EUROPEA

T3

86 Fecha de presentación y número de la solicitud internacional: **26.11.2013 PCT/AU2013/001367**

87 Fecha y número de publicación internacional: **30.05.2014 WO14078913**

96 Fecha de presentación y número de la solicitud europea: **26.11.2013 E 13857102 (1)**

97 Fecha y número de publicación de la concesión europea: **20.03.2019 EP 2922973**

54 Título: **Un método de detección de metilación**

30 Prioridad:

26.11.2012 US 201261729831 P

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

18.07.2019

73 Titular/es:

**CLINICAL GENOMICS PTY LTD (100.0%)
Riverside Life Sciences Building, 11 Julius
Avenue
North Ryde, New South Wales 2113, AU**

72 Inventor/es:

**MCEVOY, AIDAN;
PEDERSEN, SUSANNE y
BAKER, ROHAN**

74 Agente/Representante:

ELZABURU, S.L.P

ES 2 720 195 T3

Aviso: En el plazo de nueve meses a contar desde la fecha de publicación en el Boletín Europeo de Patentes, de la mención de concesión de la patente europea, cualquier persona podrá oponerse ante la Oficina Europea de Patentes a la patente concedida. La oposición deberá formularse por escrito y estar motivada; sólo se considerará como formulada una vez que se haya realizado el pago de la tasa de oposición (art. 99.1 del Convenio sobre Concesión de Patentes Europeas).

DESCRIPCIÓN

Un método de detección de metilación

Campo de la invención

5 La presente invención se refiere a un método de cribado de la presencia de ADN metilado en una muestra biológica. Más en particular, la presente invención se refiere a un método de cribado cuantitativo del nivel de uno o más genes metilados de interés sin necesidad de usar una muestra de referencia interna sin digerir como punto de referencia frente al que se calcula la cuantificación relativa. La presente invención es útil en una diversidad de aplicaciones que incluyen, pero sin limitación, proporcionar un medio más simple y exacto para determinar el estado de metilación del ADN, tal como en el contexto del diagnóstico o la monitorización de afecciones caracterizadas por cambios en la metilación del ADN.

Antecedentes de la invención

Los detalles bibliográficos de las publicaciones a las que hace referencia el autor en esta memoria descriptiva se recogen por orden alfabético al final de la descripción.

15 La referencia en esta memoria descriptiva a cualquier publicación anterior (o información derivada de ella), o a cualquier materia que se conoce, no se considera ni se debería considerar como reconocimiento o admisión o cualquier forma de sugerencia de que esa publicación anterior (o información derivada de ella) o materia conocida forme parte del conocimiento general común en el campo de investigación al que se refiere esta memoria descriptiva.

20 El cáncer colorrectal incluye los crecimientos cancerosos en el colon, recto y apéndice. Con 655.000 muertes al año en todo el mundo, es la cuarta forma más frecuente de cáncer en los Estados Unidos, y la tercera causa de muerte relacionada con el cáncer en los países occidentales. Los cánceres colorrectales surgen de pólipos adenomatosos en el colon. Estos crecimientos en forma de hongo normalmente son benignos, pero algunos se transforman en cáncer con el tiempo. El cáncer de colon localizado se diagnostica normalmente por medio de una colonoscopia.

25 Los cánceres invasivos que están confinados dentro de la pared del colon (estadios I y II de TNM) son curables con cirugía. Si no se tratan, se diseminan a los nódulos linfáticos regionales (estadio III), en los que hasta un 73% son curables mediante cirugía y quimioterapia. El cáncer que metastatiza en localizaciones distantes (estadio IV) normalmente no es curable, aunque la quimioterapia puede prolongar la supervivencia, y en casos poco frecuentes, se ha observado que la cirugía y la quimioterapia juntas han curado a los pacientes (Markowitz y Bertagnolli, 2009, *N. Engl. J. Med.* 361(25): 2449-60). Con el cáncer rectal se usa radiación.

30 El cáncer colorrectal va precedido por adenomas. Los adenomas son tumores benignos, o neoplasias benignas, de origen epitelial que derivan del tejido glandular o que exhiben estructuras glandulares claramente definidas. Algunos adenomas muestran elementos tisulares reconocibles, tales como un tejido fibroso (fibroadenomas) y una estructura epitelial, mientras otros, tales como los adenomas bronquiales, producen compuestos activos que podrían dar lugar a síndromes clínicos.

35 Los adenomas pueden progresar para convertirse en una neoplasia invasiva, y entonces se denominan adenocarcinomas. Por lo tanto, los adenocarcinomas se definen como tumores epiteliales malignos que surgen de estructuras glandulares, que son partes constituyentes de muchos órganos del cuerpo. El término adenocarcinoma también se aplica a los tumores que muestran un patrón de crecimiento glandular. Estos tumores se pueden subclasificar según las sustancias que producen, por ejemplo adenocarcinomas secretores de mucosidad y adenocarcinomas serosos, o según la disposición microscópica de sus células en patrones, por ejemplo adenocarcinomas papilares y foliculares. Estos carcinomas pueden ser sólidos o quísticos (cistoadenocarcinomas). Cada órgano puede producir tumores que muestran una diversidad de tipos histológicos, por ejemplo el ovario puede producir carcinomas mucinosos y cistoadenocarcinomas.

45 Los síntomas del cáncer colorrectal dependen de la posición del tumor en el intestino, y si ha metastatizado. Desafortunadamente, muchos de los síntomas también se pueden dar en otras enfermedades, y por lo tanto los síntomas pueden no ser concluyentemente diagnósticos del cáncer colorrectal.

50 Los síntomas locales son más probables si el tumor está localizado más cerca del ano. Puede existir un cambio en los hábitos intestinales (estreñimiento o diarrea de nueva aparición en ausencia de otra causa), una sensación de defecación incompleta y una reducción del diámetro de las heces. El tenesmo y el cambio en la forma de las heces son característicos del cáncer rectal. Las hemorragias digestivas bajas, que incluyen el paso de sangre roja brillante en las heces, puede indicar el cáncer colorrectal, al igual que la presencia incrementada de mucosidad. La melena, heces negras con un aspecto alquitranado, se da normalmente en la hemorragia digestiva alta (tal como debido a una úlcera duodenal), pero a veces se halla en el cáncer colorrectal cuando la enfermedad está localizada al comienzo del intestino grueso.

El cáncer colorrectal se disemina con mucha frecuencia al hígado. Esto puede ocurrir de manera inadvertida, pero los grandes depósitos en el hígado pueden provocar ictericia y dolor abdominal (debido al estiramiento de la cápsula). Si la metástasis tumoral obstruye las vías biliares, la ictericia puede ir acompañada por otras características de la obstrucción biliar, tales como heces pálidas.

- 5 El cáncer colorrectal puede requerir muchos años para desarrollarse, y la detección temprana del cáncer colorrectal mejora enormemente el pronóstico. Incluso los esfuerzos modestos para implementar métodos de cribado de cáncer colorrectal pueden dar como resultado una disminución de las muertes por cáncer. A pesar de esto, las tasas de cribado del cáncer colorrectal siguen siendo bajas. En la actualidad existen varias pruebas diferentes para este fin:
- 10 • Examen rectal digital: El doctor inserta un dedo enguantado y lubricado en el recto para palpar en busca de áreas anormales. Solamente se detectan tumores lo suficientemente grandes para poder ser palpados en la parte distal del recto, pero es útil como prueba de cribado inicial.
 - 15 • Análisis de sangre oculta en heces: un análisis en busca de sangre en las heces. Se pueden usar dos tipos de análisis para detectar sangre oculta en heces, es decir, basados en guayaco (análisis químico) e inmunoquímico. La sensibilidad de los análisis inmunoquímicos es superior a la de los análisis químicos sin una reducción inaceptable de la especificidad (Weitzel JN (diciembre de 1999). "Genetic cancer risk assessment. Putting it all together". *Cancer* 86 (11 Supl): 2483-92).
 - 20 • Endoscopia:
 - o Sigmoidoscopia: Se inserta una sonda iluminada (sigmoidoscopio) en el recto y el colon inferior para comprobar la existencia de pólipos y otras anormalidades.
 - 20 o Colonoscopia: Se inserta una sonda iluminada denominada colonoscopio en el recto y la totalidad del colon para buscar pólipos y otras anormalidades que pueden estar provocadas por el cáncer. La colonoscopia tiene la ventaja de que si se hallan pólipos durante el procedimiento se pueden eliminar inmediatamente. También se puede recoger tejido para una biopsia.
 - 25 • Enema de bario de doble contraste (DCBE): Primero, se toma una preparación por la noche para limpiar el colon. Se administra un enema que contiene sulfato de bario, y después se insufla aire en el colon, lo que lo distiende. El resultado es una capa fina de bario sobre la superficie interna del colon que es visible en películas de rayos X. De esta manera se puede detectar un cáncer o un pólipo precanceroso. Esta técnica puede no detectar el pólipo plano (menos habitual).
 - 30 • La colonoscopia virtual sustituye las películas de rayos X del enema de bario de doble contraste (anteriormente mencionado) con un barrido mediante tomografía computarizada especial, y requiere un programa informático especial para la interpretación por parte del radiólogo. Esta técnica se está aproximando a la sensibilidad de la colonoscopia para los pólipos. Sin embargo, cualquier pólipo hallado se debe eliminar mediante la colonoscopia estándar.
 - 35 • La tomografía axial computarizada estándar es un método de rayos X que se puede usar para determinar el grado de diseminación del cáncer, pero no es lo suficientemente sensible para usarlo para el cribado. Algunos cánceres se hallan en barridos TAC llevados a cabo por otras razones.
 - 40 • Análisis de sangre: La medida de la sangre del paciente en busca de niveles elevados de ciertas proteínas puede proporcionar una indicación de la carga tumoral. En particular, el nivel elevado de antígeno carcinoembrionario (CEA) en la sangre puede indicar la metástasis del adenocarcinoma. Aunque estos análisis con frecuencia son falsos positivos o falsos negativos, y no se recomiendan para el cribado, pueden ser útiles para estudiar la recidiva de la enfermedad. Los biomarcadores CA19-9 y CA 242 pueden indicar riesgos metastásicos relacionados con e-selectina, ayudan en el seguimiento del progreso terapéutico, y evalúan la recidiva de la enfermedad. Recientemente también ha aparecido un análisis para la detección en plasma de secuencias metiladas del gen Septina 9 para ayudar en el diagnóstico del cáncer colorrectal.
 - 45 • La tomografía de emisión de positrones (PET) es una tecnología de barrido tridimensional en la que se inyecta un carbohidrato radiactivo al paciente, el carbohidrato se acumula en los tejidos con una actividad metabólica elevada, y se forma una imagen midiendo la emisión de radiación del carbohidrato. Debido a que las células cancerosas a menudo tienen tasas metabólicas muy elevadas, se puede usar para diferenciar los tumores benignos y malignos. No se usa PET para el cribado, y (todavía) no tiene un lugar en las pruebas diagnósticas rutinarias de los casos de cáncer colorrectal.
 - 50 • El análisis de ADN en heces es una tecnología emergente en el cribado del cáncer colorrectal. Los adenomas premalignos y cánceres desprenden marcadores de ADN desde sus células que no se degradan durante el proceso digestivo, y siguen siendo estables en las heces. La captura, seguida de PCR, amplifica el ADN hasta niveles detectables para el análisis.

- Niveles elevados de Proteína C Reactiva como marcador de riesgo.

A pesar de la existencia de estas pruebas, el diagnóstico sigue siendo problemático. La mayoría de las pruebas más sensibles son bastante invasivas y caras, y por lo tanto la aceptación por los pacientes es baja. Por lo tanto, la determinación de que los cambios en la metilación de ciertos genes es indicativa del desarrollo de neoplasias del intestino grueso ha sido muy significativa, ya que proporciona un medio sumamente sensible y fiable de cribado del inicio de las neoplasias del intestino grueso.

Existe una diversidad de métodos que están disponibles en la actualidad para identificar sitios de metilación alterados en las células cancerosas. El análisis de los patrones de metilación del ADN y la distribución de 5-metilcitosina se lleva a cabo habitualmente mediante el uso de un tratamiento con bisulfito (Frommer et al., *Proc. Natl. Acad. Sci. USA*, 89:1827-1831, 1992). De manera específica, el tratamiento con bisulfito del ADN se usa como punto de partida para el análisis de la metilación mediante el uso de una diversidad de técnicas. Estas incluyen la PCR específica de metilación (MSP) (Herman et al., *Proc. Natl. Acad. Sci. USA*, 93:9821-9826, 1992) y la digestión con enzimas de restricción de los productos de PCR amplificados a partir del ADN convertido con bisulfito (Sadri y Hornsby, *Nucl. Acids Res.* 24:5058-5059, 1996; Xiong y Laird, *Nucl. Acids Res.* 25:2532-2534, 1997). El tratamiento con bisulfito sódico convierte todas las citosinas sin metilar del ADN en uracilo mediante desaminación, pero deja intactos los residuos de citosina metilada. La amplificación posterior mediante PCR sustituye los residuos de uracilo con timinas y los residuos de 5-metilcitosina con citosinas. La diferencia de las secuencias resultantes se puede detectar mediante el uso de técnicas habituales de detección de secuencias de ADN, principalmente mediante secuenciación de ADN tratado con bisulfito mediante PCR específica de metilación. Sin embargo, existen desventajas en los métodos basados en la conversión con bisulfito, lo que incluye la necesidad de disponer de concentraciones iniciales elevadas de ADN debido a la acción relativamente fuerte del bisulfito sódico. Otro método de análisis de los cambios en los patrones de metilación es un proceso basado en PCR que implica la digestión de ADN nativo/natural con enzimas de restricción sensibles a la metilación antes de la amplificación mediante PCR (Singer-Sam et al., *Nucleotide. Acids. Res.* 18:687, 1990; véase también la página 37 del documento US2012/0264618). Sin embargo, este método tiene tendencia a sufrir un grado elevado de señales positivas falsas (es decir, que existe metilación) debido a la digestión incompleta del ADN sin metilar, que después se amplifica equivocadamente en una reacción de PCR posterior. Aunque se ha llevado a cabo una investigación significativa en un esfuerzo por mejorar este método para el cribado, en particular para reducir la incidencia de falsos positivos resultantes de la digestión incompleta, esta tecnología no ha posibilitado la eliminación de la incidencia de falsos positivos. Es decir, aunque se han desarrollado mejoras que reducen el grado de digestión incompleta, no se ha desarrollado un método que realice de manera fiable y rutinaria la digestión completa. Por lo tanto, hasta la fecha, los métodos basados en el uso de endonucleasas de restricción sensibles a la metilación han necesitado el análisis mediante PCR de alícuotas sin digerir y digeridas de la muestra de análisis, donde la muestra de análisis se estudia respecto de este control, y la lectura que se obtiene es realmente de naturaleza relativa. Por lo tanto, existe una necesidad actual de desarrollar métodos mejorados que no sufran estas limitaciones.

En el trabajo que condujo a la presente invención, se ha determinado que cuando el análisis relacionado con endonucleasas de restricción sensibles a la metilación de la metilación del ADN se basa en el uso de al menos dos enzimas sensibles a la metilación junto con la digestión a 4-6 pg de ADN/unidad de endonucleasa/hora, se consigue un nivel de digestión que es efectivamente completo, lo que significa que la amplificación mediante PCR no dará como resultado amplicones detectables debido a la presencia de ADN sin digerir. Además, cuando la amplificación se lleva a cabo mediante PCR cuantitativa con el uso de cebadores que flanquean la región de secuencias de reconocimiento de endonucleasas de restricción específicas de metilación, es factible una cuantificación absoluta, y se elimina la necesidad de amplificar una muestra de control interno sin digerir para calcular valores cuantitativos relativos. Este avance tiene implicaciones significativas desde el punto de vista de la utilidad en el diagnóstico, ya que no solamente proporciona un método más simple y barato para analizar la metilación del ADN, sino también un medio para obtener con exactitud una cuantificación absoluta.

Sumario de la invención

El alcance de la presente invención está determinado por las reivindicaciones adjuntas 1 a 13.

A lo largo de esta memoria descriptiva y las reivindicaciones que aparecen a continuación, a menos que el contexto lo requiera de otra manera, se entenderá que la palabra "comprender", y las variaciones tales como "comprende" y "que comprende", implican la inclusión de una entidad o etapa mencionadas o grupo de entidades o etapas, pero sin la exclusión de cualquier otra entidad o etapa o grupo de entidades o etapas.

Tal como se usa en la presente memoria, el término "procedente de" se considerará que indica que una entidad particular o grupo de entidades se ha originado de la especie especificada, pero no se ha obtenido necesariamente directamente de la fuente especificada. Además, tal como se usa en la presente memoria, las formas singulares "un", "uno", y "el" incluyen las referencias plurales, a menos que el contexto lo dicte claramente de otra manera. A menos que se defina de otra manera, todos los términos técnicos y científicos usados en la presente memoria tienen el mismo significado que comprende habitualmente un experto en la técnica a la que pertenece esta invención.

La presente memoria descriptiva contiene información de secuencias de nucleótidos preparada mediante el uso del programa PatentIn Version 3.5, presentada en la presente memoria después de la bibliografía. Cada secuencia de nucleótidos se identifica en la lista de secuencias mediante el indicador numérico <210>, seguido del identificador de secuencia (p.ej. <210>1, <210>2, etc.). La longitud, el tipo de secuencia (ADN, etc.) y el organismo de origen para cada secuencia se indican mediante la información proporcionada en los campos de los indicadores numéricos <211>, <212> y <213>, respectivamente. Las secuencias de nucleótidos mencionadas en la memoria descriptiva se identifican mediante el indicador SEQ ID N°: seguido del identificador de la secuencia (p.ej. SEQ ID N°:1, SEQ ID N°:2, etc.). El identificador de secuencia mencionado en la memoria descriptiva se correlaciona con la información proporcionada en el campo del indicador numérico <400> en la lista de secuencias, que va seguido por el identificador de secuencia (p.ej. <400>1, <400>2, etc.). Es decir, SEQ ID N°:1, tal como se detalla en la memoria descriptiva, se correlaciona con la secuencia indicada como <400>1 en la lista de secuencias.

En un aspecto, se proporciona un método de cribado cuantitativo de la metilación de una región de ADN de interés en una muestra biológica, y dicho método comprende:

- (i) poner en contacto ADN de dicha muestra biológica con dos o más endonucleasas de restricción sensibles a la metilación y digerir dicho ADN a 4-6 pg de dicho ADN por unidad de dichas endonucleasas por hora;
- (ii) amplificar cuantitativamente la muestra de ADN digerida de la etapa (i) mediante el uso de uno o más cebadores directos y uno o más cebadores inversos, cuyos cebadores se dirigen a las secuencias de ADN que flanquean una o más regiones de secuencias de reconocimiento de endonucleasas de restricción específicas de metilación; y
- (iii) cuantificar el nivel de dicha región de ADN metilada de interés.

En otro aspecto, se proporciona un método de cribado cuantitativo de la metilación de una región de ADN de interés en una muestra biológica, y dicho método comprende:

- (i) poner en contacto ADN de dicha muestra biológica con dos o más endonucleasas de restricción sensibles a la metilación y digerir dicho ADN a 4-6 pg de dicho ADN por unidad de dichas endonucleasas por hora;
- (ii) amplificar cuantitativamente la muestra de ADN digerida de la etapa (i) mediante el uso de uno o más cebadores directos y uno o más cebadores inversos, cuyos cebadores se dirigen a las secuencias de ADN que flanquean una o más regiones de secuencias de reconocimiento de endonucleasas de restricción específicas de metilación; y
- (iii) cuantificar el nivel de dicha región de ADN metilado de interés, en el que dicha cuantificación no requiere determinar la proporción del ADN amplificado de la etapa (ii) respecto de una muestra sin digerir correspondiente.

En otro aspecto, se proporciona más en particular un método de cribado cuantitativo de la metilación de un gen de interés en una muestra biológica, y dicho método comprende:

- (i) poner en contacto ADN de dicha muestra biológica con dos o más endonucleasas de restricción sensibles a la metilación y digerir dicho ADN a 4-6 pg de dicho ADN por unidad de dichas endonucleasas por hora;
- (ii) amplificar cuantitativamente la muestra de ADN digerida de la etapa (i) mediante el uso de uno o más cebadores directos y uno o más cebadores inversos, cuyos cebadores se dirigen a las secuencias de ADN que flanquean una o más regiones de secuencias de reconocimiento de endonucleasas de restricción específicas de metilación; y
- (iii) cuantificar el nivel de dicha región génica metilada, en el que dicha cuantificación no requiere determinar la proporción del ADN amplificado de la etapa (ii) respecto de una muestra sin digerir correspondiente.

En otro aspecto se proporciona un método de cribado cuantitativo de la metilación en uno o más de los loci génicos de BCAT1, IKZF1, IRF4, GRASP y CAHM en una muestra biológica, y dicho método comprende:

- (i) poner en contacto ADN de dicha muestra biológica con dos o más endonucleasas de restricción sensibles a la metilación y digerir dicho ADN a 4-6 pg de dicho ADN por unidad de dichas endonucleasas por hora;
- (ii) amplificar cuantitativamente la muestra de ADN digerida de la etapa (i) mediante el uso de uno o más cebadores directos y uno o más cebadores inversos, cuyos cebadores se dirigen a las secuencias de ADN que flanquean una o más secuencias de reconocimiento de endonucleasas de restricción específicas de metilación; y
- (iii) cuantificar el nivel de dicho o dichos genes metilados, en el que dicha cuantificación no requiere determinar la proporción del ADN amplificado de la etapa (ii) respecto de una muestra sin digerir correspondiente.

ES 2 720 195 T3

En otro aspecto, se proporciona un método de cribado cuantitativo de la metilación de una región de ADN de interés en una muestra biológica, y dicho método comprende:

- (i) extraer el ADN de dicha muestra biológica y establecer la concentración de ADN total presente en dicha muestra;
- 5 (ii) poner en contacto ADN de dicha muestra biológica con dos o más endonucleasas de restricción sensibles a la metilación y digerir dicho ADN a 4-6 pg de dicho ADN por unidad de dichas endonucleasas por hora;
- (iii) 10 amplificar cuantitativamente la muestra de ADN digerida de la etapa (ii) mediante el uso de uno o más cebadores directos y uno o más cebadores inversos, cuyos cebadores se dirigen a las secuencias de ADN que flanquean una o más secuencias de reconocimiento de endonucleasas de restricción específicas de metilación; y
- (iv) cuantificar el nivel de dicha región de ADN metilado de interés, en el que dicha cuantificación no requiere determinar la proporción del ADN amplificado de la etapa (iii) respecto de una muestra sin digerir correspondiente.

15 En otro aspecto, se proporciona por tanto un método de cribado cuantitativo de la metilación de un gen de interés en una muestra biológica, y dicho método comprende:

- (i) establecer la concentración de ADN total presente en dicha muestra;
- (ii) poner en contacto 1-10 ng de ADN de dicha muestra biológica con dos o más endonucleasas de restricción sensibles a la metilación, en el que una de dichas enzimas es una enzima de Tipo IIe, y digerir dicho ADN a 4-6 pg de dicho ADN por unidad de dichas endonucleasas por hora;
- 20 (iii) amplificar cuantitativamente la muestra de ADN digerida de la etapa (ii) mediante el uso de uno o más cebadores directos y uno o más cebadores inversos, cuyos cebadores se dirigen a las secuencias de ADN que flanquean una o más regiones de secuencias de reconocimiento de endonucleasas de restricción específicas de metilación seleccionadas; y
- (iv) 25 cuantificar el nivel de dicho gen metilado, en el que dicha cuantificación no requiere determinar la proporción del ADN amplificado de la etapa (iii) respecto de una muestra sin digerir correspondiente.

En un aspecto adicional, se proporciona, por tanto, un método de cribado cuantitativo del nivel de metilación de uno o más de BCAT1, IKZF1, IRF4, GRASP y CAHM en una muestra biológica, y dicho método comprende:

- (i) establecer la concentración de ADN total presente en dicha muestra;
- (ii) 30 poner en contacto 1-10 ng de ADN de dicha muestra biológica con HpaII y HhaI y digerir dicho ADN a 4-6 pg de dicho ADN por unidad de dichas endonucleasas por hora;
- (iii) amplificar cuantitativamente la muestra de ADN digerida de la etapa (ii) mediante el uso de uno o más cebadores directos y uno o más cebadores inversos, cuyos cebadores se dirigen a las regiones de ADN que flanquean una o más regiones de secuencias de reconocimiento de HpaII y HhaI seleccionadas; y
- (iv) 35 cuantificar el nivel de dichos BCAT1, IKZF1, IRF4, GRASP y/o CAHM metilados, en el que dicha cuantificación no requiere determinar la proporción del ADN amplificado de la etapa (iii) respecto de una muestra sin digerir correspondiente.

En otro aspecto adicional, se proporciona un método de cribado cuantitativo del nivel de metilación de uno o más de BCAT1, IKZF1, IRF4, GRASP y CAHM en una muestra biológica, y dicho método comprende:

- (i) establecer la concentración de ADN total presente en dicha muestra;
- 40 (ii) poner en contacto 1-10 ng de ADN de dicha muestra biológica con HpaII, HhaI y ExoI y digerir dicho ADN a 4-6 pg de dicho ADN por unidad de dichas endonucleasas por hora;
- (iii) amplificar cuantitativamente la muestra de ADN digerida de la etapa (ii) mediante el uso de uno o más cebadores directos y uno o más cebadores inversos, cuyos cebadores se dirigen a las regiones de ADN que flanquean una o más regiones de secuencias de reconocimiento de HpaII y HhaI seleccionadas; y
- 45 (iv) cuantificar el nivel de dichos BCAT1, IKZF1, IRF4, GRASP y/o CAHM metilados, en el que dicha cuantificación no requiere determinar la proporción del ADN amplificado de la etapa (iv) respecto de una muestra sin digerir correspondiente.

En otro aspecto adicional, el método de la presente invención se dirige al cribado de GRASP metilado mediante el uso de una digestión con HhaI/HpaII, y la etapa de amplificación se lleva a cabo mediante el uso de:

- (i) Cebador directo: 5'-CAAGTTGAAGGTCCGAGAGC (SEQ ID N°: 2); y
- (ii) Cebador inverso: 5'-CGCACTTCCTCAGAGTGAGA (SEQ ID N°: 3).

En otro aspecto adicional, el método de la presente invención se dirige al cribado de BCAT1 metilado mediante el uso de una digestión con HhaI/HpaII, y la etapa de amplificación se lleva a cabo mediante el uso de:

- 5 (i) Cebador directo: 5'-AGATCCCAAGGGTCGTAGC (SEQ ID N°: 4); y
- (ii) Cebador inverso: 5'-ACTGCCCCAGGTCTTGCT (SEQ ID N°: 5).

En otro aspecto adicional, el método de la presente invención se dirige al cribado de IKZF1 metilado mediante el uso de una digestión con HhaI/HpaII, y la etapa de amplificación se lleva a cabo mediante el uso de:

- (i) Cebador directo: 5'-GGAGTTGCGGCTGAGAC (SEQ ID N°: 6); y
- 10 (ii) Cebador inverso: 5'-AGAGCGGGACACGGAGA (SEQ ID N°: 7).

Breve descripción de los dibujos

La Figura 1 es una representación gráfica de los niveles de metilación medidos en el locus génico de *BCAT1* mediante el uso del método. Se aplicó la digestión con enzimas de restricción para ensayar el estado de metilación [DREAMS] a ADN circulante aislado de 4 mL de plasma sanguíneo. La concentración del ADN extraído se determinó mediante PCR cuantitativa en tiempo real, y se digirieron 3,6 ng de ADN durante 72 horas con HhaI y HpaII. La mezcla de digestión se analizó después en PCR cuantitativa con DREAMS de *BCAT1* (1,6 ng por reacción de PCR duplicada). A la ausencia de señal se le asignó artificialmente el valor "60". La figura muestra los valores medios del umbral del ciclo [Ct] medidos en 1,6 ng de ADN digerido aislado de plasma sanguíneo de pacientes confirmados mediante colonoscopia, que incluyeron 50 muestras normales (círculos claros) y 16 cánceres colorrectales (círculos punteados: Estadio 1, n=1; amarillo: Estadio 2, n=4; naranja: Estadio 3, n=4; rojo: Estadio 4, n=4; aspas: estadios de cáncer desconocidos, n=3). POSCONT: control positivo para la detección de la metilación. 4 mL de plasma de donantes sanos a los que se añadieron 5 ng de ADN completamente metilado (Millipore). NEGCONT: control negativo para la detección de la metilación. 4 mL de plasma de donantes sanos. Las muestras se consideraron positivas si se obtuvo una señal Ct. El ensayo DREAMS de *BCAT1* demostró una especificidad del 96% y una sensibilidad del 63%.

La Figura 2 es una representación gráfica de los niveles de metilación medidos en el locus génico de *GRASP* mediante el uso del método descrito en la leyenda de la Figura 1. Se digirió un total de 3,6 ng de ADN plasmático extraído durante 72 horas con HhaI y HpaII. La mezcla de digestión se analizó después en PCR cuantitativa con DREAMS de *GRASP* (1,6 ng por reacción de PCR duplicada). A la ausencia de señal se le asignó artificialmente el valor "55". La figura muestra los valores medios del umbral del ciclo [Ct] medidos en 1,6 ng de ADN nativo digerido aislado de plasma sanguíneo de pacientes confirmados mediante colonoscopia, que incluyeron 50 muestras normales (círculos claros) y 16 cánceres colorrectales (círculos punteados: Estadio 1, n=1; amarillo: Estadio 2, n=4; naranja: Estadio 3, n=4; rojo: Estadio 4, n=4; aspas: estadios de cáncer desconocidos, n=3). Las muestras se consideraron positivas con valores Ct < 38. POSCONT: control positivo para la detección de la metilación. 4 mL de plasma de donantes sanos a los que se añadieron 5 ng de ADN completamente metilado (Millipore). NEGCONT: control negativo para la detección de la metilación. 4 mL de plasma de donantes sanos. El ensayo DREAMS de *GRASP* demostró una especificidad del 99% y una sensibilidad del 69%.

Descripción detallada de la invención

La presente invención se basa, en parte, en la determinación de que se puede realizar de manera eficaz una digestión completa mediante endonucleasas de restricción específicas de metilación, en la que la digestión se lleva a cabo con dos o más endonucleasas de restricción específicas de metilación a 4-6 pg de ADN/unidad de endonucleasas/hr. Además, mediante el diseño de la etapa de amplificación para usar cebadores que flanquean las regiones de las secuencias de reconocimiento de las endonucleasas de restricción, es factible la cuantificación absoluta y se elimina la necesidad de llevar a cabo la cuantificación de una manera relativa frente a una muestra de control interna sin digerir.

Por lo tanto, en un aspecto, se proporciona un método de cribado cuantitativo de la metilación de una región de ADN de interés en una muestra biológica, y dicho método comprende:

- (i) poner en contacto ADN de dicha muestra biológica con dos o más endonucleasas de restricción sensibles a la metilación y digerir dicho ADN a 4-6 pg de dicho ADN por unidad de dichas endonucleasas por hora;
- 50 (ii) amplificar cuantitativamente la muestra de ADN digerida de la etapa (i) mediante el uso de uno o más cebadores directos y uno o más cebadores inversos, cuyos cebadores se dirigen a las secuencias de ADN que flanquean una o más regiones de secuencias de reconocimiento de endonucleasas de restricción específicas de metilación; y

(iii) cuantificar el nivel de dicha región de ADN metilada de interés.

Más en particular, se proporciona un método de cribado cuantitativo de la metilación de una región de ADN de interés en una muestra biológica, y dicho método comprende:

- 5 (i) poner en contacto ADN de dicha muestra biológica con dos o más endonucleasas de restricción sensibles a la metilación y digerir dicho ADN a 4-6 pg de dicho ADN por unidad de dichas endonucleasas por hora;
- (ii) amplificar cuantitativamente la muestra de ADN digerida de la etapa (i) mediante el uso de uno o más cebadores directos y uno o más cebadores inversos, cuyos cebadores se dirigen a las secuencias de ADN que flanquean una o más regiones de secuencias de reconocimiento de endonucleasas de restricción específicas de metilación; y
- 10 (iii) cuantificar el nivel de dicha región de ADN metilado de interés, en el que dicha cuantificación no requiere determinar la proporción del ADN amplificado de la etapa (ii) respecto de una muestra sin digerir correspondiente.

En una realización, la etapa (ii) se lleva a cabo en presencia de una o más sondas TaqMan.

15 La referencia a una "región de ADN de interés" se debería entender como una referencia a cualquier región de ADN, cuyo estado de metilación se desea analizar. Esto puede ser, por ejemplo, un gen, parte de un gen, una región intergénica, un promotor o ADN mitocondrial. Para este fin, la referencia a un "gen" se debería entender como una referencia a una molécula de ADN que codifica un producto proteico, ya sea una proteína de longitud completa o un fragmento de proteína. Se debería entender, sin embargo, que existen algunos genes o regiones de genes, que se han identificado, que se sabe que no producen necesariamente un producto proteico. Se debería entender, por lo tanto, que la referencia a un "gen" en la presente memoria incluye la referencia a ambos tipos de genes. Desde el punto de vista del ADN genómico, se esperará en general que el gen incluya regiones intrónicas y exónicas. La región de ADN de interés también puede ser una porción no codificante de ADN genómico que se sabe que no está asociada a ningún gen específico (tal como las habitualmente denominadas regiones de ADN "basura"). La región objetivo de ADN de interés también puede ser cualquier región de ADN genómico producido mediante recombinación, entre 2 regiones de ADN genómico o 1 región de ADN genómico y una región de ADN exógeno, tal como un virus o una secuencia introducida. No es necesario que el ADN que es el objeto del análisis sea obligatoriamente ADN genómico, aunque en general se entiende que el ADN producido por medio de técnicas recombinantes, tal como el cADN o las copias de ADN de ARNs no codificantes, no está metilado. Sin embargo, se debería entender que la presente invención se amplía al análisis de cualquier fuente de ADN que pueda estar metilada.

20

25

30

35 Sin limitar la presente invención a ninguna teoría o modo de acción, la metilación del ADN es universal en bacterias, vegetales y animales. La metilación del ADN es un tipo de modificación química del ADN que es estable a lo largo de las rondas de división celular, pero no implica cambios en la secuencia de ADN subyacente del organismo. Las modificaciones de la cromatina y del ADN son dos características importantes de la epigenética, y desempeñan un papel en el proceso de diferenciación celular, que permite a las células mantener de manera estable características diferentes a pesar de contener el mismo material genómico. En los organismos eucarióticos, la metilación del ADN se da solamente en el carbono número 5 del anillo de pirimidina de citosina. En los mamíferos, la metilación del ADN se da principalmente en el carbono número 5 de la citosina de un dinucleótido de CpG. Los dinucleótidos de CpG constituyen aproximadamente un 1% del genoma humano.

40 El 70-80% de todos los CpGs está metilado. Los CpGs pueden estar agrupados en agrupamientos denominados "islas de CpG", que están presentes en el extremo 5' de las regiones reguladoras de muchos genes, y con frecuencia están sin metilar. En muchos procesos patológicos, tales como el cáncer, los promotores génicos y/o las islas de CpG adquieren una hipermetilación anormal, que está asociada a un silenciamiento transcripcional heredable. La metilación del ADN puede influir en la transcripción de genes de dos maneras. En primer lugar, la metilación del ADN puede impedir físicamente la unión de proteínas transcripcionales al gen, por lo que bloquea la transcripción. En segundo lugar, el ADN metilado se puede unir a proteínas conocidas como proteínas con dominio de unión a metil-CpG (MBDs). Después las proteínas MBD incorporan proteínas adicionales al locus, tales como histona desacetilasas y otras proteínas de remodelación de la cromatina que pueden modificar las histonas, por lo que se forma una cromatina compacta e inactiva denominada cromatina silenciosa. Esta asociación entre la metilación del ADN y la estructura de la cromatina es muy importante. En particular, la pérdida de la proteína de unión 2 a metil-CpG (MeCP2) se ha implicado en el síndrome de Rett, y la proteína 2 con dominio de unión a metil-CpG (MBD2) media en el silenciamiento transcripcional de genes hipermetilados en el cáncer.

45

50

55 En los seres humanos, el proceso de metilación del ADN se lleva a cabo mediante tres enzimas, las ADN metiltransferasas 1, 3a y 3b (DNMT1, DNMT3a, DNMT3b). Se cree que DNMT3a y DNMT3b son las metiltransferasas *de novo* que establecen los patrones de metilación del ADN al comienzo del desarrollo. DNMT1 es la metiltransferasa de mantenimiento propuesta que es responsable de copiar los patrones de metilación del ADN a las cadenas hijas durante la replicación del ADN. DNMT3L es una proteína que es homóloga a las otras DNMT3s, pero no tiene actividad catalítica. En su lugar, DNMT3L ayuda a las metiltransferasas *de novo* incrementando su

capacidad de unirse al ADN y estimular su actividad. Finalmente, se ha identificado DNMT2 como un homólogo "enigmático" de ADN metiltransferasa, que contiene los 10 motivos de secuencia comunes a todas las ADN metiltransferasas; sin embargo, DNMT2 no puede metilar ADN, pero en su lugar se ha demostrado que metila un ARN pequeño.

- 5 Se debería entender, por lo tanto, que el término "metilación" significa la presencia de un grupo metilo añadido por la acción de una enzima ADN metiltransferasa a una base o bases de citosina en una región de un ácido nucleico, p.ej. ADN genómico.

En una realización, dicha región de ADN de interés es un gen.

10 Según esta realización, se proporciona más en particular un método de cribado cuantitativo de la metilación de un gen de interés en una muestra biológica, y dicho método comprende:

- (i) poner en contacto ADN de dicha muestra biológica con dos o más endonucleasas de restricción sensibles a la metilación y digerir dicho ADN a 4-6 pg de dicho ADN por unidad de dichas endonucleasas por hora;
- (ii) 15 amplificar cuantitativamente la muestra de ADN digerida de la etapa (i) mediante el uso de uno o más cebadores directos y uno o más cebadores inversos, cuyos cebadores se dirigen a las secuencias de ADN que flanquean una o más regiones de secuencias de reconocimiento de endonucleasas de restricción específicas de metilación; y
- (iii) 20 cuantificar el nivel de dicha región génica metilada, en el que dicha cuantificación no requiere determinar la proporción del ADN amplificado de la etapa (ii) respecto de una muestra sin digerir correspondiente.

En otra realización, dicho gen es un gen de mamífero.

- 20 En una realización adicional, dicho gen es un marcador de neoplasia del intestino grueso y, más en particular, BCAT1, IKZF1, CAHM, GRASP o IRF4.

25 Estos genes se especifican en la presente memoria mediante referencia tanto al nombre del gen como a un grupo de coordenadas cromosómicas humanas. Tanto los nombres de los genes como las coordenadas cromosómicas serían muy conocidas, y entendidas, por la persona experta en la técnica. Las coordenadas cromosómicas para las regiones ensayadas en matrices de sondas contiguas de promotores de Nimblegen corresponden a la versión Hg18 del genoma, mientras las que describen el símbolo del gen asociado corresponden a la versión Hg19 del genoma. En general, un gen se puede identificar de manera rutinaria mediante su nombre, por medio del cual se puede obtener de manera rutinaria su secuencia y su localización cromosómica, o mediante sus coordenadas cromosómicas, por medio de lo cual también se puede obtener de manera rutinaria el nombre del gen y su secuencia.

30

La referencia a "genes" se debería entender como una referencia a todas las formas de estas moléculas y a los fragmentos o las variantes de las mismas. Como apreciaría la persona experta en la técnica, se sabe que algunos genes exhiben una variación alélica entre individuos o polimorfismos de nucleótidos simples. Los SNPs abarcan las inserciones y deleciones de tamaño variable y las repeticiones de secuencias simples, tales como repeticiones de dinucleótidos y trinucleótidos. Las variantes incluyen las secuencias de ácido nucleico de la misma región que comparten al menos un 90%, 95%, 98%, 99% de identidad de secuencia, es decir, que tienen una o más deleciones, adiciones, sustituciones, secuencias invertidas, etc., respecto de los genes descritos en la presente memoria. Por lo tanto, se debería entender que la presente invención se amplía a tales variantes que, desde el punto de vista de las presentes aplicaciones de diagnóstico, consiguen el mismo resultado a pesar del hecho de que pueden existir variaciones genéticas menores entre las secuencias de ácidos nucleicos concretas entre individuos. Por lo tanto, se debería entender que la presente invención se amplía a todas las formas de ADN que surgen de cualquier otra mutación, variación polimórfica o alélica.

35

40

Las coordenadas cromosómicas de Hg19 que corresponden a los genes detallados anteriormente son las siguientes:

- (1) BCAT: chr12:24962958..25102393
- 45 (2) IKZF1: chr7:50344378...50472798
- (3) IRF4: chr6:391739..411443;
- (4) GRASP: chr12:52400748..52409671; y
- (5) CAHM: chr6:163834097..163834982.

50 Se debería entender que la referencia a estos genes incluye 5 kb en posición anterior al sitio de inicio de la transcripción de cada uno de estos genes.

Como se discutirá con más detalle a continuación, se puede aplicar el método de la presente invención al cribado de la metilación de un gen, o se puede adaptar para cribar en una muestra biológica concreta la metilación de más de un gen por medio de alícuotas diferentes de ADN de la muestra biológica original, o en el contexto de una única alícuota que se amplifica mediante el uso de un método de amplificación multiplexado (por ejemplo, usando sondas marcadas con fluorescencia, tales como las sondas de hidrólisis TaqMan o balizas moleculares).

Según esta realización se proporciona un método de cribado cuantitativo de la metilación en uno o más de los loci génicos de BCAT1, IKZF1, IRF4, GRASP y CAHM en una muestra biológica, y dicho método comprende:

- (i) poner en contacto ADN de dicha muestra biológica con dos o más endonucleasas de restricción sensibles a la metilación y digerir dicho ADN a 4-6 pg de dicho ADN por unidad de dichas endonucleasas por hora;
- (ii) amplificar cuantitativamente la muestra de ADN digerida de la etapa (i) mediante el uso de uno o más cebadores directos y uno o más cebadores inversos, cuyos cebadores se dirigen a las secuencias de ADN que flanquean una o más secuencias de reconocimiento de endonucleasas de restricción específicas de metilación; y
- (iii) cuantificar el nivel de dicho o dichos genes metilados, en el que dicha cuantificación no requiere determinar la proporción del ADN amplificado de la etapa (ii) respecto de una muestra sin digerir correspondiente.

El ADN que se analiza de acuerdo con el método de la presente invención se aísla de una muestra biológica. Se debería entender que la referencia a una "muestra biológica" es una referencia a cualquier muestra de material biológico derivado de cualquier fuente, tal como una fuente animal, vegetal o bacteriana, que incluye, pero sin limitación, material celular, biofluidos (p.ej. sangre o plasma), heces, muestras de biopsia de tejido, muestras quirúrgicas o un fluido que se ha introducido en el cuerpo de un animal y posteriormente se ha extraído (tal como, por ejemplo, la disolución recuperada de un enema). La muestra biológica que se analiza según el método de la presente invención se puede analizar directamente, o puede requerir alguna forma de tratamiento antes del análisis. Por ejemplo, una biopsia o muestra quirúrgica puede requerir la homogeneización antes del análisis. De manera alternativa, una muestra celular puede requerir la permeabilización antes del análisis. Además, en la medida en que la muestra biológica no está en forma líquida, (si tal forma es necesaria para el análisis), puede requerir la adición de un reactivo, tal como un tampón, para movilizar la muestra.

En la medida en que la región de ADN de interés está presente en una muestra biológica, la muestra biológica se puede analizar directamente, o si no se puede aislar todo o parte del ácido nucleico presente en la muestra biológica antes del análisis. En otro ejemplo, la muestra se puede purificar parcialmente, o enriquecerla de otra manera antes del análisis. Por ejemplo, en la medida en que una muestra biológica comprende una población celular muy diversa, puede ser deseable enriquecerla en una subpoblación de interés particular. Está dentro del alcance de la presente invención tratar la muestra biológica objetivo o las moléculas derivadas de ella antes de los análisis, por ejemplo, inactivar un virus vivo. También se debería entender que la muestra biológica se puede haber recogido recientemente, o se puede haber almacenado (por ejemplo, congelándola) antes de los análisis, o se puede haber tratado de otra manera antes de los análisis (tal como someténdola a cultivo).

La elección de qué tipo de muestra es más adecuado para los análisis de acuerdo con el método descrito en la presente memoria dependerá de la naturaleza de la situación. En la medida en que se está cribando con respecto a la aparición o la predisposición al inicio de una neoplasia del intestino grueso, por ejemplo, dicha muestra es preferiblemente una muestra fecal (heces), enema, extirpación quirúrgica, biopsia de tejido o muestra de sangre (p.ej. sangre completa, suero, capa leucocitaria o plasma)

Más preferiblemente, dicha muestra biológica es una muestra de sangre, muestra de biopsia o muestra de heces.

Como detalló anteriormente en la presente memoria, el método de la presente invención se basa en la determinación de que se puede realizar una lectura cuantitativa de la metilación del ADN, en el que se puede realizar una digestión completa de ADN mediante endonucleasas de restricción sensibles a la metilación, seguido de amplificación mediante el uso de cebadores diseñados para flanquear la secuencia de reconocimiento de las endonucleasas de restricción específicas de metilación. Esta determinación posibilita que la persona experta prescinda del análisis de una muestra interna sin digerir frente a la cual se analizan los resultados del análisis, obtenidos mediante el uso de los métodos de la técnica anterior. Estos métodos de la técnica anterior proporcionan solamente una lectura relativa con respecto a los niveles de metilación. Sin embargo, debido a que el método de la presente invención posibilita que se lleve a cabo la digestión completa, la aplicación de un método de amplificación cuantitativa que se basa en el uso de cebadores de amplificación dirigidos al ADN que flanquea la secuencia de reconocimiento de las endonucleasas de restricción específicas de metilación posibilita la cuantificación absoluta. Se debería entender que la referencia a una digestión "completa", en el contexto del método de la presente invención, es una referencia a un nivel de eficacia de la digestión que da como resultado que no haya una señal detectable de PCR de la amplificación del ADN que no se ha digerido completamente. Por lo tanto, la persona experta apreciaría que pueda haber cierto grado de digestión incompleta, pero esta será tan insignificante que este ADN digerido de manera incompleta no dará como resultado una señal detectable de PCR al usar el método de PCR de la presente invención. En esta situación, se considera por tanto que la digestión del ADN es efectivamente completa. Además, esta mejora

significativa de la eficacia de la etapa de digestión ha posibilitado los análisis de cantidades muy bajas de ADN, tal como hasta 1 ng. Desde el punto de vista de la recogida de suficiente material biológico para los análisis, esto es muy significativo.

5 Para este fin, en una realización, se extrae preferiblemente el ADN de la muestra biológica mediante cualquier método de extracción adecuado, y se establece la concentración de ADN total presente en la muestra. Los métodos para llevarlo a cabo serían muy conocidos para la persona de experiencia en la técnica, e incluyen, por ejemplo, la extracción con fenol/cloroformo, gradientes de cloruro de cesio, CHELEX o columna de sílice, o métodos con microesferas. En virtud de la extracción y el establecimiento de la concentración del ADN presente en la muestra biológica de interés, se facilita la capacidad de llevar a cabo el método de la presente invención con concentraciones
10 iniciales muy bajas de ADN.

Por lo tanto, en una realización, se proporciona un método de cribado cuantitativo de la metilación de una región de ADN de interés en una muestra biológica, y dicho método comprende:

- (i) extraer el ADN de dicha muestra biológica y establecer la concentración de ADN total presente en dicha muestra;
- 15 (ii) poner en contacto ADN de dicha muestra biológica con dos o más endonucleasas de restricción sensibles a la metilación y digerir dicho ADN a 4-6 pg de dicho ADN por unidad de dichas endonucleasas por hora;
- (iii) amplificar cuantitativamente la muestra de ADN digerida de la etapa (ii) mediante el uso de uno o más cebadores directos y uno o más cebadores inversos, cuyos cebadores se dirigen a las secuencias de ADN que flanquean una o más secuencias de reconocimiento de endonucleasas de restricción específicas de
20 metilación; y
- (iv) cuantificar el nivel de dicha región de ADN metilado de interés, en el que dicha cuantificación no requiere determinar la proporción del ADN amplificado de la etapa (iii) respecto de una muestra sin digerir correspondiente.

En una realización, dicha región de ADN de interés es un gen.

25 En otra realización, se someten 1-20 ng del ADN extraído en la etapa (i) a la digestión de la etapa (ii). En otra realización, se usan 1-15 ng o 1-10 ng de ADN. Más en particular, se pueden usar 2 ng, 3 ng, 4 ng, 5 ng, 6 ng, 7 ng, 8 ng o 9 ng de ADN.

Una vez que el ADN de la muestra está preparado para el análisis, se digiere con dos o más endonucleasas de restricción sensibles a la metilación. Se debería entender que la referencia a una "endonucleasa de restricción sensible a la metilación" es una referencia a una endonucleasa de restricción, cuya actividad de escisión del ADN se bloquea o dificulta cuando una base particular de su secuencia de reconocimiento del ADN está metilada. Por lo tanto, el ADN sin metilar se escinde, y por lo tanto es incapaz de ser amplificado mediante cebadores diseñados para amplificar cruzando el sitio de escisión de la endonucleasa. Solamente el ADN metilado seguirá estando intacto, y de ese modo generará un producto de amplificación.

35 Como apreciaría la persona experta, este método, por lo tanto, depende de la selección y el uso de enzimas para las que la secuencia de reconocimiento relevante está presente en la región del ADN de interés. Debido a que las endonucleasas de restricción específicas de metilación son muy conocidas y están bien caracterizadas, la selección de una endonucleasa adecuada para posibilitar el análisis del gen de interés se halla dentro de la experiencia de la persona experta en la técnica. Por ejemplo, en la Tabla 1, más adelante, se detalla una lista ejemplar de
40 endonucleasas de restricción específicas de metilación junto con la secuencia de reconocimiento del ADN relevante para cada enzima.

TABLA 1

Enzima	Secuencia	Enzima	Secuencia
AatII	GACGT/C	HapII	C/CGG
AccII	CG/CG	HgaI	GACGC
Acil	CCGC	HhaI	GCG/C
AclI	AA/CGTT	HinP1I	G/CGC
AfeI	AGC/GCT	HpaII	C/CGG
AgeI	A/CCGGT	Hpy99I	CGWCG/

ES 2 720 195 T3

Enzima	Secuencia
Agel-HF™	A/CCGGT
Agel-HF™RE-Mix®	A/CCGGT
Aor13HI	T/CCGGA
Aor51HI	AGC/GCT
Ascl	GG/CGCGCC
Ascl RE-Mix®	GG/CGCGCC
AsiSI	GCGAT/CGC
AvaI	C/YCGRG
BceAI	ACGGC
BmgBI	CACGTC
BsaAI	YAC/GTR
BsaHI	GR/CGYC
BsiEI	CGRY/CG
BsiWI	C/BTACG
BsmBI	CGTCTC
BspDI	AT/CGAT
BspT104I	TT/CGAA
BsrFI	R/CCGGY
BssHII	G/CGCGC
BstBI	TT/CGAA
BstUI	CG/CG
Cfr10I	R/CCGGY
Clal	AT/CGAT
CpoI	CG/GWCCG
EagI	C/GGCCG
EagI-HF™	C/GGCCG
Eco52I	C/GGCCG
FauI	CCCGC
FseI	GGCCGG/CC
FspI	TGC/GCA
Haell	RGCGC/Y

Enzima	Secuencia
HpyCH4IV	A/CGT
KasI	G/GCGCC
MluI	A/CGCGT
NaeI	GCC/GGC
NarI	GG/CGCC
NgoMIV	G/CCGGC
NotI	GC/GGCCGC
NotI-HF™RE-Mix®	GC/GGCCGC
NotI-HF™	GC/GGCCGC
NruI	TCG/CGA
NsbI	TGC/GCA
Nt.BsmAI	GTCTC
Nt.CviPII	CCD
PaeR7I	C/TCGAG
PmaCI	CAC/GTG
PMII	CAC/GTG
Psp1406I	AA/CGTT
PvuI	CGAT/CG
PvuI-HF™	CGAT/CG
RsrII	CG/GWCCG
SacII	CCGC/GG
SalI	G/TCGAC
SalI-HF™RE-Mix®	G/TCGAC
SalI-HF™	G/TCGAC
SfoI	GGC/GCC
SgrAI	CR/CCGGYG
SmaI	CCC/GGG
SnaBI	TAC/GTA
TspMI	C/CCGGG
ZraI	GAC/GTC

Desde el punto de vista de la selección de la mezcla de enzimas para el uso en cualquier situación concreta, además de seleccionar enzimas para las que las secuencias de reconocimiento están presentes en el gen de interés, es especialmente útil si las secuencias de reconocimiento de dos o más enzimas están localizadas de

manera proximal dentro de una subregión del gen de interés. Esto es útil desde el punto de vista de la amplificación, ya que minimiza la longitud del ADN entre las secuencias de reconocimiento 5' y 3' más externas, y de ese modo se minimiza el tamaño del fragmento de ADN intacto que es necesario que esté presente en la muestra para que funcione el método. Esto posibilita un análisis sensible de un ADN muy fragmentado, tal como el hallado en el ADN acelular circulante. Como se detalló anteriormente en la presente memoria, debido a que las endonucleasas de restricción específicas de metilación son muy conocidas y están bien caracterizadas, en particular en el contexto de sus secuencias de reconocimiento, la selección de una mezcla adecuada de dos o más enzimas para el uso con un gen específico de interés se halla dentro de la experiencia de la persona experta en la técnica.

Para este fin, se debería entender que la referencia a los cebadores de interés que se dirigen a regiones de ADN "que flanquean" la "región de secuencias de reconocimiento de endonucleasas de restricción específicas de metilación" es una referencia al uso de uno o más cebadores directos e inversos que se localizan de manera proximal en 5' y 3', respectivamente, respecto de la subregión del ADN objetivo que comprende las secuencias de reconocimiento. "De manera proximal" significa que no es necesario que los sitios de hibridación de los cebadores estén inmediatamente adyacentes a las secuencias de reconocimiento más externas, sino que están localizados para posibilitar la amplificación de la región de secuencias de reconocimiento sin amplificar innecesariamente grandes segmentos de ADN que se hallan fuera de esta región. A este respecto, los cebadores directos se pueden localizar en una posición anterior al sitio de corte de las endonucleasas relevantes, y los cebadores inversos en una posición posterior al sitio de corte de las endonucleasas relevantes, de forma que amplifican cruzando el sitio de corte, o puede hibridar cruzando el sitio de corte, de forma que hibridarán solamente al ADN que no se ha cortado.

Se debería apreciar que cuando las dos o más enzimas son isoesquizómeros, y por lo tanto cortan en la misma secuencia de reconocimiento, la región de amplificación relevante comprenderá solamente una secuencia de reconocimiento, y los cebadores directos e inversos, por lo tanto, se diseñarán para hibridar a secuencias de ADN que flanquean esta región de secuencias de reconocimiento. Cuando se usan endonucleasas de restricción específicas de metilación que cortan en secuencias de reconocimiento diferentes, se debería entender que la "región de secuencias de reconocimiento de endonucleasas de restricción específicas de metilación" de interés se refiere a la subregión del gen dentro de la cual están agrupadas las secuencias de reconocimiento. A este respecto, en una realización, las dos o más endonucleasas de restricción específicas de metilación se seleccionan de forma que si no son isoesquizómeros, son, sin embargo, específicas hacia secuencias de reconocimiento que están localizadas de manera proximal entre sí para minimizar el tamaño del amplicón que se generaría cuando exista metilación.

Se dice que los cebadores de interés "flanquean" esta región de secuencias de reconocimiento de endonucleasas de restricción específicas de metilación cuando están diseñados para hibridar a secuencias de ADN que están localizadas en 5' y 3' respecto de los extremos externos del agrupamiento de secuencias de reconocimiento de interés, o que hibridan cruzando los sitios de corte de 5' y 3' externos. Aunque se apreciaría que una o más de las endonucleasas de restricción específicas de metilación pueden cortar en una diversidad de posiciones a lo largo del gen completo, la persona experta puede elegir amplificar el gen completo, en cuyo caso la región "seleccionada" de secuencias de reconocimiento de endonucleasas de restricción específicas de metilación es efectivamente el gen completo. De manera alternativa, la persona experta puede elegir una subregión específica dentro de la cual están agrupadas una o más secuencias de reconocimiento, y amplificar solamente esta región menor (y no ninguna otra secuencia de reconocimiento presente en otras partes del gen). En este caso, esta subregión más pequeña es la región "seleccionada" de secuencias de reconocimiento de endonucleasas de restricción específicas de metilación.

Como se detalló anteriormente en la presente memoria, el método de la presente invención se basa en la determinación de que una combinación de dos o más de dichas endonucleasas de restricción específicas de metilación, junto con una digestión a 4-6 pg de dicho ADN por unidad de dichas endonucleasas por hora, consigue una digestión completa del ADN en análisis. Este hallazgo es especialmente significativo cuando se considera que previamente se había enseñado que no todas las endonucleasas de restricción sensibles a la metilación son adecuadas para el uso en este tipo de aplicación. En particular, se entendía que las enzimas de Tipo IIe, tales como HpaII, creaban problemas ya que no podían llevar a cabo una digestión completa. Por lo tanto, se debía esperar un fondo de ADN sin digerir (Levenson y Melnikov, *Expert Rev. Molecule. Diagn.* 11(8): 807-812, 2011). El método de la presente invención, sin embargo, posibilita el uso de cualquier endonucleasa de restricción sensible a la metilación.

En una realización de la presente invención, las dos o más endonucleasas de restricción específicas de metilación incluyen al menos una enzima de Tipo IIe, más en particular HpaII. Según esta realización, se proporciona, por tanto, un método de cribado cuantitativo de la metilación de un gen de interés en una muestra biológica, y dicho método comprende:

- (i) establecer la concentración de ADN total presente en dicha muestra;
- (ii) poner en contacto 1-10 ng de ADN de dicha muestra biológica con dos o más endonucleasas de restricción sensibles a la metilación, en el que una de dichas enzimas es una enzima de Tipo IIe, y digerir dicho ADN a 4-6 pg de dicho ADN por unidad de dichas endonucleasas por hora;
- (iii) amplificar cuantitativamente la muestra de ADN digerida de la etapa (ii) mediante el uso de uno o más cebadores directos y uno o más cebadores inversos, cuyos cebadores se dirigen a las secuencias de ADN

que flanquean una o más regiones de secuencias de reconocimiento de endonucleasas de restricción específicas de metilación seleccionadas; y

- (iv) cuantificar el nivel de dicho gen metilado, en el que dicha cuantificación no requiere determinar la proporción del ADN amplificado de la etapa (iii) respecto de una muestra sin digerir correspondiente.

5 En otra realización, dicha enzima de Tipo II es HpaII.

En otra realización, la etapa de digestión se lleva a cabo mediante el uso de las endonucleasas de restricción específicas de metilación HpaII y HhaI junto con la exonucleasa de ADN monocatenario, ExoI.

En otra realización, la etapa de digestión se lleva a cabo mediante el uso de las endonucleasas de restricción específicas de metilación HpaII, HhaI y ExoI.

10 De acuerdo con estas realizaciones, en una realización adicional dicho gen es BCAT1, IKZF1, IRF4, GRASP o CAHM.

Según esta realización se proporciona, por tanto, un método de cribado cuantitativo del nivel de metilación de uno o más de BCAT1, IKZF1, IRF4, GRASP y CAHM en una muestra biológica, y dicho método comprende:

- (i) establecer la concentración de ADN total presente en dicha muestra;
- 15 (ii) poner en contacto 1-10 ng de ADN de dicha muestra biológica con HpaII y HhaI y digerir dicho ADN a 4-6 pg de dicho ADN por unidad de dichas endonucleasas por hora;
- (iii) amplificar cuantitativamente la muestra de ADN digerida de la etapa (ii) mediante el uso de uno o más cebadores directos y uno o más cebadores inversos, cuyos cebadores se dirigen a las regiones de ADN que flanquean una o más regiones de secuencias de reconocimiento de HpaII y HhaI seleccionadas; y
- 20 (iv) cuantificar el nivel de dichos BCAT1, IKZF1, IRF4, GRASP y/o CAHM metilados, en el que dicha cuantificación no requiere determinar la proporción del ADN amplificado de la etapa (iii) respecto de una muestra sin digerir correspondiente.

En otra realización se proporciona un método de cribado cuantitativo del nivel de metilación de uno o más de BCAT1, IKZF1, IRF4, GRASP y CAHM en una muestra biológica, y dicho método comprende:

- 25 (i) establecer la concentración de ADN total presente en dicha muestra;
- (ii) poner en contacto 1-10 ng de ADN de dicha muestra biológica con HpaII, HhaI y ExoI y digerir dicho ADN a 4-6 pg de dicho ADN por unidad de dichas endonucleasas por hora;
- (iii) amplificar cuantitativamente la muestra de ADN digerida de la etapa (ii) mediante el uso de uno o más cebadores directos y uno o más cebadores inversos, cuyos cebadores se dirigen a las regiones de ADN que flanquean una o más regiones de secuencias de reconocimiento de HpaII y HhaI seleccionadas; y
- 30 (iv) cuantificar el nivel de dichos BCAT1, IKZF1, IRF4, GRASP y/o CAHM metilados, en el que dicha cuantificación no requiere determinar la proporción del ADN amplificado de la etapa (iii) respecto de una muestra sin digerir correspondiente.

35 Se debería entender que la referencia a una "endonucleasa de restricción específica de metilación" es una referencia a todas las formas de esta enzima, lo que incluye cualquier isoforma que surge del corte y empalme alternativo del mRNA de la enzima de interés, o las variantes alélicas o polimórficas.

Es necesario que la digestión del ADN con endonucleasas de restricción específicas de metilación se desarrolle durante un periodo de tiempo que se basa en la proporción de 4-6 pg de dicho ADN por unidad de dichas endonucleasas por hora. Se debería entender que la referencia a la "unidad" de dichas endonucleasas es una referencia a las unidades totales de actividad de la mezcla de endonucleasas que se ha seleccionado para el uso. La unidad de actividad de cada endonucleasa la define el fabricante como la cantidad de enzima necesaria para digerir una cantidad especificada de un sustrato de ADN modelo (p.ej., 1 µg de ADN de fago lambda) en un tiempo especificado (p.ej., 1 hr) a una temperatura especificada (p.ej., 37 °C) en un tampón especificado. Las unidades totales en una mezcla particular se definen como la suma de las unidades de las endonucleasas componentes individuales de la mezcla. Por lo tanto, debido a que se conoce la cantidad inicial de ADN, junto con el número de unidades de endonucleasas que se usarán, se puede calcular el tiempo de digestión adecuado. Por ejemplo, si se digerirán 18 ng de ADN mediante el uso de 56 unidades de una mezcla de endonucleasas, la digestión tendría que desarrollarse durante al menos 72 horas para llevar a cabo una digestión completa dentro del significado de la presente invención. En otro ejemplo, cuando se desea digerir 5 ng de ADN con una mezcla de enzimas de 110 unidades, se usaría un tiempo de digestión de al menos 8 horas.

La digestión de interés se puede llevar a cabo a cualquier temperatura adecuada, tal como a 37 °C. Como entendería la persona experta, diferentes enzimas de restricción pueden funcionar de manera óptima a diferentes temperaturas. La temperatura óptima a la que usar una enzima concreta se conoce bien en la técnica.

5 Se debería entender que, además de digerir el ADN con las endonucleasas de restricción específicas de metilación de interés, también se pueden incluir reactivos adicionales según se consideren útiles. Por ejemplo, también se puede elegir usar reactivos que ayudan adicionalmente a controlar la digestión, tales como moléculas dobles oligonucleotídicas que contienen sitios de reconocimiento, oligonucleótidos auto-complementarios o un estimulador oligonucleotídico tal como 5-TATAGCCGGCTATA (SEQ ID N°: 1). Estos mecanismos de ayuda en el control de la digestión son muy conocidos para los expertos en la técnica. En una realización, cuando se usa HpaII, también se introduce en la digestión un estimulador oligonucleotídico de HpaII. En otro ejemplo, se puede usar también una exonucleasa que digiere ADN monocatenario, tal como 0,15 U de exonucleasa I por hora. Además, se pueden incluir controles internos adecuados, tales como un control que confirma que se ha alcanzado la digestión completa.

15 Como se detalló anteriormente en la presente memoria, uno de los avances importantes de este método es el hecho de que se puede obtener de manera rutinaria y fiable una digestión completa de la muestra de ADN. Los métodos de la técnica anterior, hasta la fecha, han estado limitados por el hecho de que no ha sido factible de manera fiable la digestión completa de una muestra de ADN. Por esta razón, todos los métodos de la técnica anterior han requerido que se divida una muestra de ADN de análisis en dos alícuotas, en las que se digiere una alícuota y la muestra correspondiente no. Ambas muestras se amplifican después, y los resultados de la amplificación se expresan como una proporción de los resultados de la amplificación de la muestra digerida respecto de los resultados de la amplificación de la muestra sin digerir. Por lo tanto, estos resultados han sido de naturaleza relativa. Los métodos de la técnica anterior no posibilitaron una cuantificación absoluta. Se debería entender que esta muestra de control sin digerir de la técnica anterior se denomina en la etapa (iv) del presente método una "muestra sin digerir correspondiente". Esta muestra, por lo tanto, está sin digerir, pero, sin embargo, se amplifica mediante el uso de los mismos cebadores y condiciones de amplificación que se especifican en la etapa (iii) para la muestra digerida. También se debería entender que esta muestra también se denomina en la bibliografía una "muestra de referencia interna sin digerir".

25 Se debería entender que la referencia a "poner en contacto" una muestra con una endonucleasa de restricción específica de metilación es una referencia a facilitar la mezcla de las endonucleasas de restricción específicas de metilación con la muestra de ADN de forma que pueda darse la interacción, y por lo tanto la digestión. Los medios para llevar a cabo este objetivo serían muy conocidos para los expertos en la técnica.

30 La muestra de ADN digerida se amplifica cuantitativamente mediante el uso de cebadores que flanquean la región de las secuencias de reconocimiento de endonucleasas de restricción específicas de metilación. Como se detalló anteriormente en la presente memoria, esta "región" se puede seleccionar para que abarque la totalidad o una parte sustancial de la longitud del gen, en cuyo caso los amplicones que se generen serán bastante largos. De manera alternativa, la región puede corresponder a un tramo mucho más corto del gen, en el que se agrupan una o más secuencias de reconocimiento. En este caso, los amplicones que se generasen serían significativamente más cortos.

35 Se debería apreciar que, al llevar a cabo la etapa de amplificación, esta se puede realizar mediante el uso de cualquiera de varias técnicas adecuadas. Por ejemplo, cuando se usa más de un par de cebadores directos/inversos, dirigidos a seleccionar como objetivo dos o más regiones de secuencias de reconocimiento diferentes, se pueden introducir todos estos cebadores en una única muestra y amplificar la muestra mediante el uso de una técnica de amplificación multiplexada. De manera alternativa, se puede elegir dividir la muestra digerida de la etapa (ii) en más de una alícuota, en la que cada alícuota se amplifica mediante el uso de un par diferente de cebadores. También se debería entender que la persona experta puede elegir adaptar este método para usar múltiples grupos de cebadores, dirigidos a amplificar solamente una región de secuencias de reconocimiento de endonucleasas de restricción específicas de metilación, pero en la que los múltiples cebadores reflejan la aplicación de una reacción de PCR anidada.

40 Se debería entender que la referencia a un "cebador" es una referencia a cualquier molécula que comprende una secuencia de nucleótidos, o los derivados funcionales o análogos de la misma, cuya función incluye tanto la hibridación a una secuencia de ADN que flanquea la región de secuencias de reconocimiento de endonucleasas de restricción específicas de metilación como la amplificación de la secuencia de ADN en 5' de esa región. Se debería entender que el cebador puede comprender componentes distintos de ácido nucleico. Por ejemplo, el cebador también puede comprender una etiqueta distinta de ácido nucleico, tal como una etiqueta fluorescente o enzimática, o algún otro componente distinto de ácido nucleico que facilita el uso de la molécula como una sonda, o que facilita de otra manera su detección. En otro ejemplo, el cebador puede ser un ácido nucleico proteico que comprende un esqueleto peptídico que exhibe cadenas laterales de ácido nucleico. Preferiblemente, dicho cebador es un oligonucleótido de ADN monocatenario.

45 Se debería entender que la referencia a un "cebador directo" es una referencia a un cebador que amplifica el ADN objetivo de la muestra de ADN de interés hibridando con la cadena inversa del ADN objetivo.

Se debería entender que la referencia a un "cebador inverso" es una referencia a un cebador que amplifica el ADN

objetivo de la muestra de ADN de interés y en la PCR hibridando con la cadena directa del ADN objetivo.

El diseño y la síntesis de cebadores adecuados para el uso en la presente invención serían muy conocidos para los expertos en la técnica. En una realización, el cebador de interés tiene una longitud de 4 a 60 nucleótidos, en otra realización tiene una longitud de 10 a 50 nucleótidos, en otra realización tiene una longitud de 15 a 45 nucleótidos, y en otra realización tiene una longitud de 20 a 40 nucleótidos.

Desde el punto de vista del número de cebadores que se usan en el método de la invención, la persona de experiencia en la técnica lo puede determinar. Con respecto al número total de cebadores, las variables que requieren consideración son el tamaño y el número de regiones del ADN que se van a amplificar y la distancia entre las secuencias con las que hibridan los cebadores. Para amplificar fragmentos de PCR que son mayores de alrededor de 1 kb, los cebadores se pueden diseñar para que funcionen en un método de PCR anidada y para que hibriden a intervalos de aproximadamente 500 bases.

Como se detalló anteriormente en la presente memoria, cuando se van a amplificar múltiples regiones de ADN, la persona experta puede diseñar reacciones de amplificación multiplexadas. De manera alternativa, se pueden llevar a cabo varias reacciones de amplificación individuales que usan cada una un único par de cebadores. Estos métodos pasan a ser relevantes cuando se están amplificando dos o más regiones de secuencias de reconocimiento de endonucleasas de restricción específicas de metilación diferentes, o cuando se va a analizar la metilación de más de un gen. En este caso, posteriormente a la digestión de la muestra con las endonucleasas de restricción específicas de metilación, se puede dividir la muestra en dos alícuotas, si se desea analizar dos genes (tales como BCAT1 e IKZF1), y entonces cada alícuota se amplifica mediante el uso del o de los grupos de cebadores directos e inversos dirigidos a las regiones de secuencias de reconocimiento de endonucleasas de restricción específicas de metilación relevantes de ese gen. De manera alternativa, se puede llevar a cabo una reacción multiplexada con una única muestra en la que la reacción se multiplexa desde el punto de vista del uso de cebadores dirigidos a la región de secuencias de reconocimiento de endonucleasas de restricción específicas de metilación seleccionadas de un gen, y el uso de otro grupo de cebadores dirigidos a la región de secuencias de reconocimiento de endonucleasas de restricción específicas de metilación seleccionadas del otro gen. Como conocería la persona experta, se pueden diseñar reacciones multiplexadas para llevarlas a cabo con dos, tres o más grupos de cebadores en el contexto de dos o más regiones de secuencias de reconocimiento de endonucleasas de restricción específicas de metilación y/o dos o más genes. Se debería entender que el diseño adecuado de reacciones de amplificación multiplexadas o anidadas se halla dentro de la experiencia de la persona experta en la técnica.

En una realización, en la medida en que el método de la presente invención se dirige al cribado de GRASP metilado mediante el uso de una digestión con HhaI/HpaII, la etapa de amplificación se lleva a cabo mediante el uso de:

- (i) Cebador directo: 5'-CAAGTTGAAGGTCCGAGAGC (SEQ ID N°: 2); y
- (ii) Cebador inverso: 5'-CGCACTTCCTCAGAGTGAGA (SEQ ID N°: 3).

En otra realización, en la medida en que el método de la presente invención se dirige al cribado de BCAT1 metilado mediante el uso de una digestión con HhaI/HpaII, la etapa de amplificación se lleva a cabo mediante el uso de:

- (i) Cebador directo: 5'-AGATCCCAAGGGTCGTAGC (SEQ ID N°: 4); y
- (ii) Cebador inverso: 5'-ACTGCCCCAGGTCTTGCT (SEQ ID N°: 5).

En otra realización, en la medida en que el método de la presente invención se dirige al cribado de IKZF1 metilado mediante el uso de una digestión con HhaI/HpaII, la etapa de amplificación se lleva a cabo mediante el uso de:

- (i) Cebador directo: 5'-GGAGTTGCGGCTGAGAC (SEQ ID N°: 6); y
- (ii) Cebador inverso: 5'-AGAGCGGGACACGGAGA (SEQ ID N°: 7).

Se debería entender que la referencia a "amplificar cuantitativamente" el ADN digerido es una referencia a llevar a cabo cualquier método adecuado de amplificación cuantitativa del ADN. Esto incluye, por ejemplo, la PCR cuantitativa o la amplificación lineal cuantitativa. En una realización se usan formas cuantitativas en tiempo real de PCR, tales como, por ejemplo, TaqMan (Holland *et al.*, *Proc. Natl. Acad. Sci. USA*, 88:7276-7280, 1991; Lee *et al.*, *Nucleic Acid Res.* 21:3761-3766, 1993), Beacon o Scorpion. Los métodos de amplificación cuantitativa se describen, p.ej., en las pat. de EE.UU. n°s 6.180.349; 6.033.854; y 5.972.602, así como, p.ej., en Gibson *et al.*, *Genome Research* 6:995-1001 (1996); DeGraves, *et al.*, *Biotechniques* 34(1):106-10, 112-5 (2003); Deiman B, *et al.*, *Mol. Biotechnol.* 20(2):163-79 (2002). Estos métodos son muy conocidos para la persona experta en la técnica. Sin limitar esta realización a ninguna teoría o modo de acción, la qPCR se lleva a cabo en presencia de tres oligonucleótidos, un cebador directo e inverso que flanquean la región que se desea amplificar y una sonda que hibrida entre los dos cebadores. También se puede llevar a cabo en presencia de dos oligonucleótidos y un colorante intercalante fluorescente, tal como SYBR Green. En el contexto del método anterior, la sonda está doblemente marcada con un indicador fluorescente en 5' y un apagador en 3' (o viceversa). Cuando la sonda está intacta, el colorante apagador

absorbe la fluorescencia del indicador debido a su proximidad. Tras la hibridación al producto de PCR, la sonda se escinde por la actividad de exonucleasa de 5' a 3', por ejemplo, de la ADN polimerasa Taq. Esta escisión libera el indicador del apagador, y de ese modo se obtiene una señal de fluorescencia incrementada que se puede usar para estimar el nivel de metilación inicial del molde. De manera alternativa, en vez de usar una sonda marcada que requiere la escisión, se usa una sonda, tal como, por ejemplo, una baliza molecular (véase, por ejemplo, Mhlanga y Malmberg, *Methods* 25:463-471, 2001). Las balizas moleculares son moléculas monocatenarias de ácido nucleico con una estructura de tallo y bucle. La estructura del bucle es complementaria a una región entre los cebadores. La estructura del tallo se forma mediante la hibridación de dos "brazos" complementarios entre sí, que están a cada lado de la sonda (bucle). Un resto fluorescente está unido a un brazo y un resto apagador está unido al otro brazo, que inhibe cualquier fluorescencia detectable cuando la baliza molecular no está unida a una secuencia objetivo. Tras la unión de la región del bucle a su ácido nucleico objetivo, los brazos se separan y la fluorescencia es detectable.

Como se detalló anteriormente en la presente memoria, una de las ventajas significativas del presente método es que posibilita la cuantificación absoluta mediante el uso de métodos tales como el valor umbral del ciclo de un instrumento de PCR en tiempo real, en el que la presencia de cualquier señal indica la presencia de ADN metilado. Esto se puede llevar a cabo mediante la comparación con una curva patrón realizada en las mismas condiciones de qPCR, que contiene cantidades conocidas de ADN natural digerido con endonucleasas que no son de restricción, o ADN completamente metilado digerido con endonucleasas de restricción. Por lo tanto, no es necesaria la utilización de controles internos para compensar la digestión incompleta, y la lectura que se obtiene mediante el método de la invención proporciona, por tanto, un valor absoluto en vez de una proporción relativa. Sin embargo, se debería entender que se puede desear comparar la lectura cuantitativa que se obtiene mediante el presente método con un resultado cuantitativo de un individuo normal o de una muestra anterior obtenida del paciente en cuestión. Esto permitiría el seguimiento de los cambios en los niveles de metilación del ADN.

La facilitación de la interacción del cebador con el ADN objetivo se puede llevar a cabo mediante cualquier método adecuado. Los expertos en la técnica conocerán esos métodos. Para este fin, se debería entender que los cebadores se pueden incorporar en el tubo de reacción en cualquier momento adecuado. Aunque la incorporación se da en general antes del comienzo de los ciclos de amplificación iniciales, se puede llevar a cabo la incorporación de uno o más cebadores adicionales tras los ciclos de amplificación iniciales. El modo de incorporación de los cebadores dependerá de cómo la persona experta desee llevar a cabo la reacción de amplificación pero, en general, por sencillez de uso y para evitar la contaminación, normalmente es deseable poder llevar a cabo toda la reacción en un único tubo. Sin embargo, se puede usar cualquier otro método para realizar las etapas de la invención.

Aunque la aplicación preferida de este método es estudiar los niveles de metilación con el fin de diagnosticar el inicio de una enfermedad (tal como el desarrollo de una neoplasia o la predisposición a ella), se puede desear la detección de cambios inversos en los niveles de dicha metilación en ciertas circunstancias, por ejemplo, para monitorizar la eficacia de un tratamiento terapéutico o profiláctico dirigido a modular una afección neoplásica, tal como el desarrollo de un adenoma o un adenocarcinoma. Por ejemplo, cuando los niveles elevados de metilación indican que un individuo ha desarrollado una afección caracterizada por el desarrollo de un adenoma o adenocarcinoma, el cribado en busca de una disminución de los niveles de metilación tras el inicio de un régimen de tratamiento terapéutico se puede utilizar para indicar una eliminación eficaz de las células neoplásicas. En otro ejemplo, se puede usar este método para analizar el tejido de los márgenes de una extirpación de un tumor para determinar si se ha eliminado todo el margen del tumor.

El presente método se puede usar, por lo tanto, en el diagnóstico, el pronóstico, la clasificación, la predicción del riesgo de una enfermedad, la detección de la recidiva de una enfermedad, la selección del tratamiento de varios tipos de neoplasias y la monitorización de neoplasias. Se puede detectar un cáncer en cualquier estadio de progresión, tal como cánceres primarios, metastásicos, y recurrentes. Además, este método tiene aplicaciones en cualquier otro contexto en el que sea necesario el análisis de la metilación del ADN.

Mediante el uso del desarrollo de una neoplasia como ejemplo no limitante, la presente invención proporciona métodos para determinar si un mamífero (p.ej., un ser humano) tiene una neoplasia, si una muestra biológica obtenida de un mamífero contiene células neoplásicas o ADN derivado de células neoplásicas, estimar el riesgo o la probabilidad de que un mamífero desarrolle una neoplasia, monitorizar la eficacia de un tratamiento antineoplásico, o seleccionar el tratamiento antineoplásico adecuado en un mamífero con cáncer. Tales métodos se basan en la determinación de que muchas células neoplásicas tienen un estado de metilación diferente al de las células normales. Por lo tanto, determinando si una célula contiene o no secuencias metiladas de manera diferencial, es posible determinar que una célula es neoplásica.

El método de la invención se puede usar para estudiar individuos que se sabe o se sospecha que tienen una neoplasia, o como análisis clínico rutinario, es decir, en un individuo en el que no se sospecha necesariamente que tenga una neoplasia. Se pueden llevar a cabo ensayos de diagnóstico adicionales para confirmar el estado de la neoplasia en el individuo.

Además, los presentes métodos se pueden usar para estudiar la eficacia de un curso de tratamiento. Por ejemplo, se

puede estudiar la eficacia de un tratamiento antineoplásico monitorizando la metilación del ADN a lo largo del tiempo en un mamífero que tiene cáncer. Por ejemplo, la reducción o ausencia de metilación en cualquiera de las secuencias de diagnóstico relevantes de una muestra biológica obtenida de un mamífero tras un tratamiento, en comparación con un nivel en una muestra obtenida del mamífero antes de, o más pronto en, el tratamiento, indica un tratamiento eficaz.

El método de la presente invención, por lo tanto, es útil como análisis puntual o como monitorización continua de aquellos individuos que se considera que corren el riesgo de desarrollar una enfermedad, o como monitorización de la eficacia de regímenes de tratamiento terapéuticos o profilácticos. En estas situaciones, la localización de la modulación de los niveles de metilación en una o más clases de muestras biológicas es un indicador valioso del estado de un individuo o de la eficacia de un régimen terapéutico o profiláctico que se está usando en ese momento. Por lo tanto, se debería entender que el método de la presente invención se amplía a la monitorización de los incrementos o las disminuciones de los niveles de metilación en un individuo respecto de su nivel normal, o respecto de uno o más niveles de metilación anteriores determinados a partir de una muestra biológica de dicho individuo.

La presente invención se describe además mediante referencia a los ejemplos no limitantes siguientes.

EJEMPLO 1

Digestión con enzimas de restricción para ensayar el estado de la metilación en los loci génicos de BCAT1 y GRASP

El protocolo incluye reactivos y métodos para extraer el ADN circulante libre del plasma sanguíneo y digerir el ADN circulante libre con las enzimas sensibles a la metilación HhaI, HpaII y Exonucleasa I. Después se determina el nivel de metilación de BCAT1 y GRASP.

1. "Aislamiento de ácidos nucleicos circulantes en suero/plasma" de QIAGEN:

- | | | |
|----|-----------------------------------|------------|
| a. | Mini columnas QIAGEN® | 50 |
| b. | Extensores de tubo (20 ml) | 2 X 25 |
| c. | VacConnectors | 50 |
| d. | Tampón ACL | 2 x 85 mL |
| e. | Tampón ACB | 2 x 190 mL |
| f. | Tampón ACW1 | 2 x 20 mL |
| g. | Tampón ACW2 | 2 x 25 mL |
| h. | Etanol para extracción del tampón | 2 x 25 mL |
| i. | Tampón AVE (tapones púrpura) | 4 x 1984 L |
| j. | Proteinasa K de QIAGEN | 4 x 7 mL |
| k. | ARN portador (1 g/L) | 2 x 160 L |

2. Muestras de plasma de control

- | | | |
|----|---|----------|
| a. | POSCONT: añadidos 5 ng de ADN completamente metilado | 2 x 4 mL |
| b. | NEGCONT: plasma mezclado de >8 pacientes sin enfermedad | 2 x 4 mL |

Equipo Necesario

Equipo	Cantidad	Descripción	Notas
QIAcube	2	Nº de cat. de Qiagen 9001293	Cada QIAcube puede procesar 12 muestras a la vez, utilizando el protocolo del fabricante Cleanup_QIAampCirculatingNA_SerumOrPlasma_Standard_V1 con el volumen de elución ajustado a 40 µL
Termociclador	1	Tapa calentada	Por ejemplo, Axygen Maxygene, nº de cat.

ES 2 720 195 T3

		bloque de 96 pocillos	THERM-1000
		Exactitud = $\pm 0,5$ °C	
		Uniformidad = $\pm 0,5$ °C	
		Calentamiento = 3 °C	
		Enfriamiento = 2 °C	
Cabina de Bioseguridad	1	Equipada con filtro HEPA y lámparas de esterilización UV	n/a
Centrífuga	1	Admite tubos de microcentrífuga de 1,5 mL a una velocidad max. de 20.000 g	Por ejemplo, Eppendorf 5804R, nº de cat. 5805 000.017
		Admite placas de 96 pocillos a una velocidad max. de 500 g	Por ejemplo, Labnet MPS 1000 de Sigma Aldrich, nº de cat. Z723533-1EA
Pipeta	1	Pipeta 0,5 L - 10 L	n/a
	1	Pipeta 10 L - 100 L	n/a
	1	Pipeta 20 L - 200 L	n/a
	1	Pipeta 100 L - 1000 L	n/a
	1	Pipeta 500 L - 5000 L	n/a
	1	Pipeta de 8 canales 10 L - 100 L	n/a
	1	Dispensador para pipetas	n/a
QIAvac 24 plus con bomba de vacío + accesorios	1	Qiagen QIAvac 24 plus, Nº de cat. 19413	n/a
	1	Bomba de vacío Qiagen, Nº de cat. 84000 o 84010 o 84020	n/a
Baño de agua	1	Capaz de alcanzar 60 °C con un monitor de temperatura calibrado	Si la unidad no tiene un monitor de temperatura, es adecuado un termómetro calibrado
Agitador vorticial	1	Capaz de alcanzar 3000 rpm	n/a
Máquina de hielo	1	n/a	n/a
Cronómetro de Laboratorio	1	n/a	n/a
Refrigerador	1	Capaz de alcanzar 2° - 8° Celsius	n/a
Congelador	1	Capaz de alcanzar - 70° Celsius	n/a

Extracción de ADN

Se recomienda el procedimiento descrito en la presente memoria para procesar un lote de 24 muestras que incluye

22 muestras (4,0 mL de plasma centrifugado dos veces) más un control negativo y uno positivo ("POSCONT" y "NEGCONT"). El ADN natural resultante es suficiente para el análisis QC (si es necesario) y los ensayos posteriores de digestión de restricción.

Procedimiento de extracción



Las etapas de extracción de ADN son sensibles al tiempo. Para un rendimiento máximo de ADN, el tiempo desde que se descongeló la muestra (etapa 2) hasta el inicio de la incubación de lisis (etapa 7) no debería superar una hora.

- 5 Sistema
4. Ponerse una bata de laboratorio desechable nueva. Desechar la bata de laboratorio al final del día.
 6. Ponerse un par de guantes y asegurarse de que los guantes se prolongan sobre los puños de la bata de laboratorio. Se deberían usar guantes nuevos cuando se sospeche de cualquier contaminación; y después de cada incubación y antes de manipular componentes limpios (p.ej. columnas, tubos Eppendorf, placas de 96 pocillos).
 7. Cuando se trabaja fuera de la cabina de bioseguridad con recipientes abiertos, ponerse una red de pelo.
 8. Precalentar el baño de agua a 60 °C.
 9. Descongelar un tubo de plasma de control positivo, un tubo de plasma de control negativo y 22 muestras a temperatura ambiente durante 30-60 minutos en una cabina de bioseguridad. Asegurarse de que las muestras están separadas adecuadamente en la cabina para permitir una descongelación completa.
 10. Mientras el plasma se está descongelando:
 - a. Colocar un vial de ARN portador (1 g/L) a temperatura ambiente. Una vez descongelado, agitar en vórtex durante 5 segundos y centrifugar en una microcentrífuga de sobremesa durante 5 segundos.
 - b. Añadir 148 L de ARN portador descongelado (1 g/L) al Tampón ACL (85 mL) y mezclar invirtiendo 10 veces.
 - c. Etiquetar 24 x tubos de 50 mL (tapa y lateral) con números únicos correspondientes específicos de cada muestra para la extracción (p.ej. 1-24).
- 25 Digestión enzimática
11. Una vez que se descongelan las muestras, comenzar la extracción para cada muestra transfiriendo el plasma a un tubo de 50 mL pre-etiquetado para la adición del reactivo. Los siguientes componentes (que incluyen la muestra) se deberían añadir por orden a todos los tubos antes de continuar con el siguiente componente. Usar una punta nueva para cada etapa:
 - a. 4 mL de plasma, a todos los tubos, después:
 - b. 400 L de Proteinasa K de QIAGEN, a todos los tubos y agitar, y después finalmente:
 - c. 3,2 mL de Tampón ACL (que contiene ARN portador) a todos los tubos.
 12. Cerrar la tapa del primer tubo de 50 mL e invertir el tubo una vez. Repetir para los 23 tubos restantes.
 13. Mezclar a fondo en un agitador vorticial cada tubo durante exactamente 30 seg. (La agitación vorticial se debe llevar a cabo en grupos de dos tubos).
 14. Incubar el plasma-disoluciones de extracción en el baño de agua a 60 °C durante 30 min.
 15. Preparar el colector QIAvac 24 plus en una cabina de bioseguridad como describe el fabricante.
- Lisis
16. Extraer los tubos de 50 mL del baño de agua.
 17. Centrifugar cada uno de los tubos de 50 mL en una centrífuga durante 10 segundos para asegurar que todo el lisado está en el fondo del tubo.

ES 2 720 195 T3

18. Colocar los tubos en una cabina de bioseguridad y añadir 7,2 mL de Tampón ACB a cada tubo mediante el uso de una punta nueva para cada muestra.

5 19. Cerrar la tapa del primer tubo e invertir una vez. Repetir para los 23 tubos restantes. Mezclar a fondo mediante agitación vorticial pulsátil durante 20 segundos cada vez. Incubar la mezcla lisado-Tampón ACB sobre hielo durante 5 minutos. (El procedimiento se debe llevar a cabo en grupos de dos tubos a la vez).

Purificación en columna

20. Decantar con cuidado la mezcla lisado-Tampón ACB en el extensor de tubo de la mini columna QIAamp numerada correspondiente.

21. Encender la bomba de vacío (la presión de la bomba debe alcanzar 1000 mbares).

10 22. Durante la filtración de la muestra preparar dos QIAcubes para la extracción de ADN como describe el fabricante.

Extracción con QIAcube

23. Una vez que las muestras se han extraído completamente a través de las columnas, apagar la bomba de vacío y liberar la presión a 0 mbar. Extraer con cuidado y desechar el extensor de tubo.

15 24. Colocar las mini columnas de centrifugación en los adaptadores del rotor preparados previamente. Distribuir las 24 muestras igualmente en cada uno de los dos QIAcubes (12 muestras cada uno).

25. Abrir las tapas de las botellas de reactivo de los QIAcubes y asegurarse de que todos los componentes están en la posición correcta.

20 26. Hacer funcionar el QIAcube como especifica el fabricante. Asegurarse de que el QIAcube completa la comprobación previa.

27. Limpiar el colector QIAvac como describe el fabricante

Segunda elución manual para obtener un rendimiento incrementado

28. Tras la finalización del procedimiento, retirar los adaptadores del rotor del QIAcube y colocarlos en una gradilla del QIAcube. Transferir el conjunto tubo de elución-columna a una gradilla adecuada.

25 29. Para cada muestra, re-aplicar el eluido (~37 L) en el centro de la membrana.

30. Cerrar la tapa de la columna e incubar a temperatura ambiente durante 3 minutos.

31. Centrifugar los tubos de muestra a 20.000 g durante 1 min a temperatura ambiente para eluir el ADN natural.

30 32. Desechar las columnas y transferir 36 L de cada muestra de ADN natural a una placa de PCR de 96 pocillos.

Digestión Sensible a la Metilación

Método de Digestión

Determinación de la concentración de ADN

35. Añadir 10 L de agua sin nucleasas a 24 pocillos de una placa de PCR de 96 pocillos.

35 36. Transferir 2,5 L de cada una de las 24 muestras de ADN extraído a un pocillo que contiene 10 µL agua sin nucleasas.

37. Colocar tapas en tiras sobre cada uno de los pocillos

40 38. Analizar 2x5 µL de la dilución 1/5 preparada en la etapa 36 en el ensayo de CFF1 descrito más adelante. Incluir una curva patrón de diluciones en serie a 1/4 de ADN completamente metilado (Millipore) para permitir cuantificar la concentración del ADN natural extraído.

Ensayo de CFF1:

Cebador directo de CFF1: TAA GAG TAA TAA TGG ATG GAT GAT G (SEQ ID N°: 8)

Cebador inverso de CFF1: CCT CCC ATC TCC CTT CC (SEQ ID N°: 9)

ES 2 720 195 T3

Sonda de CFF1 [HEX] ATG GAT GAA GAA AGA AAG GAT GAG T [BHQ1] (SEQ ID N°: 10)

Reacción de 15 µl que contiene una concentración final de 630 nM de Cebadores, 200 nM de Sonda y 3 mM de MgCl₂ en 1X tampón Platinum Taq.

5 Condiciones de los ciclos de PCR: 1x Ciclo a 95 °C durante 2 min, seguido de 50x ciclos a 95 °C durante 10 seg, 60 °C durante 50 seg.

39. Usar los datos de CFF1 para calcular la concentración por µl del ADN plasmático original.

40. Diluir cada una de las 22 muestras clínicas de ADN, POSCONT y NEGCONT a 0,36 ng/µL (25 µL de cada muestra requerida).

Digestión enzimática del ADN extraído

10 41. Para cada locus génico (es decir, GRASP o BCAT1): Preparar una mezcla maestra de digestión mediante el uso de los siguientes volúmenes (suficiente para 22 muestras, POSCONT, NEGCONT, 7 patrones y un control de blanco):

Mezcla maestra de digestión	Número de reacciones	72
Componente	Volumen (µL)	Volumen total (µL)
Hpall	2,66	191,52
Hhal	1,33	95,76
Exol	0,5	36
Tampón NEB 4	4,5	324
10x BSA	4,5	324
Estimulador oligonucleotídico de Hpall (1048/5 µM) 5'-TATAGCCGGCTATA	1	72
H ₂ O	20,5	1476
ADN inicial	10	

No agitar en vórtex las enzimas: Mezclar todos los reactivos a fondo antes del uso.

15 42. Pipetear 35 µl de la mezcla maestra de digestión preparada en la etapa 41 en 32 pocillos de una placa de PCR de 96 pocillos tal como se indica a continuación:

Placa de Digestión	1	2	3	4	5	6	7	8	9	10	11	12
A	1		9		17		2500 pg de CpG					
B	2		10		18		1250 pg de CpG					
C	3		11		19		625 pg de CpG					
D	4		12		20		312,5 pg					
E	5		13		21		156,25 pg					
F	6		14		22		78,125 pg					
G	7		15		BioRec +ve		39,06 pg					
H	8		16		BioRec -ve		Agua					

43. Añadir 10 µl de las muestras de ADN diluidas preparadas en la Etapa 40 a los pocillos adecuados y preparar un patrón de ADN de CpG comenzando a 2500 pg y añadirlo a la columna 7 como se indicó anteriormente (añadir 10 µl de agua para el blanco).

20 44. Sellar la placa mediante el uso de película de sellado de BioRad y centrifugar brevemente.

ES 2 720 195 T3

45. Mezclar la placa en un aparato MixMate durante 5 minutos a 1200 RPM, centrifugar brevemente y mezclar de nuevo en el aparato MixMate durante otros 5 minutos a 1200 RPM.

46. Centrifugar brevemente y transferir la placa a un termociclador Axygen. Incubar a 37 °C durante 72 hrs con la tapa calentada a 60 °C (ajustar el volumen a 45 µl).

5 Detección del ADN metilado

Ajustes de PCR e interpretación de los datos

47. 1 hora antes de la finalización prevista de la digestión se prepara una mezcla maestra de PCR como sigue (suficiente para 70 pocillos):

BCAT1:

ENSAYO	BCAT1 HpaII_HhaI					ID PCR
Volumen Total de PCR	80 µl			nº de pocillos		
Molde inicial	20 µL			70		

Componente	Conc. de reserva	Proveedor	Número de lote	Conc. final	µL por pocillo	Mezcla maestra de PCR - µL necesarios
Tampón 10x-MgCl ₂	10X	Invitrogen		1X	8,000	560
MgCl ₂	50 mM	Invitrogen		3 mM	4,800	336
Mezcla de dNTPs	10 mM	Promega		200 µM	1,600	112
Dir. nº 1073	50 µM	SIGMA		328 nM	0,526	36,82
Inv. nº 1074	50 µM	SIGMA		265 nM	0,427	29,89
Sonda nº 1077	10 µM	SIGMA		100 nm	0,800	56
						0
ADN polimerasa Platinum Taq	5 U/µL	Invitrogen		0,033 U/µL	1,000	70
Digestión de restricción					20,000	—
Agua sin nucleasas	NA	Promega		NA	42,520	2976,4

Condiciones de PCR:

1 ciclo	95	°C	2	min
---------	----	----	---	-----

55 ciclos	95	°C	30	seg
	60	°C	30	seg
con adquisición	72	°C	45	seg

ES 2 720 195 T3

1 ciclo 40 °C °C 10 seg seg

GRASP

ENSAYO	GRASP HpaII_HhaI				ID PCR
Volumen Total de PCR	80 µl			nº de pocillos	
Molde inicial	20 µL			34	

Componente	Conc. de reserva	Proveedor	Número de lote	Conc. final	µL por pocillo	Mezcla maestra de PCR - µL necesarios
Tampón 10x-MgCl ₂	10X	Invitrogen		1X	8,000	272
MgCl ₂	50 mM	Invitrogen		3 mM	4,800	183,2
Mezcla de dNTPs	10 mM	Promega		200 µM	1,600	54,4
Dir. nº 1067	50 µM	SIGMA		280 nM	0,450	15,3
Inv. nº 1068	50 µM	SIGMA		364 nM	0,580	19,72
Sonda nº 1078	10 µM	SIGMA		100 nm	0,800	27,2
						0
ADN polimerasa Platinum Taq	5 U/µL	Invitrogen		0,033 U/µL	1,000	34
Digestión de restricción					20,000	—
Agua sin nucleasas	NA	Promega		NA	42,520	1446,68

Condiciones de PCR:

1 ciclo 95 °C 2 min

55 ciclos	95	°C	15	seg
	60	°C	30	seg
con adquisición	72	°C	45	seg

1 ciclo 40 °C °C 10 seg seg

- 5
48. Transferir la mezcla maestra de PCR a una tira de 8 pocillos y pipetear 60 µl de mezcla maestra en las columnas 1-8 de una placa LC480 de 96 pocillos.
 49. Una vez que la digestión se ha desarrollado durante 72 hrs, ajustar la tapa calentada del termociclador AXYGEN a 110 °C y someter a la placa durante 10 minutos a 98 °C para inactivar HpaII/HhaI y ExoI.
 50. Extraer la placa del aparato y centrifugar brevemente para llevar todo el líquido al fondo del pocillo.

51. Retirar con cuidado la película de sellado y, mediante el uso de una pipeta multicanal de 100 µl, transferir 20 µl (por duplicado) desde la reacción de digestión al pocillo adecuado de la placa de qPCR (véase a continuación)

Placa de qPCR	1	2	3	4	5	6	7	8
A	1	1	9	9	17	17	2500 pg de CpG	2500 pg de CpG
B	2	2	10	10	18	18	1250 pg de CpG	1250 pg de CpG
C	3	3	11	11	19	19	625 pg de CpG	625 pg de CpG
D	4	4	12	12	20	20	312,5 pg	312,5 pg
E	5	5	13	13	21	21	156,25 pg	156,25 pg
F	6	6	14	14	22	22	78,125 pg	78,125 pg
G	7	7	15	15	BioRec +ve	BioRec +ve	39,06 pg	39,06 pg
H	8	8	16	16	BioRec -ve	BioRec -ve	Blanco con agua	Blanco con agua

- 5 52. Sellar la placa LC480 con película de sellado, centrifugar brevemente y mezclar en un aparato MixMate durante 30 segs a 1100 RPM. Centrifugar de nuevo para recoger el líquido del fondo de los pocillos.
53. Transferir la placa LC480 a un termociclador y hacerlo funcionar mediante el uso de los siguientes ajustes: 95 °C durante 2 mins, seguido de 55x ciclos a 95 °C durante 15 segs, 60 °C durante 30 segs y 72 °C durante 45 segs (Adquisición en el canal FAM).
- 10 54. Exportar los valores de Ct y las concentraciones para cada pocillo para el análisis.

Tabla 1: Cebadores/Sondas

ID del oligonucleótido	Gen	Nombre del oligonucleótido	Secuencia (5'-3')
1007	GRASP	GRASPHalHpaIIAMP2 DIR	CAAGTTGAAGGTCCGAGAGC (SEQ ID N°: 2)
1008	GRASP	GRASPHalHpaIIAMP2 INV	CGCACTTCCTCAGAGTGAGA (SEQ ID N°: 3)
1078	GRASP	GRASPHalHpaIIAMP2 SONDA	(FAM)CCGGTGGGAGAAGCGGGC C(TAMRA) (SEQ ID N°: 11)
1073	BCAT1	BCAT1 ResEnzym DIR	AGATCCCAAGGGTCGTAGC (SEQ ID N°: 4)
1074	BCAT1	BCAT1 ResEnzym INV	ACTGCCCCAGGTCTTGCT (SEQ ID N°: 5)
1077	BCAT1	BCAT1 ResEnzym SONDA	(FAM)TGCAGAGCGCGGTCCCGG (TAMRA) (SEQ ID N°: 12)

EJEMPLO 2

Ensayo DREAMS de IKZF1

- 15 El ADN se extrajo y se cuantificó para permitir la generación de 25 µL de ADN natural a 0,36 ng/µL como se describió en el Ejemplo 1. Se digirió un total de 10 µL (3,6 ng de ADN) en un volumen de digestión total de 45 µL como se describió en el Ejemplo 1. Se analizó el estado de la metilación en el locus génico de IKZF1 en una reacción de PCR de 80 µL con una cantidad inicial de 20 µL de ADN digerido como se describe a continuación:

ID del oligonucleótido	Gen	Nombre del oligonucleótido	Secuencia 5'-3'
1082	IKZF1	IKZF1 Dreams1 Dir	GGAGTTGCGGCTGAGAC (SEQ ID N°: 6)
1083	IKZF1	IKZF1 Dreams1 Inv	AGAGCGGGACACGGAGA (SEQ ID N°: 7)

ES 2 720 195 T3

1119	IKZF1	IKZF1 Dreams1 Sonda	(HEX)TTCTGCGCGCCCCGCTCC(BHQ1) (SEQ ID N°: 13)
------	-------	---------------------	---

Ensayo:

Mezcla maestra Liberty Taq 1x (Life Technologies), 3 mM de MgCl₂ (final), 200 nM de cebador directo, 200 nM de cebador inverso, 100 nM de sonda.

5 Ciclos de PCR:

1 ciclo	95 °C	2 min
50 ciclos	95 °C	10 seg
con adquisición (HEX)	63 °C	40 seg
1 ciclo	40 °C	10 seg

EJEMPLO 3

Ensayo doble DREAMS de IKZF1/BCAT1

10 El ADN se extrajo y se cuantificó para permitir la generación de 25 µL de ADN natural a 0,36 ng/µL como se describió en el Ejemplo 1. Se digirió un total de 10 µL (3,6 ng de ADN) en un volumen de digestión total de 45 µL como se describió en el Ejemplo 1. Se analizó simultáneamente el estado de la metilación en los loci génicos, BCAT1 e IKZF1, en una reacción de PCR de 80 µL con una cantidad inicial de 20 µL de ADN digerido como se describe a continuación:

ID del oligonucleótido	Gen	Nombre del oligonucleótido	Secuencia 5'-3'
1082	IKZF1	IKZF1 Dreams1 Dir	GGAGTTGCGGCTGAGAC (SEQ ID N°: 6)
1083	IKZF1	IKZF1 Dreams1 Inv	AGAGCGGGACACGGAGA (SEQ ID N°: 7)
1119	IKZF1	IKZF1 Dreams1 Sonda	(HEX)TTCTGCGCGCCCCGCTCC(BHQ1) (SEQ ID N°: 13)
1073	BCAT1	BCAT1 ResEnzym Dir	AGATCCCAAGGGTCGTAGC (SEQ ID N°: 4)
1074	BCAT1	BCAT1 ResEnzym Inv	ACTGCCCCAGGTCTTGCT (SEQ ID N°: 5)
1077	BCAT	BCAT1 ResEnzym Sonda	(FAM)TGCAGAGCGCGGTCCCGG(TAMRA) (SEQ ID N°: 12)

Ensayo:

15 Mezcla maestra Liberty Taq 1x (Life Technologies), 3 mM de MgCl₂ (final), 200 nM de cebador directo, 200 nM de cebador inverso, 100 nM de sonda.

Ciclos de PCR:

1 ciclo	95 °C	2 min
50 ciclos	95 °C	10 seg
con adquisición (FAM/HEX)	63 °C	40 seg
1 ciclo	40 °C	10 seg

Bibliografía

- DeGraves, *et al.*, *Biotechniques* 34(1):106-10, 112-5 (2003)
- Deiman B, *et al.*, *Mol. Biotechnol.* 20(2):163-79 (2002)
- 5 Frommer *et al.*, *Proc. Natl. Acad. Sci. USA*, 89:1827-1831, 1992
- Gibson *et al.*, *Genome Research* 6:995-1001 (1996)
- Herman *et al.*, *Proc. Natl. Acad. Sci. USA*, 93:9821-9826, 1992
- Holland *et al.*, *Proc. Natl. Acad. Sci. USA*, 88:7276-7280, 1991
- Lee *et al.*, *Nucleic Acid Res.* 21:3761-3766, 1993
- 10 Levenson y Melnikov, *Expert Rev. Molecule. Diagn.* 11(8):807-812, 2011
- Markowitz y Bertagnolli (2009). *N. Engl. J. Med.* 361(25):2449-60
- Sadri y Hornsby, *Nucl. Acids Res.* 24:5058-5059, 1996
- Weitzel JN (1999). *Cancer* 86 (11 Supl): 2483-92
- Xiong y Laird, *Nucl. Acids Res.* 25:2532-2534, 1997
- 15 Documento US2012/0264618 A1 (18 de oct., 2012)

LISTA DE SECUENCIAS

<110> CLINICAL GENOMICS PTY. LTD.
 MCEVOY, Aidan (solo en EE.UU.)
 5 PEDERSEN, Susanne (solo en EE.UU.)
 BAKER, Rohan (solo en EE.UU.)

<120> UN MÉTODO DE DETECCIÓN DE METILACIÓN

10 <130> 35113893/TDO

<160> 13
 <170> PatentIn versión 3.5

15 <210> 1
 <211> 14
 <212> ADN
 <213> Artificial

20 <220>
 <223> Estimulador oligonucleotídico

<400> 1
 tatagccggc tata
 25 14

<210> 2
 <211> 20
 <212> ADN
 30 <213> Artificial

<220>
 <223> Cebador

35 <400> 2
 caagttgaag gtccgagagc
 20

<210> 3
 40 <211> 20
 <212> ADN
 <213> Artificial

<220>
 45 <223> Cebador

<400> 3
 cgcaacttct cagagtgaga
 50 20

<210> 4
 <211> 19
 <212> ADN
 <213> Artificial

55 <220>
 <223> Cebador

<400> 4
 60 agatcccaag ggtcgtagc
 19

<210> 5
 <211> 18
 65 <212> ADN

<213> Artificial
 <220>
 <223> Cebador
 5 <400> 5
 actgccccag gtcttgct
 18
 10 <210> 6
 <211> 17
 <212> ADN
 <213> Artificial
 15 <220>
 <223> Cebador
 <400> 6
 20 ggagttgcgg ctgagac
 17
 <210> 7
 <211> 17
 <212> ADN
 25 <213> Artificial
 <220>
 <223> Cebador
 30 <400> 7
 agagcgggac acggaga
 17
 <210> 8
 35 <211> 25
 <212> ADN
 <213> Artificial
 <220>
 40 <223> Cebador
 <400> 8 taagagtaat aatggatgga tgatg
 25
 45 <210> 9
 <211> 17
 <212> ADN
 <213> Artificial
 50 <220>
 <223> Cebador
 <400> 9
 55 cctcccatct ccctcc
 17
 <210> 10
 <211> 25
 <212> ADN
 60 <213> Artificial
 <220>
 <223> Sonda
 65 <400> 10

ES 2 720 195 T3

atggatgaag aaagaaagga tgagt
25

5 <210> 11
<211> 19
<212> ADN
<213> Artificial

10 <220>
<223> Sonda

<400> 11
ccggtgggag aagcgggcc
19

15 <210> 12
<211> 18
<212> ADN
<213> Artificial

20 <220>
<223> Sonda

<400> 12
25 tgcagagcgc ggtcccgg
18

30 <210> 13
<211> 18
<212> ADN
<213> Artificial

35 <220>
<223> Sonda

<400> 13
ttctgcgcgc cccgctcc
18

40

REIVINDICACIONES

1. Un método de cribado cuantitativo de la metilación de una región del ADN de interés en una muestra biológica, y dicho método comprende:
 - 5 (i) poner en contacto ADN de dicha muestra biológica con dos o más endonucleasas de restricción sensibles a la metilación y digerir dicho ADN a 4-6 pg de dicho ADN por unidad de dichas endonucleasas por hora;
 - (ii) amplificar cuantitativamente la muestra de ADN digerida de la etapa (i) mediante el uso de uno o más cebadores directos y uno o más cebadores inversos, cuyos cebadores se dirigen a las secuencias de ADN que flanquean una o más de las regiones de las secuencias de reconocimiento de endonucleasas de restricción específicas de metilación de las endonucleasas de la etapa (i); y
 - 10 (iii) cuantificar el nivel de dicha región de ADN metilado de interés, en el que dicha cuantificación no requiere determinar la proporción del ADN amplificado de la etapa (ii) respecto de una muestra sin digerir correspondiente.
2. El método según la reivindicación 1, en el que la etapa (ii) se lleva a cabo en presencia de una o más sondas, tales como sondas TaqMan.
- 15 3. El método según cualquiera de las reivindicaciones 1 a 2, en el que dicho ADN es un gen, tal como un gen de mamífero.
4. El método según la reivindicación 3, en el que dicho gen de mamífero es un marcador de neoplasia del intestino grueso.
- 20 5. El método según la reivindicación 4, en el que dicho gen es uno o más de los loci génicos de BCAT1, IKZF1, IRF4, GRASP y CAHM.
6. El método según cualquiera de las reivindicaciones 1 a 5, en el que dicho método comprende:
 - (i) extraer el ADN de dicha muestra biológica y establecer la concentración de ADN total presente en dicha muestra;
 - (ii) 25 poner en contacto ADN de dicha muestra biológica con dos o más endonucleasas de restricción sensibles a la metilación y digerir dicho ADN a 4-6 pg de dicho ADN por unidad de dichas endonucleasas por hora;
 - (iii) amplificar cuantitativamente la muestra de ADN digerida de la etapa (ii) mediante el uso de uno o más cebadores directos y uno o más cebadores inversos, cuyos cebadores se dirigen a las secuencias de ADN que flanquean una o más de las secuencias de reconocimiento de endonucleasas de restricción específicas de metilación de las endonucleasas de la etapa (ii); y
 - 30 (iv) cuantificar el nivel de dicha región de ADN metilado de interés, en el que dicha cuantificación no requiere determinar la proporción del ADN amplificado de la etapa (iii) respecto de una muestra sin digerir correspondiente.
7. El método según la reivindicación 6, en el que se someten 1-20 ng del ADN extraído en la etapa (i) a la etapa de digestión de (ii).
- 35 8. El método según la reivindicación 7, en el que se usan 1-15 ng o 1-10 ng de ADN.
9. El método según la reivindicación 8, en el que se usan 2 ng, 3 ng, 4 ng, 5 ng, 6 ng, 7 ng, 8 ng o 9 ng de ADN.
10. El método según cualquiera de las reivindicaciones 1 a 9, en el que dichas dos o más endonucleasas de restricción específicas de metilación incluyen al menos una enzima de Tipo IIe, tal como HpaII
- 40 11. El método según la reivindicación 10, en el que la etapa de digestión se lleva a cabo mediante el uso de la endonucleasas de restricción específicas de metilación HpaII, HhaI y la exonucleasa ExoI.
12. El método según la reivindicación 10, en el que dicho método se dirige al cribado de:
 - (a) GRASP metilado mediante el uso de digestión con HhaI/HpaII, y la etapa de amplificación se lleva a cabo mediante el uso de:
 - 45 (i) Cebador directo: 5'-CAAGTTGAAGGTCCGAGAGC (SEQ ID N°: 2); y
 - (ii) Cebador inverso: 5'-CGCACTTCCTCAGAGTGAGA (SEQ ID N°: 3); o

- (b) BCAT1 metilado mediante el uso de digestión con HhaI/HpaII, y la etapa de amplificación se lleva a cabo mediante el uso de:
- (i) Cebador directo: 5'-AGATCCCAAGGGTCGTAGC (SEQ ID N°: 4); y
 - (ii) Cebador inverso: 5'-ACTGCCCCAGGTCTTGCT (SEQ ID N°: 5); o
- 5 (c) IKZF1 metilado mediante el uso de digestión con HhaI/HpaII, y la etapa de amplificación se lleva a cabo mediante el uso de:
- (i) Cebador directo: 5'-GGAGTTGCGGCTGAGAC (SEQ ID N°: 6); y
 - (ii) Cebador inverso: 5'-AGAGCGGGACACGGAGA (SEQ ID N°: 7).
- 10 13. El método según cualquiera de las reivindicaciones 1 a 12, en el que dicha muestra biológica es una muestra de sangre, muestra de biopsia o muestra de heces.

Figura 1

Normales: 2 de 50 (96% de especificidad)
 Cánceres: 10/16 (63% de sensibilidad)

DREAMS de BCAT1

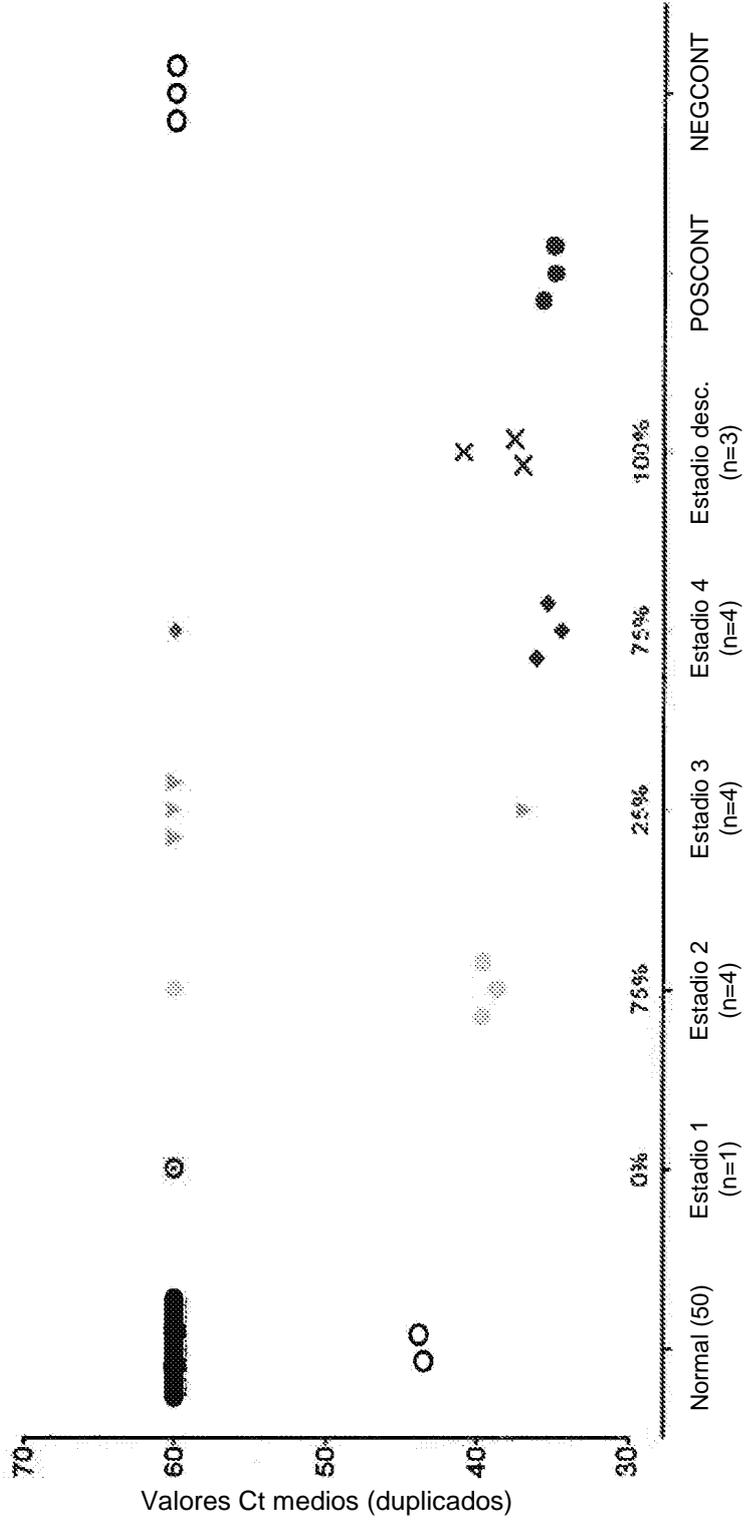


Figura 2

