

19



OFICINA ESPAÑOLA DE  
PATENTES Y MARCAS

ESPAÑA



11 Número de publicación: **2 974 838**

51 Int. Cl.:

**C12Q 1/6883** (2008.01)

**C12Q 1/6881** (2008.01)

**C12Q 1/6886** (2008.01)

12

TRADUCCIÓN DE PATENTE EUROPEA

T3

96 Fecha de presentación y número de la solicitud europea: **14.04.2015 E 22158931 (0)**

97 Fecha y número de publicación de la concesión europea: **15.11.2023 EP 4026917**

54 Título: **Un método y kit para determinar la muerte de células o tejidos o el origen del tejido o célula del ADN mediante análisis de metilación del ADN**

30 Prioridad:

**14.04.2014 US 201461979233 P**

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

**01.07.2024**

73 Titular/es:

**YISSUM RESEARCH AND DEVELOPMENT  
COMPANY OF THE HEBREW UNIVERSITY OF  
JERUSALEM LTD. (50.0%)  
Hi-Tech Park, The Edmond J. Safra Campus The  
Hebrew University of Jerusalem Givat Ram P.O.  
Box 39135  
9139002 Jerusalem, IL y  
HADASIT MEDICAL RESEARCH SERVICES AND  
DEVELOPMENT LTD. (50.0%)**

72 Inventor/es:

**DOR, YUVAL;  
SHEMER, RUTH y  
GLASER, BENJAMIN**

74 Agente/Representante:

**SÁEZ MAESO, Ana**

Observaciones:

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

**ES 2 974 838 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 y kit para determinar la muerte de células o tejidos o el origen del tejido o célula del ADN mediante análisis de metilación del ADN

5

**Campo y antecedentes de la invención**

La presente invención, en algunas realizaciones de la misma, se refiere a un método para determinar la fuente de ADN libre de células y el uso del mismo para diagnosticar procesos patológicos asociados con la muerte celular, monitorizar regímenes terapéuticos, tales como fármacos destinados a alterar la muerte celular, y estudiar con fines clínicos y de investigación procesos que influyen en los niveles de muerte celular.

10

Se conoce por décadas que el plasma contiene pequeños fragmentos de ADN circulante libre de células (ADNlc) derivados de células muertas (en promedio 5000 equivalentes de genoma por ml). Si bien los mecanismos que subyacen a la liberación y el aclaramiento del ADNlc siguen sin estar claros, el fenómeno se aprovecha rápidamente para una variedad de aplicaciones con relevancia clínica. El reconocimiento de que los fragmentos de ADN fetal se desplazan brevemente en la circulación materna ha abierto el camino para la pruebas prenatales basadas en la secuenciación de próxima generación (NGS, por sus siglas en inglés) para identificar trisomías fetales y otras aberraciones genéticas, reemplazando potencialmente a la amniocentesis. En la biología del cáncer, se sabe que los tumores liberan ADN (incluyendo mutaciones somáticas específicas del tumor) en la circulación, proporcionando medios para biopsias líquidas para controlar la dinámica tumoral y la evolución genómica. Además, se ha usado ADNlc para detectar la muerte de células del injerto después del trasplante de riñón, hígado o corazón, basándose en polimorfismos de nucleótido único (SNP, por sus siglas en inglés) que distinguen el ADN del donante del de los receptores. En todos estos casos, existen diferencias genéticas entre la secuencia de ADN del tejido de interés (feto, tumor o injerto) y la del huésped, lo que proporciona la base para ensayos altamente específicos.

15

20

25

Se sabe que los niveles en la sangre de ADNlc aumentan en múltiples condiciones adicionales, tales como lesión cerebral traumática, enfermedad cardiovascular, sepsis y ejercicio intensivo. Sin embargo, en estos casos, se desconoce la fuente de ADNlc elevado, lo que afecta en gran medida la utilidad del ADNlc como una herramienta de diagnóstico o pronóstico. Por ejemplo, el ADNlc podría originarse a partir de células parenquimales del tejido lesionado, pero también de células inflamatorias moribundas.

30

A pesar de tener una secuencia de nucleótidos idéntica, el ADN de cada tipo de célula en el cuerpo porta marcas epigenéticas únicas que se correlacionan con su perfil de expresión génica. En particular, la metilación del ADN, que sirve para reprimir genes no transcritos, es un aspecto fundamental de la identidad del tejido. Los patrones de metilación son únicos para cada tipo de célula, se conservan entre células del mismo tipo en el mismo individuo y entre individuos, y son muy estables en condiciones fisiológicas o patológicas. Por lo tanto, puede ser posible usar el patrón de metilación del ADN del ADNlc para determinar su tejido de origen y, por lo tanto, inferir la muerte celular en el órgano de origen.

35

40

Teóricamente, tal enfoque podría identificar la tasa de muerte celular en un tejido de interés, teniendo en cuenta la cantidad total de ADNlc, la fracción derivada de un tejido de interés y la vida media estimada del ADNlc (15-120 minutos). Nótese que, dado que el enfoque se basa en marcadores normales y estables de identidad celular, no puede identificar la naturaleza de la patología (p. ej., distinguir ADNlc derivado de células tumorales muertas o células muertas de tipo silvestre debido a un traumatismo o inflamación en el mismo tejido). Los usos potenciales de un ensayo altamente sensible, mínimamente invasivo de muerte celular específica de tejido incluyen un diagnóstico temprano y preciso, así como la monitorización de la respuesta a la terapia tanto en entornos clínicos como de desarrollo de fármacos.

45

Un ejemplo clásico de metilación del ADN específica de tejido lo proporciona el promotor del gen de la insulina, que no se metila en las células  $\beta$  pancreáticas productoras de insulina y se metila en cualquier otro sitio. Estudios recientes han identificado ADN promotor de la insulina no metilado en la circulación de pacientes recién diagnosticados con T1D, así como en receptores de injerto de islotes, lo que probablemente refleja tanto la destrucción autoinmunitaria como la aloinmunitaria de las células  $\beta$  (Akiraiv E.M. y col. Proceedings of the National Academy of Sciences of the United States of America, 108, 19018-19023 (2011); Lebastchi J y col., Diabetes 62, 1676-1680 (2013); Husseiny M. I. Plos one 9 e94591 (2014); y Herold K.C. y col., J Clin Invest. Doi:10.1172/jc178142 (2015)).

50

La publicación internacional PCT n.º WO2012178007 describe un método de 25 para determinar la muerte de células beta pancreáticas mediante la detección de ADNlc en sangre que contiene hipometilación del promotor de la insulina. Husseiny y col., (2012) "Development of a Quantitative Methylation-Specific Polymerase Chain Reaction method for Monitoring Beta Cell Death in Type 1 Diabetes", PLoS ONE 7(10): e47942, describe un método similar mediante el uso de PCR para detectar el promotor de la insulina humana hipometilado en ADNlc.

60

La técnica anterior adicional incluye la publicación internacional PCT n.º WO2013131083, WO 2014138133 y WO201101728.

65

**Resumen de la invención**

- 5 La presente invención proporciona un método para detectar la muerte de un tipo de célula o tejido en un sujeto que comprende determinar si ADN libre de células comprendido en una muestra de fluido del sujeto se deriva del tipo de célula o tejido, en donde la determinación se efectúa determinando el estado de metilación de al menos cuatro sitios de metilación en una secuencia continua del ADN libre de células, comprendiendo la secuencia continua no más de 300 nucleótidos, en donde un estado de metilación de cada uno de los al menos cuatro sitios de metilación en la secuencia continua de la característica de ADN del tipo de célula o tejido es indicativo de muerte del tipo de célula o tejido.
- 10 También se describe, aunque no forma parte de la invención, un método para identificar una firma de metilación para un tipo de célula o tejido de interés que comprende identificar en el ADN del tipo de célula de interés una secuencia continua de no más de 300 nucleótidos que comprenden al menos 4 sitios de metilación, en donde cada uno de los sitios se metilan diferencialmente con respecto a un segundo tipo de célula o tejido no idéntico, identificando de este modo la firma de metilación para el tipo de célula o tejido de interés.
- 15 También se describe, aunque no forma parte de la invención, un método para determinar si el ADN se deriva de un tipo de célula o tejido de interés en una muestra, comprendiendo el método:
- 20 determinar el estado de metilación de al menos cuatro sitios de metilación en una secuencia continua del ADN, comprendiendo la secuencia no más de 300 nucleótidos, en donde un estado de metilación de cada uno de los al menos cuatro sitios de metilación en la secuencia continua característica de la célula de interés, es indicativo de que el ADN se deriva de la célula de interés.
- 25 También se describe, aunque no forma parte de la invención, un kit para identificar la fuente de ADN en una muestra que comprende oligonucleótidos que son capaces de detectar el estado de metilación de al menos cuatro sitios de metilación en una secuencia de ácido nucleico, siendo la secuencia de ácido nucleico no más larga que 300 pares de bases y comprendiendo al menos cuatro sitios de metilación que se metilan diferencialmente en una primera célula de interés con respecto a una segunda célula que no es idéntica a la primera célula de interés.
- 30 También se describe, aunque no forma parte de la invención, un kit para identificar la fuente de ADN en una muestra que comprende al menos dos oligonucleótidos que son capaces de amplificar un ADN que tiene una secuencia de ácido nucleico no más larga que 300 pares de bases, en donde la secuencia de ácido nucleico comprende al menos cuatro sitios de metilación que están diferencialmente metilados en una primera célula de interés con respecto a una segunda célula que no es idéntica a la primera célula de interés.
- 35 Según algunas realizaciones de la invención, el estado de metilación es característico de un tipo de célula o tejido de interés no enfermos.
- 40 Según algunas realizaciones de la invención, la secuencia comprende entre 50-250 nucleótidos.
- Según algunas realizaciones de la invención, cuando la muerte del tipo celular se asocia con un proceso patológico, el método comprende además diagnosticar el proceso patológico.
- 45 Según algunas realizaciones de la invención, ADN es ADN libre de células.
- Según algunas realizaciones de la invención, el ADN es ADN celular.
- 50 Según algunas realizaciones de la invención, el método comprende además lisar las células del ADN celular antes de la determinación.
- Según algunas realizaciones de la invención, los al menos cuatro sitios de metilación comprenden al menos cinco sitios de metilación.
- 55 Según algunas realizaciones de la invención, el tipo de célula de interés está comprendido en un fluido corporal.
- Según algunas realizaciones de la invención, la muestra comprende un fluido corporal.
- 60 Según algunas realizaciones de la invención, el fluido se selecciona del grupo que consiste en sangre, plasma, esperma, leche, orina, saliva y líquido cefalorraquídeo.
- Según algunas realizaciones de la invención, la determinación se efectúa usando al menos un oligonucleótido dependiente de metilación.
- 65 Según algunas realizaciones de la invención, el oligonucleótido dependiente de metilación se hibrida con al menos uno de los cuatro sitios de metilación, estando el sitio metilado.

Según algunas realizaciones de la invención, el oligonucleótido dependiente de la metilación se hibrida con al menos uno de los cuatro sitios de metilación, estando el sitio no metilado.

5 Según algunas realizaciones de la invención, la determinación se efectúa usando un oligonucleótido independiente de metilación.

Según algunas realizaciones de la invención, la determinación se efectúa usando al menos dos oligonucleótidos independientes de metilación.

10 Según algunas realizaciones de la invención, la determinación se efectúa mediante:

(a) la puesta en contacto el ADN en la muestra con bisulfito para convertir citosinas desmetiladas del ADN en uracilos;

15 (b) la amplificación de la secuencia continua de ADN usando oligonucleótidos que se hibridan con una secuencia de ácido nucleico adyacente al primer y último de los al menos cuatro sitios de metilación en la secuencia continua del ADN; y

20 (c) la secuenciación de la secuencia continua de ADN.

Según algunas realizaciones de la invención, la muestra comprende ADN libre de células que se deriva de una segunda célula que no es idéntica al tipo de célula o tejido.

25 Según algunas realizaciones de la invención, el método comprende además analizar la cantidad de ADN libre de células derivado del tipo de célula o tejido: cantidad de ADN libre de células derivado de la segunda célula.

Según algunas realizaciones de la invención, el método comprende además analizar la cantidad de ADN libre de células derivado del tipo de célula o tejido: cantidad total de ADN libre de células en la muestra.

30 Según algunas realizaciones de la invención, el tipo celular se selecciona del grupo que consiste en una célula beta pancreática, una célula exocrina pancreática, un hepatocito, una célula cerebral, una célula pulmonar, una célula de útero, una célula renal, una célula de mama, un adipocito, una célula de colon, una célula de recto, un cardiomiocito, una célula muscular esquelética, una célula de próstata y una célula de tiroides.

35 Según algunas realizaciones de la invención, el tejido se selecciona del grupo que consiste en tejido pancreático, tejido hepático, tejido pulmonar, tejido cerebral, tejido de útero, tejido renal, tejido de mama, grasa, tejido de colon, tejido de recto, tejido cardíaco, tejido de músculo esquelético, tejido de próstata y tejido de tiroides.

40 Según algunas realizaciones de la invención, la muestra es una muestra de sangre.

Según algunas realizaciones de la invención, el método comprende además cuantificar la cantidad de ADN libre de células que se deriva del tipo de célula o tejido.

45 Según algunas realizaciones de la invención, la secuencia comprende entre 50-250 nucleótidos.

Según algunas realizaciones de la invención, el ADN es ADN libre de células.

50 Según algunas realizaciones de la invención, la secuencia de ADN está comprendida en una secuencia establecida en una cualquiera de las Id. de sec. n.º: 1-1484.

Según algunas realizaciones de la descripción que no forman parte de la invención, el kit comprende además al menos un agente para secuenciar la secuencia de ADN.

55 Según algunas realizaciones de la descripción que no forman parte de la invención, el kit comprende además ADN que tiene la secuencia de ácido nucleico, en donde el ADN se deriva de una célula conocida de interés.

Según algunas realizaciones de la descripción que no forman parte de la invención, el kit es para diagnosticar un proceso patológico.

60 Según algunas realizaciones de la descripción que no forman parte de la invención, el kit es para monitorizar un tratamiento para un proceso patológico.

65 Según algunas realizaciones de la descripción que no forman parte de la invención, el kit es para monitorizar la muerte de un tipo de célula o tejido.

Según algunas realizaciones de la descripción que no forman parte de la invención, el kit comprende además bisulfito.

Según algunas realizaciones de la invención, al menos uno de los al menos dos oligonucleótidos codifica una secuencia de código de barras.

5 Según algunas realizaciones de la invención, al menos uno de los al menos dos oligonucleótidos está marcado con un resto identificable.

Según algunas realizaciones de la invención, al menos un oligonucleótido está marcado con un resto detectable.

10 Según algunas realizaciones de la invención, al menos uno de los al menos dos oligonucleótidos codifica una secuencia de código de barras.

15 Según algunas realizaciones de la invención, los dos oligonucleótidos codifican secuencias que permiten la unión a una superficie de célula de flujo.

A menos que se defina lo contrario, todos los términos técnicos y/o científicos usados en la presente memoria tienen el mismo significado que entiende comúnmente un experto en la técnica a la que pertenece la invención. Si bien se pueden usar métodos y materiales similares o equivalentes a los descritos en la presente memoria en la puesta en práctica o ensayos de las realizaciones de la invención, a continuación se describen métodos y/o materiales ilustrativos. En caso de conflicto, prevalecerá la memoria descriptiva de la patente, incluidas las definiciones. Además, los materiales, métodos y ejemplos son solo ilustrativos y no pretenden ser necesariamente limitantes.

#### 25 Breve descripción de varias vistas de los dibujos

Algunas realizaciones de la invención se describen en la presente memoria, solo a manera de ejemplo, con referencia a los dibujos y las imágenes adjuntos. Con referencia específica ahora a los dibujos en detalle, se enfatiza que los detalles mostrados son a manera de ejemplo y con fines de análisis ilustrativo de las realizaciones de la invención. A este respecto, la descripción tomada con los dibujos muestra claramente a los expertos en la técnica cómo pueden ponerse en práctica las realizaciones de la invención.

En los dibujos:

35 Figura 1A-D: ADN derivado de células beta en la circulación de pacientes con diabetes T1D.

A, estructura del fragmento del promotor del gen de la insulina usado como marcador. Los puntos negros representan sitios CpG, las flechas marcan las posiciones de los cebadores de PCR.

40 B, el estado de metilación de sitios CpG individuales en el promotor del gen de la insulina en múltiples tejidos. El gráfico muestra el porcentaje de moléculas no metiladas en el ADN de cada tejido. El conjunto de columnas de la derecha describe el porcentaje de moléculas en las que los 6 sitios CpG no se metilan.

45 C, ADN derivado de células beta en el plasma de controles sanos (c) y pacientes recientemente diagnosticados con T1D. La fracción de moléculas del ADN promotor de la insulina completamente no metiladas (que reflejan la fracción de ADN derivado de células beta) se multiplicó por el nivel absoluto de ADNlc medido en cada individuo. Prueba de Mann Whitney para controles frente a pacientes,  $p < 0,0001$ .

50 D, ADN derivado de células beta en la circulación de pacientes con T1D de larga data a los que se tomó muestra en los puntos de tiempo indicados después del trasplante intrahepático de islotes.

Figura 2A-C: identificación de ADNlc derivado de oligodendrocitos en esclerosis múltiple.

55 A, estado de metilación de *MBP3* y *WM1* en múltiples tejidos. Obsérvese la falta de metilación en el cerebro total pero no en el cerebelo rico en neuronas, lo que sugiere que las moléculas no metiladas se derivan de la glía (ver también las Figuras 8A-E y 9A-E).

B, ADN derivado de oligodendrocitos en el plasma de individuos sanos.

60 C, ADN derivado de oligodendrocitos en el plasma de pacientes con EM/NMO con recaídas y remisiones. El gráfico muestra los valores acumulados de *MBP3* y *WM1* no metilados en cada muestra. Controles frente a la enfermedad estable,  $p = 0,6$ ; controles frente a enfermedad recurrente,  $p < 0,0001$ ; enfermedad estable frente a recurrente,  $p < 0,0001$ ; controles frente a todos los pacientes,  $p = 0,021$ .

Figura 3A-D: identificación de ADNlc derivado del cerebro después de daño cerebral.

65

A, estado de metilación de los sitios CpG en el locus CG09787504 (Cerebro1) en múltiples tejidos, según lo determinado por secuenciación profunda. Las barras representan el porcentaje de moléculas en las que los 9 CpG del locus no se metilan.

5 B, ADN derivado del cerebro en el plasma de 12 voluntarios sanos, calculado multiplicando la fracción de las moléculas de Cerebro1 completamente no metiladas por la cantidad de ADNlc en cada individuo.

10 C, ADN derivado del cerebro en el plasma de 10 pacientes después de paro cardíaco. De cada paciente se tomó una muestra inmediatamente después de la reanimación (“aguda”) y en puntos de tiempo posteriores. Los marcadores marcan a los pacientes que sobrevivieron (“vivos”) o murieron, y la causa de la muerte (cerebral, cardíaca o respiratoria). Controles frente a pacientes (todos los puntos de tiempo),  $p < 0,0001$ .

15 D, ADN derivado del cerebro en el plasma de 5 pacientes después de una lesión cerebral traumática, a los que se tomó una muestra en diferentes días después de la admisión en una unidad de neurotrauma. Después de un año, dos pacientes permanecieron con puntuación de deterioro neurológico, dos pacientes se recuperaron y un paciente no sobrevivió, como se indicó. Controles frente a pacientes (todos los puntos de tiempo),  $p = 0,005$ .

20 Figura 4A-C: identificación del ADNlc exocrino derivado del páncreas en pacientes con cáncer pancreático o pancreatitis.

A, estado de metilación de los grupos CpG en los loci de *CUX2* y *REG1A*, en múltiples tejidos. Si bien *CUX2* parece no metilarse de forma selectiva en los conductos, *REG1A* no se metila ni en las células ductales ni en las acinares, pero tampoco en el -30 % de las células de colon.

25 B, niveles de fragmentos de ADN de *CUX2* y *REG1A* no metilados en el plasma de individuos sanos.

30 C, niveles de marcadores de páncreas exocrino no metilados en el plasma de pacientes con cáncer pancreático o pancreatitis crónica. El gráfico muestra la intensidad de la señal de cada marcador para cada paciente, después de reducir la señal de fondo (la señal más alta observada entre los controles sanos). Controles frente a pacientes con cáncer,  $p < 0,0001$ ; controles frente a cáncer localizado,  $p < 0,0001$ ; controles frente a enfermedad metastásica,  $p < 0,0001$ ; cáncer localizado frente a metastásico,  $p = 0,047$ ; controles frente a pancreatitis,  $p < 0,0001$ .

Figuras 5A-B: diagrama de flujo del método para detectar el ADN circulante derivado de un tejido específico.

35 A, procedimiento para identificar marcadores de metilación específicos para tejido.

B, procedimiento para determinar los niveles de ADN específico para tejidos en plasma.

40 Figuras 6A-B: metilación del promotor del gen de la insulina en el plasma de voluntarios sanos y pacientes recientemente diagnosticados con T1D.

A, estado de metilación de sitios CpG individuales en el promotor del gen de la insulina.

45 B, estado de metilación de una ventana ampliada de 4-6 CpG expresados como % de ADN no metilado, en los mismos pacientes que en el panel A.

Figuras 7A-E: metilación de la UTR en 3' de *MBP3*.

50 A, estructura del fragmento de la UTR en 3' de *MBP3* usado como marcador. Las paletas representan CpG. La paleta vacía representa el CpG detectado en la matriz Illumina 450k. Las flechas marcan las posiciones de los cebadores de PCR.

55 B, estado de metilación del sitio CpG individual en el locus de *MBP3* que se captura en la matriz Illumina 450 k. Datos de las matrices 450 k disponibles públicamente.

C, estado de metilación de los sitios CpG individuales y una ventana ampliada de múltiples CpG del locus de *MBP3*, en múltiples tejidos, según lo determinado por secuenciación profunda.

60 D, metilación de sitios CpG individuales del locus de *MBP3* en el plasma de controles sanos y pacientes con EM/NMO recurrente.

65 E, fracción del fragmento del locus de *MBP3* completamente no metilado en el plasma de voluntarios sanos y pacientes con MS/NMO (los mismos pacientes que en el panel D). Total de ADN del locus de *MBP3* no metilado expresado en plasma (ng/ml) se muestra en la Figura 2C.

Figuras 8A-E: metilación de CG10809560 y sitios CpG adyacentes (el locus *WM1*).

A, estructura del fragmento del locus de *WM1* utilizado como marcador. Las paletas representan CpG. La paleta vacía representa el CpG detectado en la matriz Illumina 450k. Las flechas marcan las posiciones de los cebadores de PCR.

5 B, estado de metilación de *WM1* en múltiples tejidos, como se registra en matrices Illumina 450k disponibles públicamente.

C, estado de metilación de los sitios CpG individuales y la ventana ampliada de múltiples CpG del locus de *WM1*, en múltiples tejidos, según lo determinado por secuenciación profunda.

10 D, metilación de sitios CpG individuales del locus *WM1* en el plasma de controles sanos y pacientes con EM/NMO recurrente.

15 E, fracción de fragmentos de ADN de *WM1* completamente no metilados en el plasma de voluntarios sanos y pacientes con MS/NMO (los mismos pacientes que en el panel D).

Figuras 9A-E: metilación del marcador cerebral CG09787504 (*Cerebro1*) y sitios CpG adyacentes.

20 A, estructura del fragmento del locus de *Cerebro1* utilizado como marcador. Las paletas representan CpG. La paleta vacía representa el CpG detectado en la matriz Illumina 450k. Las flechas marcan las posiciones de los cebadores de PCR.

25 B, estado de metilación de *Cerebro1* en múltiples tejidos, como se registra en matrices Illumina 450k disponibles públicamente.

C, estado de metilación de los sitios CpG individuales y ventana ampliada de múltiples CpG del locus de *Cerebro1*, en múltiples tejidos, según lo determinado por secuenciación profunda.

30 D, metilación de sitios CpG individuales del locus de *Cerebro1* en el plasma de controles sanos y pacientes después de paro cardíaco.

E, fracción de fragmentos de ADN de *Cerebro1* completamente no metilados en el plasma de voluntarios sanos y pacientes después de paro cardíaco (los mismos pacientes que en el panel D).

35 Figuras 10A-E: metilación del grupo CpG cerca del gen de *REG1A*.

A, estructura del fragmento de *REG1A* usado como marcador. Las paletas representan CpG. La paleta vacía representa el CpG detectado en la matriz Illumina 450k. Las flechas marcan las posiciones de los cebadores de PCR.

40 B, estado de metilación del sitio CpG individual en el locus de *REG1A* que se captura en la matriz Illumina 450k. Datos de las matrices 450 k disponibles públicamente.

C, estado de metilación de los sitios CpG individuales y la ventana ampliada de múltiples CpG del locus de *REG1A* en múltiples tejidos, según lo determinado por secuenciación profunda.

45 D, metilación de sitios CpG individuales del locus de *REG1A* en el plasma de controles sanos y pacientes con cáncer pancreático.

50 E, fracción de fragmento de *REG1A* completamente no metilado en el plasma de voluntarios sanos y pacientes con cáncer pancreático (los mismos pacientes que en el panel D).

Figuras 11A-E: metilación del grupo CpG cerca del gen de *CUX2*.

55 A, estructura del fragmento de *CUX2* usado como marcador. Las paletas representan CpG. La paleta vacía representa el CpG detectado en la matriz Illumina 450k. Las flechas marcan las posiciones de los cebadores de PCR.

B, estado de metilación del sitio CpG individual en el locus de *CUX2* que se captura en la matriz Illumina 450k. Datos de las matrices 450 k disponibles públicamente.

60 C, estado de metilación de los sitios CpG individuales y la ventana ampliada de múltiples CpG del locus de *CUX2*, en múltiples tejidos, según lo determinado por secuenciación profunda.

D, metilación de sitios CpG individuales del locus de *CUX2* en el plasma de controles sanos y pacientes con cáncer pancreático.

65

E, fracción del fragmento de *CUX2* completamente no metilado del plasma de voluntarios sanos y pacientes con cáncer pancreático (los mismos pacientes que en el panel D).

5 La Figura 12 es un gráfico que ilustra la existencia de fragmentos de ADN cerebral en el plasma de algunos pacientes con ELA.

La Figura 13 es un gráfico que ilustra la existencia de ADN de oligodendrocitos (MBP; Id de sec. n.º: 1248) y ADN de materia blanca (WM1; Id de sec. n.º: 1247) en plasma de pacientes con ELA (ng/ml de suero)

10 Las Figuras 14A-D son gráficos que ilustran marcadores de metilación para células epiteliales de colon. Figura 14A: secuencia comprendida en la Id de sec. n.º: 1258; Figura 14B: secuencia comprendida en la Id de sec. n.º: 1259; Figura 14C: secuencia comprendida en 1260; y la Figura 14D: secuencia comprendida en la Id de sec. n.º: 1257).

15 La Figura 15 es un gráfico que ilustra que no hay fragmentos de ADN de colon en sangre de sujetos sanos (recambio normal a lumen), mientras que hay presencia de ADN de colon en sangre de pacientes con cáncer de colon y enfermedad de Crohn.

20 La Figura 16 es un gráfico que ilustra la distribución de tejido de la SFTP/A1 no metilada (la secuencia comprendida en la Id de sec. n.º: 1268), un marcador pulmonar en varios tejidos.

La Figura 17 es un gráfico que ilustra la distribución de tejido de la SFTP/C no metilada (la secuencia comprendida en la Id de sec. n.º: 1273), un marcador pulmonar en varios tejidos.

25 La Figura 18 es un gráfico que ilustra la distribución de tejido de la CHST no metilada (la secuencia comprendida en la Id de sec. n.º: 1272), un marcador pulmonar en varios tejidos.

La Figura 19 es un gráfico que ilustra la distribución de tejido de la RAB4 no metilada (la secuencia comprendida en la Id de sec. n.º: 1271), un marcador pulmonar en varios tejidos.

30 Las Figuras 20A-C son gráficos que ilustran la distribución de tejido de tres marcadores de músculo esquelético (TNNI2, la secuencia comprendida en 1278, TPO, la secuencia comprendida en la Id de sec. n.º: 1277 y MAD1L1, la secuencia comprendida en la Id de sec. n.º: 1276), no metilados en el músculo y metilados en cualquier otro sitio.

35 La Figura 21 es un gráfico que ilustra los niveles de ADN derivado del músculo esquelético en el plasma de individuos sanos después de ejercicio intensivo y en pacientes con distrofia muscular de Duchenne o Becker.

La Figura 22 es un gráfico que ilustra la presencia de un marcador de metilación de células endoteliales vasculares (comprendido en la secuencia como se establece en la Id de sec. n.º: 1261 del gen DCUN1D2).

40 La Figura 23 es un gráfico que ilustra la presencia de un marcador de metilación de hepatocitos (comprendido en la secuencia como se establece en la Id de sec. n.º: 1267 del gen ALB).

45 Las Figuras 24A-B son gráficos que ilustran la presencia de un marcador de metilación de linfocitos (comprendido en la secuencia como se establece en la Id de sec. n.º: 1275 del gen PTPRCAP y la secuencia como se establece en la Id de sec. n.º: 1274 del gen AGAP2).

La Figura 25 es un gráfico que ilustra la presencia de un marcador de metilación de riñón (comprendido en la secuencia como se establece en la Id de sec. n.º: 1266 del gen AQP2).

50 Las Figuras 26A-D son gráficos que ilustran la presencia de marcadores de metilación de adipocitos (comprendidos en la secuencia como se establece en la Id de sec. n.º: 1262 del gen ACOT7, la secuencia como se establece en la Id de sec. n.º: 1263 del gen COL4A1, la secuencia como se establece en la Id de sec. n.º: 1264 del gen FRMD4A, la secuencia como se establece en la Id de sec. n.º: 1265 del gen NNMT).

55 Las Figuras 27A-D son gráficos que ilustran el ADN derivado de adipocitos en la circulación de individuos sanos (Control C).

#### **Descripción de realizaciones específicas de la invención**

60 La presente invención, en algunas realizaciones de la misma, se refiere a un método para determinar la fuente de ADN libre de células y el uso del mismo para diagnosticar procesos patológicos asociados con la muerte celular, monitorizar regímenes terapéuticos, tales como fármacos destinados a alterar la muerte celular, y estudiar con fines clínicos y de investigación procesos que influyen en los niveles de muerte celular.

Antes de explicar al menos una realización de la invención en detalle, debe entenderse que la invención no se limita necesariamente en su aplicación a los detalles establecidos en la siguiente descripción o ilustrados en los Ejemplos. La invención es capaz de otras realizaciones o de ponerse en práctica o llevarse a cabo de varias maneras.

5 El análisis del ADN circulante comienza a revolucionar el diagnóstico prenatal, el diagnóstico tumoral y la monitorización del rechazo del injerto. Sin embargo, una limitación importante de todas las aplicaciones es la dependencia de la presencia de diferencias genéticas identificables entre el tejido de interés y el huésped. Los presentes inventores han concebido un enfoque novedoso para detectar los orígenes de tejido del ADN circulante libre de células que supera esta limitación.

10 Los presentes inventores proponen el análisis de patrones de metilación específicos de tejido (que comprenden 4 o más sitios de metilación) presentes en los fragmentos de ADN circulante para proporcionar una herramienta sólida para detectar de forma no invasiva la muerte celular en esencialmente cada tejido del cuerpo humano. Los presentes métodos muestran una reducción significativa del ruido (nivel de señal en individuos sanos) en comparación con otros enfoques, hasta el punto de que se puede prever una utilidad clínica.

15 Mientras llevaban la presente invención a la práctica, los presentes inventores detectaron ADN circulante en plasma derivado de tejidos humanos específicos en patologías específicas sobre la base del análisis de dichos patrones de metilación. Los ejemplos incluyen la detección de ADN de células beta pancreáticas circulantes en diabetes tipo 1 (Figuras 1A-D), ADN de páncreas exocrino en adenocarcinoma ductal pancreático y pancreatitis (Figuras 4A-C), ADN cerebral después de lesión cerebral traumática o una lesión isquémica (Figuras 3A-D), ADN de oligodendrocitos en pacientes con esclerosis múltiple recurrente (Figuras 2A-C) y ADN de oligodendrocitos y ADN de la materia blanca en pacientes con ELA (Figuras 12 y 13). Además, los presentes inventores detectaron ADN de colon en sangre de pacientes con cáncer de colon y enfermedad de Crohn, ADN del músculo esquelético en sangre de individuos sanos después de ejercicios, ADN de adipocitos en sangre de individuos sanos, ADN de células endoteliales en sangre de pacientes con cáncer y ADN de oligodendrocitos en sangre de pacientes con glioblastoma multiforme.

20 El enfoque permite la detección, de una manera mínimamente invasiva pero altamente sensible y específica, de la muerte celular aguda en tejidos humanos normales y patológicos. La utilidad potencial de este enfoque es muy amplia. En el estudio de la fisiología normal, este método puede usarse para controlar la dinámica de tejidos durante el desarrollo y durante perturbaciones fisiológicas tales como cambios dietéticos, embarazo y envejecimiento. En una amplia variedad de patologías, que incluyen, pero no se limitan a, cánceres, traumatismos, infecciones y enfermedades autoinmunitarias, el método puede usarse para el diagnóstico temprano, la monitorización de la progresión de la enfermedad y la evaluación de la respuesta a la terapia. En el contexto del desarrollo de nuevos fármacos, el método puede adaptarse para identificar señales de eficacia o toxicidad, lo que podría optimizar el largo y costoso proceso de desarrollo de fármacos.

25 Por lo tanto, según un aspecto de la presente invención, se proporciona un método para identificar una firma de metilación para un tipo de célula o tejido de interés que comprende identificar en el ADN del tipo de célula o tejido de interés una secuencia continua de no más de 300 nucleótidos que comprenden al menos 4 sitios de metilación, en donde cada uno de los sitios se metilan diferencialmente con respecto a una segunda célula no idéntica, identificando de este modo la firma de metilación para el tipo de célula o tejido de interés.

30 La presente invención contempla la identificación de firmas de metilación en cualquier célula de interés, que incluye, pero no se limita a, células pancreáticas (tales como células beta pancreáticas, células pancreáticas exocrinas (p. ej., células acinares), células cerebrales, oligodendrocitos, células cardíacas (cardiomiocitos), células hepáticas (hepatocitos), células renales, células endoteliales vasculares, linfocitos, células pulmonares, células de útero, células de mama, adipocitos, células de colon, células de recto, células de próstata, células de tiroides y células musculares esqueléticas.

35 Como se usa en la presente memoria, el término “sitio de metilación” se refiere a un residuo de citosina adyacente al residuo de guanina (sitio CpG) que tiene un potencial de metilarse.

40 La secuencia continua preferiblemente no es más larga que 300 nucleótidos, 295 nucleótidos, 290 nucleótidos, 285 nucleótidos, 280 nucleótidos, 275 nucleótidos, 270 nucleótidos, 265 nucleótidos, 260 nucleótidos, 255 nucleótidos, 250 nucleótidos, 245 nucleótidos, 240 nucleótidos, 235 nucleótidos, 230 nucleótidos, 225 nucleótidos, 220 nucleótidos, 215 nucleótidos, 210 nucleótidos, 205 nucleótidos, 200 nucleótidos, 195 nucleótidos, 190 nucleótidos, 185 nucleótidos, 180 nucleótidos, 175 nucleótidos, 170 nucleótidos, 165 nucleótidos, 160 nucleótidos, 155 nucleótidos, 150 nucleótidos, 145 nucleótidos, 140 nucleótidos, 135 nucleótidos, 130 nucleótidos, 125 nucleótidos, 120 nucleótidos, 115 nucleótidos, 110 nucleótidos, 105 nucleótidos, 100 nucleótidos, 95 nucleótidos, 90 nucleótidos, 85 nucleótidos, 80 nucleótidos, 75 nucleótidos, 70 nucleótidos, 65 nucleótidos, 60 nucleótidos, 55 nucleótidos, o 50 nucleótidos.

45 Según una realización particular, la secuencia está entre 50-300 nucleótidos, p. ej., entre 50-250, entre 50-200, entre 100-300 nucleótidos, o entre 100-250 nucleótidos.

50 La secuencia puede ser de una región codificante o no codificante.

- 5 Según una realización particular, la secuencia no se deriva de un gen que se expresa diferencialmente en la célula de interés. Por lo tanto, por ejemplo, en el caso de identificar un patrón de metilación para una célula beta pancreática, la secuencia de ADN puede no ser parte de un gen que codifica la insulina u otra proteína de células beta pancreáticas.
- 10 Según otra realización particular, el patrón de metilación caracteriza la célula normal de interés y no es un patrón de metilación que caracteriza una célula enferma (no es por ejemplo un patrón de metilación que caracteriza las células cancerosas de un tipo específico).
- 15 Las secuencias continuas de ácido nucleico comprenden al menos 4 sitios de metilación, aunque se contemplan al menos 5, al menos 6, al menos 7 al menos 8, al menos 9 o incluso al menos 10 o más sitios de metilación.
- 20 Para considerar una firma de metilación para una célula particular de interés, cada uno de los al menos cuatro sitios de metilación que caracteriza una célula enferma (no es por ejemplo un patrón de metilación que caracteriza las células cancerosas de un tipo específico) tiene que metilarse diferencialmente en esa célula de interés con respecto a una segunda célula no idéntica.
- 25 Según una realización particular, cada uno de los al menos cuatro sitios de metilación no se metilan en la célula de interés (la célula para la que se determina el patrón de metilación), mientras que en la segunda célula no idéntica cada uno de los sitios se metilan.
- 30 Según otra realización, cada uno de los al menos cuatro sitios de metilación se metilan en la célula de interés, mientras que en la segunda célula no idéntica cada uno de los sitios no se metilan.
- 35 Según otra realización, al menos uno de los cuatro sitios de metilación no se metila en la célula de interés, mientras que en la segunda célula no idéntica ese sitio se metila.
- 40 Según otra realización, al menos dos de los cuatro sitios de metilación no se metilan en la célula de interés, mientras que en la segunda célula no idéntica esos sitios se metilan.
- 45 Según otra realización, al menos tres de los cuatro sitios de metilación no se metilan en la célula de interés, mientras que en la segunda célula no idéntica esos sitios se metilan.
- 50 La segunda célula no idéntica puede ser de cualquier fuente que incluye, por ejemplo, células sanguíneas.
- 55 Usando este método, los presentes inventores han identificado firmas de metilación de ADN derivado de células beta pancreáticas, células acinares, células cerebrales, neuronas, oligodendrocitos, cardiomiocitos, hepatocitos, células renales y células musculares esqueléticas, y muestran que estas firmas pueden distinguir con éxito entre el ADN derivado de esas células y el ADN derivado de células sanguíneas.
- 60 Por lo tanto, según otro aspecto de la presente invención, se proporciona un método para determinar si el ADN se deriva de una célula de interés en una muestra, comprendiendo el método:
- 65 determinar el estado de metilación de al menos cuatro sitios de metilación en una secuencia continua del ADN, comprendiendo la secuencia no más de 300 nucleótidos, en donde un estado de metilación de cada uno de los al menos cuatro sitios de metilación en la secuencia continua característica de la célula de interés es indicativo de que el ADN se deriva de la célula de interés.
- Se apreciará que el método es apropiado para examinar si el ADN investigado se deriva de un tipo de célula o tipo de tejido particular ya que las secuencias analizadas son específicas para tipos de células/tejidos particulares.
- Por lo tanto, por ejemplo, si el investigador desea determinar si el ADN presente en una muestra se deriva de células beta pancreáticas, necesita analizar secuencias que tengan un patrón de metilación característico de las células beta pancreáticas.
- Dichas secuencias están comprendidas por ejemplo en secuencias como se establece en las Id de sec. n.º: 1-50 y 1241-1244.
- Las Id de sec. n.º: 1-27 y 1241-1244 comprenden secuencias que incluyen al menos 4 sitios de metilación en una secuencia continua de no más de 300 nucleótidos que no se metilan en las células beta pancreáticas y se metilan en otras células (p. ej., células sanguíneas). Según una realización particular, la secuencia continua comprende CG de nucleótidos que están en la posición 250 y 251 de cada una de estas secuencias. Este CG no se metila en células beta pancreáticas y se metila en otras células (p. ej., células sanguíneas).
- Las Id de sec. n.º: 28-50 comprenden secuencias que incluyen al menos 4 sitios de metilación en una secuencia continua de no más de 300 nucleótidos que se metilan en las células beta pancreáticas y no se metilan en otras células (p. ej., células sanguíneas). Según una realización particular, la secuencia continua comprende CG de nucleótidos

que están en la posición 250 y 251 de cada una de estas secuencias. Este CG se metila en células beta pancreáticas y no se metila en otras células (p. ej., células sanguíneas).

5 Si el investigador desea determinar si el ADN presente en una muestra se deriva de células ductales pancreáticas, necesita analizar secuencias que tengan un patrón de metilación característico de las células ductales.

Dichas secuencias están comprendidas, por ejemplo, en secuencias como se establece en las Id de sec. n.º: 51-150.

10 Las Id de sec. n.º: 51-100 comprenden secuencias que incluyen al menos 4 sitios de metilación en una secuencia continua de no más de 300 nucleótidos que no se metilan en células ductales pancreáticas y se metilan en otras células (p. ej., células sanguíneas). Según una realización particular, la secuencia continua comprende CG de nucleótidos que están en la posición 250 y 251 de cada una de estas secuencias. Este CG no se metila en células ductales pancreáticas y se metila en otras células (p. ej., células sanguíneas).

15 Las Id de sec. n.º: 101-150 comprenden secuencias que incluyen al menos 4 sitios de metilación en una secuencia continua de no más de 300 nucleótidos que se metilan en células ductales pancreáticas y no se metilan en otras células (p. ej., células sanguíneas). Según una realización particular, la secuencia continua comprende CG de nucleótidos que están en la posición 250 y 251 de cada una de estas secuencias. Este CG se metila en células ductales pancreáticas y no se metila en otras células (p. ej., células sanguíneas).

20 Si el investigador desea determinar si el ADN presente en una muestra se deriva de células hepáticas, necesita analizar secuencias que tengan un patrón de metilación característico de las células hepáticas.

25 Dichas secuencias están comprendidas, por ejemplo, en secuencias como se establece en las Id de sec. n.º: 151-197 y 1267.

30 Las Id de sec. n.º: 151-173 y 1267 comprenden secuencias que incluyen al menos 4 sitios de metilación en una secuencia continua de no más de 300 nucleótidos que no se metilan en las células hepáticas y se metilan en otras células (p. ej., células sanguíneas). Según una realización particular, la secuencia continua comprende CG de nucleótidos que están en la posición 250 y 251 de cada una de estas secuencias. Este CG no se metila en células hepáticas y se metila en otras células (p. ej., células sanguíneas).

35 Las Id de sec. n.º: 174-197 comprenden secuencias que incluyen al menos 4 sitios de metilación en una secuencia continua de no más de 300 nucleótidos que se metilan en células hepáticas y no se metilan en otras células (p. ej., células sanguíneas). Según una realización particular, la secuencia continua comprende CG de nucleótidos que están en la posición 250 y 251 de cada una de estas secuencias. Este CG se metila en células hepáticas y no se metila en otras células (p. ej., células sanguíneas).

40 Si el investigador desea determinar si el ADN presente en una muestra se deriva del tejido pulmonar, necesita analizar secuencias que tengan un patrón de metilación característico de las células pulmonares.

Dichas secuencias están comprendidas, por ejemplo, en las secuencias 198-203 y 1268-1273.

45 Las Id de sec. n.º: 198-200 y 1268-1273 comprenden secuencias que incluyen al menos 4 sitios de metilación en una secuencia continua de no más de 300 nucleótidos que no se metilan en células pulmonares y se metilan en otras células (p. ej., células sanguíneas). Según una realización particular, la secuencia continua comprende CG de nucleótidos que están en la posición 250 y 251 de cada una de estas secuencias. Este CG no se metila en células pulmonares y se metila en otras células (p. ej., células sanguíneas).

50 Las Id de sec. n.º: 201-203 comprenden secuencias que incluyen al menos 4 sitios de metilación en una secuencia continua de no más de 300 nucleótidos que se metilan en células pulmonares y no se metilan en otras células (p. ej., células sanguíneas). Según una realización particular, la secuencia continua comprende CG de nucleótidos que están en la posición 250 y 251 de cada una de estas secuencias. Este CG se metila en células pulmonares y no se metila en otras células (p. ej., células sanguíneas).

55 Si el investigador desea determinar si el ADN presente en una muestra se deriva del tejido uterino, necesita analizar secuencias que tengan un patrón de metilación característico de las células del útero.

Dichas secuencias están comprendidas, por ejemplo, en las secuencias 204-237.

60 Las Id de sec. n.º: 204-227 comprenden secuencias que incluyen al menos 4 sitios de metilación en una secuencia continua de no más de 300 nucleótidos que no se metilan en las células del útero y se metilan en otras células (p. ej., células sanguíneas). Según una realización particular, la secuencia continua comprende CG de nucleótidos que están en la posición 250 y 251 de cada una de estas secuencias. Este CG no se metila en las células de útero y se metila en otras células (p. ej., células sanguíneas).

65

5 Las Id de sec. n.º: 228-237 comprenden secuencias que incluyen al menos 4 sitios de metilación en una secuencia continua de no más de 300 nucleótidos que se metilan en las células de útero y no se metilan en otras células (p. ej., células sanguíneas). Según una realización particular, la secuencia continua comprende CG de nucleótidos que están en la posición 250 y 251 de cada una de estas secuencias. Este CG se metila en las células de útero y no se metila en otras células (p. ej., células sanguíneas).

Si el investigador desea determinar si el ADN presente en una muestra se deriva de células renales, necesita analizar secuencias que tengan un patrón de metilación característico de las células renales.

10 Dichas secuencias están comprendidas, por ejemplo, en las secuencias 238-273 y 1266.

15 Las Id de sec. n.º: 238-254 y 1266 comprenden secuencias que incluyen al menos 4 sitios de metilación en una secuencia continua de no más de 300 nucleótidos que no se metilan en células renales y se metilan en otras células (p. ej., células sanguíneas). Según una realización particular, la secuencia continua comprende CG de nucleótidos que están en la posición 250 y 251 de cada una de estas secuencias. Este CG no se metila en células renales y se metila en otras células (p. ej., células sanguíneas).

20 Las Id de sec. n.º: 255-273 comprenden secuencias que incluyen al menos 4 sitios de metilación en una secuencia continua de no más de 300 nucleótidos que se metilan en las células renales y no se metilan en otras células (p. ej., células sanguíneas). Según una realización particular, la secuencia continua comprende CG de nucleótidos que están en la posición 250 y 251 de cada una de estas secuencias. Este CG se metila en las células renales y no se metila en otras células (p. ej., células sanguíneas).

25 Si el investigador desea determinar si el ADN presente en una muestra se deriva del tejido mamario, necesita analizar secuencias que tengan un patrón de metilación característico de las células de mama.

Dichas secuencias están comprendidas, por ejemplo, en las secuencias 274-290.

30 Las Id de sec. n.º: 274-277 comprenden secuencias que incluyen al menos 4 sitios de metilación en una secuencia continua de no más de 300 nucleótidos que no se metilan en el tejido mamario y se metilan en otras células de tejido no mamario (p. ej., células sanguíneas). Según una realización particular, la secuencia continua comprende CG de nucleótidos que están en la posición 250 y 251 de cada una de estas secuencias. Este CG no se metila en las células de mama y se metila en células distintas a las del tejido mamario (p. ej., células sanguíneas).

35 Las Id de sec. n.º: 278-290 comprenden secuencias que incluyen al menos 4 sitios de metilación en una secuencia continua de no más de 300 nucleótidos que se metilan en el tejido mamario y no se metilan en células de tejido no mamario (p. ej., células sanguíneas). Según una realización particular, la secuencia continua comprende CG de nucleótidos que están en la posición 250 y 251 de cada una de estas secuencias. Este CG se metila en tejido mamario y no se metila en células de tejido no mamario (p. ej., células sanguíneas).

40 Si el investigador desea determinar si el ADN presente en una muestra se deriva de adipocitos, necesita analizar secuencias que tengan un patrón de metilación característico de los adipocitos.

45 Dichas secuencias están comprendidas, por ejemplo, en secuencias como se establece en las Id de sec. n.º: 291-338 y 1262-1265.

50 Las Id de sec. n.º: 291-337 y 1262-1265 comprenden secuencias que incluyen al menos 4 sitios de metilación en una secuencia continua de no más de 300 nucleótidos que no se metilan en adipocitos y se metilan en otras células (p. ej., células sanguíneas). Según una realización particular, la secuencia continua comprende CG de nucleótidos que están en la posición 250 y 251 de cada una de estas secuencias. Este CG no se metila en adipocitos y se metila en otras células (p. ej., células sanguíneas).

55 La Id de sec. n.º: 338 comprende secuencias que incluyen al menos 4 sitios de metilación en una secuencia continua de no más de 300 nucleótidos que se metilan en adipocitos y no se metilan en otras células (p. ej., células sanguíneas). Según una realización particular, la secuencia continua comprende los nucleótidos CG que están en la posición 250 y 251 de esta secuencia. Este CG se metila en adipocitos y no se metila en otras células (p. ej., células sanguíneas).

60 Si el investigador desea determinar si el ADN presente en una muestra se deriva de tejido de colon, necesita analizar secuencias que tengan un patrón de metilación característico de las células derivadas de tejido de colon.

Dichas secuencias están comprendidas, por ejemplo, en secuencias como se establece en las Id de sec. n.º: 339-377 y 1257-1260.

65 Las Id de sec. n.º: 339-351 y 1257-1260 comprenden secuencias que incluyen al menos 4 sitios de metilación en una secuencia continua de no más de 300 nucleótidos que no se metilan en células de tejido de colon y se metilan en otras células de tejido no de colon (p. ej., células sanguíneas). Según una realización particular, la secuencia continua

comprende CG de nucleótidos que están en la posición 250 y 251 de cada una de estas secuencias. Este CG no se metila en células de colon y se metila en células de tejido no de colon (p. ej., células sanguíneas).

5 Las Id de sec. n.º: 352-377 comprenden secuencias que incluyen al menos 4 sitios de metilación en una secuencia continua de no más de 300 nucleótidos que se metilan en tejido de colon y no se metilan en células de tejido no de colon (p. ej., células sanguíneas). Según una realización particular, la secuencia continua comprende CG de nucleótidos que están en la posición 250 y 251 de cada una de estas secuencias. Este CG se metila en tejido de colon y no se metila en células de tejido no de colon (p. ej., células sanguíneas).

10 Si el investigador desea determinar si el ADN presente en una muestra se deriva de células de tejido prostático, necesita analizar secuencias que tengan un patrón de metilación característico de las células de tejido prostático.

Dichas secuencias están comprendidas, por ejemplo, en las secuencias 378-443.

15 Las Id de sec. n.º: 378-409 comprenden secuencias que incluyen al menos 4 sitios de metilación en una secuencia continua de no más de 300 nucleótidos que no se metilan en el tejido prostático y se metilan en otras células de tejido no prostático (p. ej., células sanguíneas). Según una realización particular, la secuencia continua comprende CG de nucleótidos que están en la posición 250 y 251 de cada una de estas secuencias. Este CG no se metila en las células de la próstata y se metila en células de tejido no prostático (p. ej., células sanguíneas).

20 Las Id de sec. n.º: 410-443 comprenden secuencias que incluyen al menos 4 sitios de metilación en una secuencia continua de no más de 300 nucleótidos que se metilan en el tejido prostático y no se metilan en células de tejido no prostático (p. ej., células sanguíneas). Según una realización particular, la secuencia continua comprende CG de nucleótidos que están en la posición 250 y 251 de cada una de estas secuencias. Este CG se metila en el tejido prostático y no se metila en células de tejido no prostático (p. ej., células sanguíneas).

25 Si el investigador desea determinar si el ADN presente en una muestra se deriva de células de tejido tiroideo, necesita analizar secuencias que tengan un patrón de metilación característico de las células de tejido tiroideo.

30 Dichas secuencias están comprendidas por ejemplo en las secuencias 444-501.

35 Las Id de sec. n.º: 444-455 comprenden secuencias que incluyen al menos 4 sitios de metilación en una secuencia continua de no más de 300 nucleótidos que no se metilan en el tejido tiroideo y se metilan en otras células de tejido no tiroideo (p. ej., células sanguíneas). Según una realización particular, la secuencia continua comprende CG de nucleótidos que están en la posición 250 y 251 de cada una de estas secuencias. Este CG no se metila en las células de la tiroides y se metila en células de tejido no tiroideo (p. ej., células sanguíneas).

40 Las Id de sec. n.º: 456-501 comprenden secuencias que incluyen al menos 4 sitios de metilación en una secuencia continua de no más de 300 nucleótidos que se metilan en el tejido tiroideo y no se metilan en células de tejido no tiroideo (p. ej., células sanguíneas). Según una realización particular, la secuencia continua comprende CG de nucleótidos que están en la posición 250 y 251 de cada una de estas secuencias. Este CG se metila en el tejido tiroideo y no se metila en células de tejido no tiroideo (p. ej., células sanguíneas).

45 Si el investigador desea determinar si el ADN presente en una muestra se deriva de células de tejido de vejiga, necesita analizar secuencias que tengan un patrón de metilación característico de células de tejido de vejiga.

Dichas secuencias están comprendidas por ejemplo en secuencias 502-509.

50 Las Id de sec. n.º: 502-506 comprenden secuencias que incluyen al menos 4 sitios de metilación en una secuencia continua de no más de 300 nucleótidos que no se metilan en el tejido de la vejiga y se metilan en células distintas a las del tejido vesical (p. ej., células sanguíneas). Según una realización particular, la secuencia continua comprende CG de nucleótidos que están en la posición 250 y 251 de cada una de estas secuencias. Este CG no se metila en células de la vejiga y se metila en células distintas a las del tejido vesical (p. ej., células sanguíneas).

55 Las Id de sec. n.º: 507-509 comprenden secuencias que incluyen al menos 4 sitios de metilación en una secuencia continua de no más de 300 nucleótidos que se metilan en el tejido de la vejiga y no se metilan en células distintas a las del tejido vesical (p. ej., células sanguíneas). Según una realización particular, la secuencia continua comprende CG de nucleótidos que están en la posición 250 y 251 de cada una de estas secuencias. Este CG se metila en el tejido de la vejiga y no se metila en células distintas a las del tejido vesical (p. ej., células sanguíneas).

60 Si el investigador desea determinar si el ADN presente en una muestra se deriva de islotes, necesita analizar secuencias que tengan un patrón de metilación característico de los islotes.

Dichas secuencias están comprendidas por ejemplo en las secuencias 510-746.

65

5 Las Id de sec. n.º: 510-650 comprenden secuencias que incluyen al menos 4 sitios de metilación en una secuencia continua de no más de 300 nucleótidos que no se metilan en los islotes y se metilan en células distintas a las del tejido de los islotes (p. ej., células sanguíneas). Según una realización particular, la secuencia continua comprende CG de nucleótidos que están en la posición 250 y 251 de cada una de estas secuencias. Este CG no se metila en los islotes y se metila en células distintas a las del tejido de los islotes (p. ej., células sanguíneas).

10 Las Id de sec. n.º: 651-746 comprenden secuencias que incluyen al menos 4 sitios de metilación en una secuencia continua de no más de 300 nucleótidos que se metilan en islotes y no se metilan en células distintas a las del tejido de los islotes (p. ej., células sanguíneas). Según una realización particular, la secuencia continua comprende CG de nucleótidos que están en la posición 250 y 251 de cada una de estas secuencias. Este CG se metila en los islotes y no se metila en células distintas a las del tejido de los islotes (p. ej., células sanguíneas).

15 Si el investigador desea determinar si el ADN presente en una muestra se deriva del músculo esquelético, necesita analizar secuencias que tengan un patrón de metilación característico del músculo esquelético.

Dichas secuencias están comprendidas, por ejemplo, en las secuencias 747-817 y 1276-1279.

20 Las Id de sec. n.º: 747-767 y 1276-1279 comprenden secuencias que incluyen al menos 4 sitios de metilación en una secuencia continua de no más de 300 nucleótidos que no se metilan en el músculo esquelético y se metilan en células distintas a las del tejido muscular esquelético (p. ej., células sanguíneas). Según una realización particular, la secuencia continua comprende CG de nucleótidos que están en la posición 250 y 251 de cada una de estas secuencias. Este CG no se metila en el músculo esquelético y se metila en células distintas a las del tejido muscular esquelético (p. ej., células sanguíneas).

25 Las Id de sec. n.º: 768-817 comprenden secuencias que incluyen al menos 4 sitios de metilación en una secuencia continua de no más de 300 nucleótidos que se metilan en el músculo esquelético y no se metilan en células distintas a las del tejido muscular esquelético (p. ej., células sanguíneas). Según una realización particular, la secuencia continua comprende CG de nucleótidos que están en la posición 250 y 251 de cada una de estas secuencias. Este CG se metila en islotes y no se metila en células distintas a las del tejido muscular esquelético (p. ej., células sanguíneas).

30 Si el investigador desea determinar si el ADN presente en una muestra se deriva del tejido pancreático, necesita analizar secuencias que tengan un patrón de metilación característico del tejido pancreático.

35 Dichas secuencias están comprendidas, por ejemplo, en las secuencias 818-863 y 1280-1284.

40 Las Id de sec. n.º: 818-835 y 1280-1284 comprenden secuencias que incluyen al menos 4 sitios de metilación en una secuencia continua de no más de 300 nucleótidos que no se metilan en el tejido pancreático y se metilan en células distintas a las del tejido pancreático (p. ej., células sanguíneas). Según una realización particular, la secuencia continua comprende CG de nucleótidos que están en la posición 250 y 251 de cada una de estas secuencias. Este CG no se metila en el tejido pancreático y se metila en células distintas a las del tejido pancreático (p. ej., células sanguíneas).

45 Las Id de sec. n.º: 836-863 comprenden secuencias que incluyen al menos 4 sitios de metilación en una secuencia continua de no más de 300 nucleótidos que se metilan en células pancreáticas y no se metilan en células distintas a las del tejido pancreático (p. ej., células sanguíneas). Según una realización particular, la secuencia continua comprende CG de nucleótidos que están en la posición 250 y 251 de cada una de estas secuencias. Este CG se metila en tejido pancreático y no se metila en células distintas a las del tejido pancreático (p. ej., células sanguíneas).

50 Si el investigador desea determinar si el ADN presente en una muestra se deriva de tejido de la materia blanca cerebral, necesita analizar secuencias que tengan un patrón de metilación característico del tejido de la materia blanca cerebral.

Dichas secuencias están comprendidas, por ejemplo, en las secuencias 864-1012.

55 Las Id de sec. n.º: 864-963 comprenden secuencias que incluyen al menos 4 sitios de metilación en una secuencia continua de no más de 300 nucleótidos que no se metilan en el tejido de la materia blanca cerebral y se metilan en células distintas a las del tejido de la materia blanca cerebral (p. ej., células sanguíneas). Según una realización particular, la secuencia continua comprende CG de nucleótidos que están en la posición 250 y 251 de cada una de estas secuencias. Este CG no se metila en el tejido de la materia blanca y se metila en células distintas a las del tejido de la materia blanca (p. ej., células sanguíneas).

60 Las Id de sec. n.º: 964-1012 comprenden secuencias que incluyen al menos 4 sitios de metilación en una secuencia continua de no más de 300 nucleótidos que se metilan en el tejido de la materia blanca y no se metilan en células distintas a las del tejido de la materia blanca (p. ej., células sanguíneas). Según una realización particular, la secuencia continua comprende CG de nucleótidos que están en la posición 250 y 251 de cada una de estas secuencias. Este

65

CG se metila en el tejido de la materia blanca y no se metila en células distintas a las del tejido de la materia blanca (p. ej., células sanguíneas).

5 Si el investigador desea determinar si el ADN presente en una muestra se deriva de células sanguíneas, necesita analizar secuencias que tengan un patrón de metilación característico de las células sanguíneas.

Dichas secuencias están comprendidas, por ejemplo, en las secuencias 1013-1137 y 1274-1275.

10 Las Id de sec. n.º: 1013-1112 y 1274-1275 comprenden secuencias que incluyen al menos 4 sitios de metilación en una secuencia continua de no más de 300 nucleótidos que no se metilan en las células sanguíneas y se metilan en células distintas a las sanguíneas. Según una realización particular, la secuencia continua comprende CG de nucleótidos que están en la posición 250 y 251 de cada una de estas secuencias. Este CG no se metila en células sanguíneas y se metilan en células no sanguíneas.

15 Las Id de sec. n.º: 1113-1137 comprenden secuencias que incluyen al menos 4 sitios de metilación en una secuencia continua de no más de 300 nucleótidos que se metilan en células sanguíneas y no se metilan en células no sanguíneas. Según una realización particular, la secuencia continua comprende CG de nucleótidos que están en la posición 250 y 251 de cada una de estas secuencias. Este CG se metila en células sanguíneas y no se metila en células no sanguíneas.

20 Si el investigador desea determinar si el ADN presente en una muestra se deriva de tejido cervical, necesita analizar secuencias que tengan un patrón de metilación característico de las células cervicales.

Dichas secuencias están comprendidas, por ejemplo, en las secuencias 1138-1216.

25 Las Id de sec. n.º: 1138-1173 comprenden secuencias que incluyen al menos 4 sitios de metilación en una secuencia continua de no más de 300 nucleótidos que no se metilan en células del tejido cervical y se metilan en células distintas a las del tejido cervical. Según una realización particular, la secuencia continua comprende CG de nucleótidos que están en la posición 250 y 251 de cada una de estas secuencias. Este CG no se metila en células cervicales y se metila en células distintas a las tejido cervical.

30 Las Id de sec. n.º: 1174-1216 comprenden secuencias que incluyen al menos 4 sitios de metilación en una secuencia continua de no más de 300 nucleótidos que se metilan en células de tejido cervical y no se metilan en células de tejido no cervical. Según una realización particular, la secuencia continua comprende CG de nucleótidos que están en la posición 250 y 251 de cada una de estas secuencias. Este CG se metila en células de tejido cervical y no se metila en células de tejido no cervical.

35 Si el investigador desea determinar si el ADN presente en una muestra se deriva del tejido retiniano, necesita analizar secuencias que tengan un patrón de metilación característico de las células retinianas.

40 Dichas secuencias están comprendidas, por ejemplo, en las secuencias 1217-1240.

45 Las Id de sec. n.º: 1217-1240 comprenden secuencias que incluyen al menos 4 sitios de metilación en una secuencia continua de no más de 300 nucleótidos que no se metilan en células de tejido retiniano y se metilan en células distintas a las de tejido retiniano. Según una realización particular, la secuencia continua comprende CG de nucleótidos que están en la posición 250 y 251 de cada una de estas secuencias. Este CG no se metila en células retinianas y se metila en células distintas a las del tejido retiniano (p. ej., células sanguíneas).

50 Si el investigador desea determinar si el ADN presente en una muestra se deriva de tejido cerebral, necesita analizar secuencias que tengan un patrón de metilación característico de las células de tejido cerebral.

Dichas secuencias están comprendidas, por ejemplo, en las secuencias 1285-1364 y 1245-1256.

55 Las Id de sec. n.º: 1245-1256 y 1285-1316 comprenden secuencias que incluyen al menos 4 sitios de metilación en una secuencia continua de no más de 300 nucleótidos que no se metilan en células del tejido cerebral y se metilan en células distintas a las del tejido cerebral. Según una realización particular, la secuencia continua comprende CG de nucleótidos que están en la posición 250 y 251 de cada una de estas secuencias. Este CG no se metila en células cerebrales y se metila en células distintas a las del tejido cerebral (p. ej., células sanguíneas).

60 Las Id de sec. n.º: 1317-1364 comprenden secuencias que incluyen al menos 4 sitios de metilación en una secuencia continua de no más de 300 nucleótidos que se metilan en células de tejido cerebral y no se metilan en células de tejido no cerebral (p. ej., células sanguíneas). Según una realización particular, la secuencia continua comprende CG de nucleótidos que están en la posición 250 y 251 de cada una de estas secuencias. Este CG se metila en células del tejido cerebral y no se metila en células distintas a las del tejido cerebral (p. ej., células sanguíneas).

65

Si el investigador desea determinar si el ADN presente en una muestra se deriva del tejido rectal, necesita analizar secuencias que tengan un patrón de metilación característico de las células de tejido rectal.

5 Dichas secuencias están comprendidas, por ejemplo, en secuencias como se establece en las Id de sec. n.º: 1365-1385.

10 Las Id de sec. n.º: 1365-1373 comprenden secuencias que incluyen al menos 4 sitios de metilación en una secuencia continua de no más de 300 nucleótidos que no se metilan en células de tejido rectal y se metilan en otras células (p. ej., células sanguíneas). Según una realización particular, la secuencia continua comprende CG de nucleótidos que están en la posición 250 y 251 de cada una de estas secuencias. Este CG no se metila en células de tejido rectal y se metila en otras células (p. ej., células sanguíneas).

15 Las Id de sec. n.º: 1374-1385 comprenden secuencias que incluyen al menos 4 sitios de metilación en una secuencia continua de no más de 300 nucleótidos que se metilan en células de tejido rectal y no se metilan en otras células (p. ej., células sanguíneas). Según una realización particular, la secuencia continua comprende CG de nucleótidos que están en la posición 250 y 251 de cada una de estas secuencias. Este CG se metila en células de tejido rectal y no se metila en otras células (p. ej., células sanguíneas).

20 Si el investigador desea determinar si el ADN presente en una muestra se deriva del tejido cardíaco, necesita analizar secuencias que tengan un patrón de metilación característico de las células de tejido cardíaco.

Dichas secuencias están comprendidas, por ejemplo, en secuencias como se establece en las Id de sec. n.º: 1386-1484.

25 Las Id de sec. n.º: 1386-1435 comprenden secuencias que incluyen al menos 4 sitios de metilación en una secuencia continua de no más de 300 nucleótidos que no se metilan en células de tejido cardíaco y se metilan en otras células (p. ej., células sanguíneas). Según una realización particular, la secuencia continua comprende CG de nucleótidos que están en la posición 250 y 251 de cada una de estas secuencias. Este CG no se metila en células de tejido cardíaco y se metila en otras células (p. ej., células sanguíneas).

30 Las Id de sec. n.º: 1436-1484 comprenden secuencias que incluyen al menos 4 sitios de metilación en una secuencia continua de no más de 300 nucleótidos que se metilan en células de tejido cardíaco y no se metilan en otras células (p. ej., células sanguíneas). Según una realización particular, la secuencia continua comprende CG de nucleótidos que están en la posición 250 y 251 de cada una de estas secuencias. Este CG se metila en células cardíacas y no se metila en otras células (p. ej., células sanguíneas).

40 Las secuencias que los presentes inventores han identificado como candidatas para determinar la fuente celular de un ADN pueden almacenarse en una base de datos. Las secuencias ilustrativas incluyen las descritas en la presente memoria anteriormente, tales como las establecidas en las Id de sec. n.º: 1-1484.

45 La base de datos puede dividirse en secuencias que son relevantes para la identificación de un tipo de célula o fuente de tejido particular. Además, o alternativamente, la base de datos puede dividirse en secuencias que cuando no se metilan son indicativas de un tipo de célula/fuente de tejido particular y en secuencias que cuando se metilan son indicativas de un tipo de célula/fuente de tejido particular.

La base de datos también puede contener el estado de metilación de las secuencias en sujetos analizados. Los sujetos pueden clasificarse como sanos o enfermos.

50 La base de datos puede almacenarse en un formato legible por ordenador en un medio legible por ordenador, y se accede opcionalmente y preferiblemente mediante un procesador de datos, tal como un ordenador de propósito general o circuitos dedicados.

Las muestras que pueden analizarse son generalmente muestras de fluido derivadas de sujetos mamíferos e incluyen, por ejemplo, sangre, plasma, esperma, leche, orina, saliva o líquido cefalorraquídeo.

55 Las muestras que se analizan típicamente comprenden ADN de al menos dos fuentes de células/tejidos, como se describe más adelante en la presente memoria.

60 Según una realización, una muestra de sangre se obtiene de un sujeto según métodos bien conocidos en la técnica. El plasma o suero puede aislarse según métodos conocidos en la técnica.

65 El ADN puede aislarse de la sangre inmediatamente o dentro de 1 hora, 2 horas, 3 horas, 4 horas, 5 horas o 6 horas. Opcionalmente, la sangre se almacena a temperaturas tales como 4 °C, o a -20 °C antes del aislamiento del ADN. En algunas realizaciones, una parte de la muestra de sangre se usa según la invención en una primera instancia de tiempo, mientras que una o más partes restantes de la muestra de sangre (o fracciones de la misma) se almacenan durante un período de tiempo para el uso posterior.

Según una realización, el ADN es ADN celular (es decir, comprendido en una célula).

Según otra realización más, el ADN está comprendido en una célula desprendida o no intacta.

Los métodos de extracción de ADN son bien conocidos en la técnica. Un protocolo de aislamiento de ADN clásico se basa en la extracción usando disolventes orgánicos tales como una mezcla de fenol y cloroformo, seguido de precipitación con etanol (J. Sambrook y col., "Molecular Cloning: A Laboratory Manual", 1989, 2<sup>da</sup> Ed., Cold Spring Harbour Laboratory Press: New York, N.Y.). Otros métodos incluyen: extracción de ADN mediante precipitación salina (P. Sunnucks y col., Genetics, 1996, 144: 747-756; S. M. Aljanabi e I. Martinez, Nucl. Acids Res. 1997, 25: 4692-4693), extracción de ADN con sales de bromuro de trimetilamonio (S. Gustincich y col., BioTechniques, 1991, 11: 298-302) y extracción de ADN con tiocianato de guanidinio (J. B. W. Hammond y col., Biochemistry, 1996, 240: 298-300).

También existen numerosos kits versátiles que pueden usarse para extraer ADN de tejidos y fluidos corporales y que están disponibles comercialmente, por ejemplo, en BD Biosciences Clontech (Palo Alto, CA), Epicentre Technologies (Madison, Wisconsin), Genra Systems, Inc. (Minneapolis, Minnesota), MicroProbe Corp. (Bothell, Washington), Organon Teknika (Durham, Carolina del Norte) y Qiagen Inc. (Valencia, California). Todos estos kits incluyen generalmente una guía de usuario que describe con gran detalle el protocolo a seguir. La sensibilidad, el tiempo de procesamiento y el coste pueden ser diferentes de un kit a otro. Un experto en la técnica puede seleccionar fácilmente el(los) kit(s) más apropiado(s) para una situación particular.

Según otra realización, el ADN es ADN libre de células. Para este método, la lisis celular no se realiza en la muestra. Los métodos para aislar ADN libre de células de fluidos corporales también se conocen en la técnica. Por ejemplo, se puede usar un kit Qiaquick, fabricado por Qiagen para extraer ADN libre de células del plasma o suero.

La muestra puede procesarse antes de que se lleve a cabo el método, por ejemplo, la purificación del ADN puede llevarse a cabo después del procedimiento de extracción. El ADN en la muestra puede escindir-se física o químicamente (p. ej., usando una enzima adecuada). El procesamiento de la muestra puede implicar uno o más de: filtración, destilación, centrifugación, extracción, concentración, dilución, purificación, inactivación de componentes interferentes, adición de reactivos y similares.

Se apreciará que la presente invención contempla el análisis de más de una secuencia diana (cada una de las cuales comprende al menos cuatro sitios de metilación en una secuencia continua del ADN). Por lo tanto, por ejemplo, se pueden analizar 2, 3, 4, 5, 6, 7, 8, 9, 10 o más secuencias diana (que sirven como marcadores específicos de tejido o célula). Esto puede efectuarse en paralelo usando la misma preparación de ADN o en una pluralidad de preparaciones de ADN.

Los métodos para determinar el estado de metilación de un sitio de metilación son conocidos en la técnica e incluyen el uso de bisulfito.

En este método, el ADN se trata con bisulfito, que convierte residuos de citosina en uracilo (que se convierten en timidina después de la PCR), pero deja los residuos de 5-metilcitosina sin cambios. Por lo tanto, el tratamiento con bisulfito introduce cambios específicos en la secuencia de ADN que dependen del estado de metilación de los residuos de citosina individuales, lo que produce información de resolución de nucleótido único sobre el estado de metilación de un segmento de ADN. Se pueden realizar diversos análisis en la secuencia alterada para recuperar esta información. Por lo tanto, el objetivo de este análisis se reduce a diferenciar entre polimorfismos de nucleótido único (citosinas y timidina) resultantes de la conversión con bisulfito.

Durante la reacción con bisulfito, se debe tener cuidado para reducir al mínimo la degradación del ADN, tal como modificando regularmente la temperatura de incubación.

La secuenciación con bisulfito se basa en la conversión de cada residuo de citosina no metilado individual en uracilo. Si la conversión es incompleta, el análisis posterior interpretará incorrectamente las citosinas no metiladas no convertidas como citosinas metiladas, lo que da como resultado resultados falsos positivos para la metilación. Solo las citosinas en el ADN monocatenario son susceptibles al ataque del bisulfito, por lo que la desnaturalización del ADN que se somete a análisis es fundamental. Es importante garantizar que los parámetros de reacción, tales como la temperatura y la concentración de sal, sean adecuados para mantener el ADN en una conformación monocatenaria y permitir una conversión completa.

Según una realización particular, se realiza una reacción oxidativa con bisulfito. La 5-metilcitosina y la 5-hidroximetilcitosina se leen ambas como una C en la secuenciación por bisulfito. La reacción con bisulfito oxidativo permite la diferenciación entre la 5-metilcitosina y la 5-hidroximetilcitosina con una resolución de base única. El método emplea una oxidación química específica de la 5-hidroximetilcitosina a la 5-formilcitosina, que posteriormente se convierte en uracilo durante el tratamiento con bisulfito. La base única, que más adelante se lee como C, es la 5-metilcitosina, que proporciona un mapa del estado de metilación real en la muestra de ADN. Los niveles de 5-

hidroximetilcitosina también se pueden cuantificar midiendo la diferencia entre la secuenciación por bisulfito y la secuenciación por bisulfito oxidativo.

5 Antes del análisis (o concomitante con el mismo), la secuencia de ADN tratada con bisulfito que comprende los al menos cuatro sitios de metilación puede someterse a una reacción de amplificación. Si se requiere amplificación de la secuencia, se debe tener cuidado para garantizar la desulfonación completa de los residuos de pirimidina. Esto se puede efectuar monitorizando el pH de la solución para garantizar que la desulfonación sea completa.

10 Como se usa en la presente memoria, el término “amplificación” se refiere a un proceso que aumenta la representación de una población de secuencias de ácido nucleico específicas en una muestra mediante la producción de múltiples (es decir, al menos 2) copias de las secuencias deseadas. Los métodos para la amplificación de ácido nucleico son conocidos en la técnica e incluyen, pero no se limitan a, reacción en cadena de la polimerasa (PCR) y reacción en cadena de la ligasa (LCR). En una reacción de amplificación por PCR típica, una secuencia de ácido nucleico de interés frecuentemente se amplifica al menos cincuenta mil veces en cantidad con respecto a su cantidad en la muestra inicial. Una “copia” o “amplión” no necesariamente significa una complementariedad o identidad de secuencia perfecta con la secuencia plantilla. Por ejemplo, las copias pueden incluir análogos de nucleótido tales como desoxiinosina, alteraciones de secuencia intencionales (tales como alteraciones de secuencia introducidas a través de un cebador que comprende una secuencia que puede hibridarse pero no es complementaria a la plantilla) y/o errores de secuencia que ocurren durante la amplificación.

20 Una reacción de amplificación típica se lleva a cabo poniendo en contacto un cebador directo e inverso (un par de cebadores) con el ADN de muestra junto con cualquier reactivo de reacción de amplificación adicional en condiciones que permitan la amplificación de la secuencia diana.

25 Los términos “cebador directo” y “cebador de amplificación directa” se usan en la presente memoria de manera intercambiable, y se refieren a un cebador que se hibrida (o se aparea) con la diana (cadena plantilla). Los términos “cebador inverso” y “cebador de amplificación inversa” se usan en la presente memoria de manera intercambiable, y se refieren a un cebador que se hibrida (o se aparea) con la cadena diana complementaria. El cebador directo se hibrida con la secuencia diana en 5' con respecto al cebador inverso.

30 El término “condiciones de amplificación”, como se usa en la presente memoria, se refiere a condiciones que promueven la hibridación y/o extensión de las secuencias de cebador. Dichas condiciones son bien conocidas en la técnica y dependen del método de amplificación seleccionado. Así, por ejemplo, en una reacción de PCR, las condiciones de amplificación comprenden generalmente ciclos térmicos, es decir, ciclos de la mezcla de reacción entre dos o más temperaturas. En las reacciones de amplificación isotérmica, la amplificación se produce sin ciclos térmicos, aunque puede requerirse un aumento de la temperatura inicial para iniciar la reacción. Las condiciones de amplificación abarcan todas las condiciones de reacción que incluyen, pero no se limitan a, temperatura y ciclos de temperatura, tampón, sal, fuerza iónica y pH, y similares.

40 Como se usa en la presente memoria, el término “reactivos de reacción de amplificación” se refiere a reactivos utilizados en reacciones de amplificación de ácido nucleico y puede incluir, pero no se limitan a, tampones, reactivos, enzimas que tienen actividad de la transcriptasa inversa y/o polimerasa o actividad de la exonucleasa, cofactores enzimáticos tales como magnesio o manganeso, sales, nicotinamida adenina dinucleasa (NAD) y trifosfatos de desoxinucleósidos (dNTP), tales como el trifosfato de desoxiadenosina, trifosfato de desoxiguanosina, trifosfato de desoxicitidina y trifosfato de timidina. Los reactivos de reacción de amplificación son fáciles de seleccionar para un experto en la técnica, que se basará en el método de amplificación usado.

50 Según este aspecto de la presente invención, la amplificación se puede efectuar usando técnicas tales como la reacción en cadena de la polimerasa (PCR), que incluye, pero no se limita a, la PCR específica de alelo, la PCR de ensamblaje o el ensamblaje cíclico de la polimerasa (PCA), la PCR asimétrica, la amplificación dependiente de helicasa, la PCR de inicio en caliente, la PCR específica de intersecuencia (ISSR), la PCR inversa, la PCR mediada por ligación, la PCR específica de metilación (MSP), la PCR con minicebador, la amplificación de sonda dependiente de ligación múltiple, la PCR múltiple, la PCR anidada, la PCR de extensión superpuesta, la PCR cuantitativa (Q-PCR), la PCR con transcripción inversa (RT-PCR), la PCR en fase sólida: abarca múltiples significados, que incluyen la amplificación Polony (donde las colonias de la PCR se derivan en una matriz de gel, por ejemplo), la PCR en puente (los cebadores se unen covalentemente a una superficie de soporte sólido), la PCR en fase sólida convencional (donde se aplica la PCR asimétrica en presencia de un soporte sólido que lleva un cebador con una secuencia que coincide con uno de los cebadores acuosos) y la PCR de fase sólida mejorada (donde la PCR en fase sólida convencional se puede mejorar empleando una Tm alta y un cebador de soporte sólido anidado con la aplicación opcional de una 'etapa' térmica para favorecer el cebado del soporte sólido), la PCR entrelazada asimétrica térmica (TAIL-PCR), PCR Touchdown (PCR Step-down), PAN-AC y Universal Fast Walking.

65 La técnica de PCR (o reacción en cadena de la polimerasa) es bien conocida en la técnica y se ha descrito, por ejemplo, en K. B. Mullis y F. A. Faloona, *Methods Enzymol.*, 1987, 155: 350-355 y las patentes estadounidenses n.º 4.683.202; 4.683.195; y 4.800.159. En su forma más simple, la PCR es un método in vitro para la síntesis enzimática de secuencias de ADN específicas, usando dos cebadores oligonucleotídicos que se hibridan con cadenas opuestas

y flanquean la región de interés en el ADN diana. Una pluralidad de ciclos de reacción, comprendiendo cada ciclo: una etapa de desnaturalización, una etapa de hibridación y una etapa de polimerización, da como resultado la acumulación exponencial de un fragmento de ADN específico ("PCR Protocols: A Guide to Methods and Applications", M. A. Innis (Ed.), 1990, Academic Press: Nueva York; "PCR Strategies", M. A. Innis (Ed.), 1995, Academic Press: Nueva York; "Polymerase chain reaction: basic principles and automation in PCR: A Practical Approach", McPherson y col. (Eds.), 1991, IRL Press: Oxford; R. K. Saiki y col., Nature, 1986, 324: 163-166). Los extremos de los fragmentos amplificados se definen como los extremos en 5' de los cebadores. Los ejemplos de ADN polimerasas capaces de producir productos de amplificación en reacciones de PCR incluyen, pero no se limitan a: La ADN polimerasa I de E. coli, el fragmento Klenow de la ADN polimerasa I, la ADN polimerasa T4, las ADN polimerasas termoestables aisladas de *Thermus aquaticus* (Taq), disponibles de una variedad de fuentes (por ejemplo, Perkin Elmer), *Thermus thermophilus* (United States Biochemicals), *Bacillus stearothermophilus* (Bio-Rad) o *Thermococcus litoralis* (polimerasa "Vent", New England Biolabs). Las secuencias diana de ARN pueden amplificarse mediante la transcripción inversa del ARNm en ADNc y, a continuación, mediante la realización de la PCR (RT-PCR), como se describió anteriormente. Alternativamente, se puede usar una sola enzima para ambas etapas como se describe en la patente estadounidense n.º 5.322.770.

La duración y la temperatura de cada etapa de un ciclo de PCR, así como el número de ciclos, se ajustan generalmente según los requisitos de rigurosidad vigentes. La temperatura y el tiempo de hibridación se determinan tanto por la eficiencia con la que se espera que un cebador se hibride con una plantilla como por el grado de falta de coincidencia que debe tolerarse. La capacidad de optimizar las condiciones de ciclo de reacción está dentro del conocimiento de un experto en la técnica. Aunque el número de ciclos de reacción puede variar dependiendo del análisis de detección que se realiza, usualmente es al menos 15, más usualmente al menos 20, y puede ser tan alto como 60 o mayor. Sin embargo, en muchas situaciones, el número de ciclos de reacción varía típicamente de aproximadamente 20 a aproximadamente 45.

La etapa de desnaturalización de un ciclo de PCR generalmente comprende calentar la mezcla de reacción a una temperatura elevada y mantener la mezcla a la temperatura elevada durante un período de tiempo suficiente para que cualquier ácido nucleico bicatenario o hibridado presente en la mezcla de reacción se disocie. Para la desnaturalización, la temperatura de la mezcla de reacción usualmente se eleva y se mantiene a una temperatura que varía de aproximadamente 85 °C a aproximadamente 100 °C, usualmente de aproximadamente 90 °C a aproximadamente 98 °C, y más usualmente de aproximadamente 93 °C a aproximadamente 96 °C durante un período de tiempo que varía de aproximadamente 3 a aproximadamente 120 segundos, usualmente de aproximadamente 5 a aproximadamente 30 segundos.

Después de la desnaturalización, la mezcla de reacción se somete a condiciones suficientes para la hibridación del cebador con el ADN plantilla presente en la mezcla. La temperatura de la mezcla de reacción se reduce para lograr estas condiciones y, usualmente, se selecciona para proporcionar una eficiencia y especificidad óptimas, variando generalmente de aproximadamente 50 °C a aproximadamente °C, usualmente de aproximadamente 55 °C a aproximadamente 70 °C, y más usualmente de aproximadamente 60 °C a aproximadamente 68 °C. Las condiciones de hibridación generalmente se mantienen durante un período de tiempo que varía de aproximadamente 15 segundos a aproximadamente 30 minutos, usualmente de aproximadamente 30 segundos a aproximadamente 5 minutos.

Después de la hibridación del cebador con el ADN plantilla o durante la hibridación del cebador con el ADN plantilla, la mezcla de reacción se somete a condiciones suficientes para proporcionar la polimerización de nucleótidos con respecto al extremo de cebador de tal manera que el cebador se extienda en una dirección 5' a 3' usando el ADN con el que se hibrida como una plantilla, (es decir, condiciones suficientes para la producción enzimática del producto de extensión de cebador). Para lograr condiciones de extensión de cebador, la temperatura de la mezcla de reacción se eleva típicamente a una temperatura que varía de aproximadamente 65 °C a aproximadamente 75 °C, usualmente de aproximadamente 67 °C a aproximadamente 73 °C, y se mantiene a esa temperatura durante un período de tiempo que varía de aproximadamente 15 segundos a aproximadamente 20 minutos, usualmente de aproximadamente 30 segundos a aproximadamente 5 minutos.

Los ciclos anteriores de desnaturalización, hibridación y polimerización pueden realizarse usando un dispositivo automatizado típicamente conocido como termociclador. Los termocicladores que pueden emplearse se describen en las patentes estadounidenses n.º 5.612.473; 5.602.756; 5.538.871; y 5.475.610. Los cicladores térmicos están disponibles comercialmente en, por ejemplo, Perkin Elmer-Applied Biosystems (Norwalk, Connecticut), BioRad (Hercules, California), Roche Applied Science (Indianápolis, Indiana) y Stratagene (La Jolla, California).

Según una realización, los cebadores que se usan en la reacción de amplificación son cebadores independientes de metilación. Estos cebadores flanquean el primer y el último de los al menos cuatro sitios de metilación (pero no se hibridan directamente con los sitios) y, en una reacción de PCR, son capaces de generar un amplicón que comprende los cuatro o más sitios de metilación.

Los cebadores independientes de metilación de este aspecto de la presente invención pueden comprender secuencias adaptadoras que incluyen secuencias código de barras. Los adaptadores pueden comprender además secuencias que son necesarias para unirse a una superficie de célula de flujo (sitios P5 y P7, para la secuenciación posterior),

una secuencia que codifica un promotor para una ARN polimerasa y/o un sitio de restricción. La secuencia código de barras puede usarse para identificar una molécula, muestra o biblioteca particular. La secuencia código de barras puede estar entre 3-400 nucleótidos, más preferiblemente entre 3-200 e incluso más preferiblemente entre 3-100 nucleótidos. Por lo tanto, la secuencia código de barras puede ser de 6 nucleótidos, 7 nucleótidos, 8, nucleótidos, nueve nucleótidos o diez nucleótidos. El código de barras es típicamente de 4-15 nucleótidos.

El oligonucleótido independiente de metilación de este aspecto de la presente invención no necesita reflejar la secuencia exacta de la secuencia de ácido nucleico diana (es decir, no necesita ser completamente complementario), pero debe ser lo suficientemente complementario como para hibridarse con el sitio diana bajo las condiciones particulares del experimento. Por consiguiente, la secuencia del oligonucleótido típicamente tiene al menos un 70 % de homología, preferiblemente al menos un 80 %, 90 %, 95 %, 97 %, 99 % o 100 % de homología, por ejemplo en una región de al menos 13 o más nucleótidos contiguos, con la secuencia diana. Las condiciones se seleccionan de manera que se favorezca la hibridación del oligonucleótido con el sitio diana y se minimice la hibridación con el sitio no diana.

Se deben tener en cuenta varios factores al seleccionar la rigurosidad de las condiciones de la hibridación. Por ejemplo, cuanto más fielmente el oligonucleótido (p. ej., cebador) refleje la secuencia de ácido nucleico diana, mayor será la rigurosidad de las condiciones de ensayo, aunque la rigurosidad no debe ser demasiado alta como para evitar la hibridación de los oligonucleótidos con la secuencia diana. Además, cuanto menor sea la homología del oligonucleótido con la secuencia diana, menor debe ser la rigurosidad de las condiciones del ensayo, aunque la rigurosidad no debe ser demasiado baja como para permitir la hibridación con secuencias de ácido nucleico no específicas.

Como se mencionó, la presente invención contempla analizar más de una secuencia diana (cada una de las cuales comprende al menos cuatro sitios de metilación en una secuencia continua del ADN). Las secuencias pueden analizarse individualmente o como parte de una reacción múltiple.

El ADN puede secuenciarse usando cualquier método conocido en la técnica, p. ej., secuenciación de ADN masivamente paralela, secuenciación por síntesis, secuenciación por ligación, pirosecuenciación 454, amplificación de grupo, amplificación de puente y amplificación por PCR, aunque preferiblemente el método comprende un método de secuenciación de alto rendimiento. Los métodos típicos incluyen la tecnología de secuenciación y la instrumentación analítica ofrecida por Roche 454 Life Sciences™, Branford, Connecticut, que a veces se denomina en la presente memoria “tecnología 454” o “secuenciación 454”; la tecnología de secuenciación y la instrumentación analítica ofrecida por Illumina, Inc, San Diego, California (su tecnología de secuenciación Solexa a veces se denomina en la presente memoria “método Solexa” o “tecnología Solexa”); o la tecnología de secuenciación e instrumentación analítica ofrecida por ABI, Applied Biosystems, Indianápolis, Indiana, que a veces se denomina en la presente memoria la plataforma o metodología ABI-SOLiD™.

Otros métodos conocidos para la secuenciación incluyen, por ejemplo, los descritos en: Sanger, F. y col., Proc. Natl. Acad. Sci. U.S.A. 75, 5463-5467 (1977); Maxam, A. M. & Gilbert, W. Proc Natl Acad Sci EE. UU. 74, 560-564 (1977); Ronaghi, M. y col., Science 281, 363, 365 (1998); Lysov, I. y col., Dokl Akad Nauk SSSR 303, 1508-1511 (1988); Bains W. & Smith G. C. J. Theor Biol 135, 303-307 (1988); Drnanac, R. y col., Genomics 4, 114-128 (1989); Khrapko, K. R. y col., FEBS Lett 256, 118-122 (1989); Pevzner P. A. J Biomol Struct Dyn 7, 63-73 (1989); y Southern, E. M. y col., Genomics 13, 1008-1017 (1992). También se puede usar la reacción de secuenciación basada en pirofosfato como se describe, p. ej., en las patentes estadounidenses n.º 6.274.320, 6.258.568 y 6.210.891.

La secuenciación de Illumina o Solexa se basa en terminadores de tinte reversibles. Las moléculas de ADN se unen típicamente a cebadores en un portaobjetos y se amplifican para que se formen colonias clonales locales. Posteriormente, se puede añadir un tipo de nucleótido a la vez, y los nucleótidos no incorporados se eliminan. Posteriormente, se pueden tomar imágenes de los nucleótidos marcados con fluorescencia y el tinte se elimina químicamente del ADN, lo que permite un siguiente ciclo. La tecnología SOLiD de Applied Biosystems emplea secuenciación por ligación. Este método se basa en el uso de un grupo de todos los oligonucleótidos posibles de una longitud fija, que se marcan según la posición secuenciada. Dichos oligonucleótidos se hibridan y se ligan. Posteriormente, la ligación preferencial por ADN ligasa para secuencias coincidentes típicamente da como resultado una señal informativa del nucleótido en esa posición. Dado que el ADN se amplifica típicamente por PCR en emulsión, las perlas resultantes, conteniendo cada una solo copias de la misma molécula de ADN, pueden depositarse en un portaobjetos de vidrio dando como resultado secuencias de cantidades y longitudes comparables a las de la secuenciación de Illumina. Otro ejemplo de un método de secuenciación previsto es pirosecuenciación, en particular pirosecuenciación 454, p. ej., basada en el secuenciador de genoma Roche 454. Este método amplifica el ADN dentro de las gotas de agua en una solución de aceite, conteniendo cada gota una única plantilla de ADN unida a una sola perla recubierta con cebador que, a continuación, forma una colonia clonal. La pirosecuenciación usa luciferasa para generar luz para la detección de los nucleótidos individuales añadidos al ADN naciente, y los datos combinados se usan para generar lecturas de secuencia. Un método adicional se basa en la tecnología Heliscope de Helicos, en donde los fragmentos se capturan mediante oligómeros poliT unidos a una matriz. En cada ciclo de secuenciación, se añaden polimerasa y nucleótidos individuales marcados con fluorescencia, y se obtienen imágenes de la matriz. Posteriormente se elimina el marcador fluorescente y se repite el ciclo. Otros ejemplos de técnicas de secuenciación

que abarcan los métodos de la presente invención son la secuenciación por hibridación, secuenciación mediante el uso de nanoporos, técnicas de secuenciación basada en microscopía, secuenciación de Sanger microfluidica o métodos de secuenciación basados en microchip. La presente invención también prevé desarrollos adicionales de estas técnicas, p. ej., mejoras adicionales de la precisión de la determinación de secuencia, o el tiempo necesario para la determinación de la secuencia genómica de un organismo, etc.

Según una realización, el método de secuenciación comprende la secuenciación profunda.

Como se usa en la presente memoria, el término “secuenciación profunda” y variaciones del mismo se refieren al número de veces que se lee un nucleótido durante el proceso de secuenciación. La secuenciación profunda indica que la cobertura, o profundidad, del proceso es muchas veces mayor que la longitud de la secuencia en estudio.

Se apreciará que cualquiera de los métodos analíticos descritos en la presente memoria puede realizarse de muchas formas. Por ejemplo, puede incorporarse en un medio tangible tal como un ordenador para realizar las operaciones del método. Puede incorporarse en un medio legible por ordenador, que comprenda instrucciones legibles por ordenador para llevar a cabo las operaciones del método. También puede incorporarse en un dispositivo electrónico que tenga capacidades informáticas digitales diseñadas para ejecutar el programa informático en el medio tangible o ejecutar la instrucción en un medio legible por ordenador.

Los programas informáticos que implementan el método analítico de las presentes realizaciones se pueden distribuir comúnmente a los usuarios en un medio de distribución tal como, aunque no de forma limitativa, CD-ROM o medios de memoria flash. Desde el medio de distribución, los programas informáticos pueden copiarse en un disco duro o un medio de almacenamiento intermedio similar. En algunas realizaciones de la presente invención, los programas informáticos que implementan el método de las presentes realizaciones pueden distribuirse a los usuarios permitiéndoles descargar los programas desde una ubicación remota, a través de una red de comunicaciones, p. ej., internet. Los programas informáticos pueden ejecutarse cargando las instrucciones del ordenador desde su medio de distribución o desde su medio de almacenamiento intermedio en la memoria de ejecución del ordenador, configurando el ordenador para que opere según el método de esta invención. Todas estas operaciones son bien conocidas por los expertos en la técnica de los sistemas informáticos.

Los métodos adicionales que se basan en el uso de bisulfito y que pueden usarse para analizar el patrón de metilación como se describe en la presente memoria, se describen a continuación:

Extensión del cebador de un solo nucleótido sensible a la metilación:

El ADN se convierte con bisulfito y los cebadores específicos de bisulfito se hibridan con la secuencia hasta el par de bases inmediatamente delante del CpG de interés. Se permite que el cebador se extienda un par de bases en la C (o T) usando didesoxinucleótidos terminadores por ADN polimerasa, y la relación de C a T se determina cuantitativamente. Se pueden usar varios métodos para determinar esta relación de C:T, tal como el uso de ddNTP radiactivos como indicador de la extensión de cebador, también pueden usarse métodos basados en fluorescencia o pirosecuenciación. El análisis de la espectrometría de masas de desorción/ionización láser asistida por matriz con tiempo de vuelo (MALDI-TOF) puede usarse para diferenciar entre los dos productos de extensión de cebadores polimórficos, en esencia, basándose en el ensayo GOOD diseñado para el genotipado de SNP. También se puede usar cromatografía líquida de alto rendimiento en fase inversa de par iónico (IP-RP-HPLC) para distinguir los productos de extensión del cebador.

**Escisión específica de base/MALDI-TOF:** Este método aprovecha las conversiones con bisulfito mediante la adición de una etapa de escisión específica de la base para mejorar la información obtenida de los cambios de nucleótidos. Al usar primero la transcripción in vitro de la región de interés en el ARN (añadiendo un sitio promotor de ARN polimerasa al cebador de PCR en la amplificación inicial), la ARNasa A puede usarse para escindir el transcrito de ARN en sitios específicos de la base. Como la ARNasa A escinde el ARN específicamente en los ribonucleótidos de citosina y uracilo, la especificidad de la base se logra mediante la incorporación de dTTP resistente a la escisión cuando se desea la escisión específica de citosina (específica de C), y la incorporación de dCTP cuando se desea la escisión específica de uracilo (específica de U). Los fragmentos escindidos pueden a continuación analizarse mediante MALDI-TOF. El tratamiento con bisulfito da como resultado la introducción/eliminación de sitios de escisión mediante las conversiones de C en U o un cambio en la masa de fragmentos mediante las conversiones de G en A en la cadena inversa amplificada. La escisión específica de C cortará específicamente en todos los sitios CpG metilados. Al analizar los tamaños de los fragmentos resultantes, es posible determinar el patrón específico de metilación del ADN de los sitios CpG dentro de la región.

Los presentes inventores contemplan además analizar el estado de metilación de los al menos cuatro sitios, incluido el uso de oligonucleótidos dependientes de metilación.

Los oligonucleótidos dependientes de metilación hibridan con la forma metilada del al menos un sitio de metilación o la forma no metilada del al menos un sitio de metilación.

Según una realización, el oligonucleótido dependiente de metilación es una sonda. En una realización, la sonda se hibrida con el sitio metilado para proporcionar una señal detectable bajo las condiciones del experimento y no se hibrida con el sitio no metilado para proporcionar una señal detectable bajo las condiciones idénticas del experimento. En otra realización, la sonda se hibrida con el sitio no metilado para proporcionar una señal detectable bajo las condiciones del experimento y no se hibrida con el sitio metilado para proporcionar una señal detectable bajo las condiciones idénticas del experimento. Las sondas de esta realización de este aspecto de la presente invención pueden fijarse, por ejemplo, a un soporte sólido (p. ej., matrices o perlas).

Según otra realización, el oligonucleótido dependiente de metilación es un cebador que cuando se usa en una reacción de amplificación es capaz de amplificar la secuencia diana, cuando el sitio de metilación se metila. Según otra realización, el oligonucleótido dependiente de metilación es un cebador que cuando se usa en una reacción de amplificación es capaz de amplificar la secuencia diana, cuando el sitio de metilación no se metila, ver por ejemplo la publicación internacional PCT n.º WO2013131083.

El oligonucleótido dependiente de metilación de este aspecto de la presente invención no necesita reflejar la secuencia exacta de la secuencia de ácido nucleico diana (es decir, no es necesario que sea completamente complementario), pero debe ser lo suficientemente complementario como para distinguir entre un sitio metilado y no metilado bajo las condiciones particulares del experimento. Por consiguiente, la secuencia del oligonucleótido típicamente tiene al menos un 70 % de homología, preferiblemente al menos un 80 %, 90 %, 95 %, 97 %, 99 % o 100 % de homología, por ejemplo en una región de al menos 13 o más nucleótidos contiguos, con la secuencia diana. Las condiciones se seleccionan de tal manera que se favorezca la hibridación del oligonucleótido con el sitio metilado y se minimice la hibridación con el sitio no metilado (y viceversa).

A manera de ejemplo, la hibridación de ácidos nucleicos cortos (por debajo de 200 pb de longitud, p. ej., 13-50 pb de longitud) puede efectuarse mediante los siguientes protocolos de hibridación dependiendo de la rigurosidad deseada; (i) solución de hibridación de 6 x SSC y SDS al 1 % o TMACl 3 M, fosfato de sodio 0,01 M (pH 6,8), EDTA 1 mM (pH 7,6), SDS al 0,5 %, 100 µg/ml de ADN de esperma de salmón desnaturalizado y leche deshidratada no grasa al 0,1 %, temperatura de hibridación de 1-1,5 °C por debajo de T<sub>m</sub>, solución de lavado final de TMACl 3 M, fosfato de sodio 0,01 M (pH 6,8), EDTA 1 mM (pH 7,6), SDS al 0,5 % a 1-1,5 °C por debajo de la T<sub>m</sub> (condiciones restrictivas de hibridación) (ii) solución de hibridación de 6 x SSC y SDS al 0,1 % o TMACl 3 M, fosfato de sodio 0,01 M (pH 6,8), EDTA 1 mM (pH 7,6), SDS al 0,5 %, 100 µg/ml de ADN de esperma de salmón desnaturalizado y leche deshidratada no grasa al 0,1 %, temperatura de hibridación de 2-2,5 °C por debajo de T<sub>m</sub>, solución de lavado final de TMACl 3 M, fosfato de sodio 0,01 M (pH 6,8), EDTA 1 mM (pH 7,6), SDS al 0,5 % a 1-1,5 °C por debajo de T<sub>m</sub>, solución de lavado final de 6 x SSC y lavado final a 22 °C (condiciones de hibridación de rigurosas a moderadas); y (iii) solución de hibridación de 6 x SSC y SDS al 1 % o TMACl 3 M, fosfato de sodio 0,01 M (pH 6,8), EDTA 1 mM (pH 7,6), SDS al 0,5 %, 100 µg/ml de ADN de esperma de salmón desnaturalizado y leche secada a no grasa 0,1 %, temperatura de hibridación a 2,5-3 °C por debajo de la T<sub>m</sub> y la solución de lavado final de 6 x SSC a 22 °C (solución de hibridación moderada).

Los oligonucleótidos de la invención pueden prepararse mediante cualquiera de una variedad de métodos (ver, por ejemplo, J. Sambrook y col., "Molecular Cloning: A Laboratory Manual", 1989, 2.ª edición, Cold Spring Harbour Laboratory Press: Nueva York, N.Y.; "PCR Protocols: A Guide to Methods and Applications", 1990, M. A. Innis (Ed.), Academic Press: Nueva York, N.Y.; P. Tijssen "Hybridization with Nucleic Acid Probes--Laboratory Techniques in Biochemistry and Molecular Biology (Parts I and II)", 1993, Elsevier Science; "PCR Strategies", 1995, M. A. Innis (Ed.), Academic Press: Nueva York, N.Y.; y "Short Protocols in Molecular Biology", 2002, F. M. Ausubel (Ed.), 5.ª Ed., John Wiley & Sons: Secaucus, Nueva Jersey). Por ejemplo, los oligonucleótidos pueden prepararse usando cualquiera de una variedad de técnicas químicas bien conocidas en la técnica, que incluyen, por ejemplo, síntesis química y polimerización basada en una plantilla como se describe, por ejemplo, en S. A. Narang y col., Meth. Enzymol. 1979, 68: 90-98; E. L. Brown y col., Meth. Enzymol. 1979, 68: 109-151; E. S. Belousov y col., Nucleic Acids Res. 1997, 25: 3440-3444; D. Guschin y col., Anal. Biochem. 1997, 250: 203-211; M. J. Blommers y col., Biochemistry, 1994, 33: 7886-7896; y K. Frenkel y col., Free Radic. Biol. Med. 1995, 19: 373-380; y Pat. de EE.UU. n.º 4.458.066.

Por ejemplo, los oligonucleótidos pueden prepararse usando un procedimiento automatizado en fase sólida basado en el enfoque de fosforamidita. En dicho método, cada nucleótido se añade individualmente al extremo en 5' de la cadena de oligonucleótidos en crecimiento, que se une a un soporte sólido en el extremo en 3'. Los nucleótidos añadidos están en forma de 3'-fosforamiditas trivalentes que se protegen de la polimerización mediante un grupo dimetoxitriilo (o DMT) en la posición 5'. Después del acoplamiento de fosforamidita inducido por base, la oxidación suave para proporcionar un intermedio de fosfotriéster pentavalente y la eliminación de DMT proporciona un nuevo sitio para el alargamiento de oligonucleótidos. Después, los oligonucleótidos se escinden del soporte sólido, y los grupos amino de fosfodiéster y exocíclicos se desprotegen con hidróxido de amonio. Estas síntesis pueden realizarse en sintetizadores de oligonucleótidos tales como los disponibles comercialmente en Perkin Elmer/Applied Biosystems, Inc. (Foster City, California), DuPont (Wilmington, Delaware) o Milligan (Bedford, Massachusetts). Alternativamente, los oligonucleótidos pueden prepararse a medida y ordenarse en una variedad de fuentes comerciales bien conocidas en la técnica, que incluyen, por ejemplo, Midland Certified Reagent Company (Midland, Texas), ExpressGen, Inc. (Chicago, Ill.), Operon Technologies, Inc. (Huntsville, Alabama), y muchos otros.

La purificación de los oligonucleótidos de la invención, cuando sea necesario o deseable, puede llevarse a cabo mediante cualquiera de una variedad de métodos bien conocidos en la técnica. La purificación de oligonucleótidos se realiza típicamente mediante electroforesis en gel de acrilamida nativa, mediante HPLC de intercambio aniónico como la describen, por ejemplo, J. D. Pearson y F. E. Regnier (*J. Chrom.*, 1983, 255: 137-149) o mediante HPLC de fase inversa (G. D. McFarland y P. N. Borer, *Nucleic Acids Res.*, 1979, 7: 1067-1080).

La secuencia de oligonucleótidos puede verificarse usando cualquier método de secuenciación adecuado que incluye, pero no se limita a, degradación química (A. M. Maxam y W. Gilbert, *Methods of Enzymology*, 1980, 65: 499-560), espectrometría de masas de desorción/ionización láser asistida por matriz con tiempo de vuelo (MALDI-TOF) (U. Pielers y col., *Nucleic Acids Res.*, 1993, 21: 3191-3196), espectrometría de masas después de una combinación de digestiones con fosfatasa alcalina y exonucleasa (H. Wu y H. Aboleneen, *Anal. Biochem.*, 2001, 290: 347-352) y similares.

En ciertas realizaciones, las sondas de detección o cebadores de amplificación o tanto sondas como cebadores se marcan con un agente o resto detectable antes de usarse en ensayos de amplificación/detección. En ciertas realizaciones, las sondas de detección se marcan con un agente de detección. Preferiblemente, un agente de detección se selecciona de tal manera que genere una señal que pueda medirse y cuya intensidad se relacione (p. ej., sea proporcional) con la cantidad de productos de amplificación en la muestra que se analiza.

La asociación entre el oligonucleótido y el agente de detección puede ser covalente o no covalente. Las sondas de detección marcadas se pueden preparar mediante la incorporación de, o conjugación con, un resto detectable. Los marcadores se pueden unir directamente a la secuencia de ácido nucleico o indirectamente (p. ej., a través de un conector). Los conectores o brazos espaciadores de varias longitudes son conocidos en la técnica y están disponibles comercialmente, y pueden seleccionarse para reducir el impedimento estérico, o para conferir otras propiedades útiles o deseadas a las moléculas marcadas resultantes (ver, por ejemplo, E. S. Mansfield y col., *Mol. Cell. Probes*, 1995, 9: 145-156).

Los métodos para marcar moléculas de ácido nucleico son bien conocidos en la técnica. Para una revisión de los protocolos de marcaje, técnicas de detección de marcadores y desarrollos recientes en el campo, ver, por ejemplo, L. J. Kricka, *Ann. Clin. Biochem.* 2002, 39: 114-129; R. P. van Gijlswijk y col., *Expert Rev. Mol. Diagn.* 2001, 1: 81-91; y S. Joos y col., *J. Biotechnol.* 1994, 35: 135-153. Los métodos estándar de marcaje de ácidos nucleicos incluyen: incorporación de agentes radiactivos, uniones directas de tintes fluorescentes (L. M. Smith y col., *Nucl. Acids Res.*, 1985, 13: 2399-2412) o de enzimas (B. A. Connolly y O. Rider, *Nucl. Acids Res.*, 1985, 13: 4485-4502); modificaciones químicas de las moléculas de ácido nucleico para permitir la detección mediante inmunquímica o mediante otras reacciones de afinidad (T. R. Broker y col., *Nucl. Acids Res.* 1978, 5: 363-384; E. A. Bayer y col., *Methods of Biochem. Analysis*, 1980, 26: 1-45; R. Langer y col., *Proc. Natl. Acad. Sci. EE.UU.*, 1981, 78: 6633-6637; R. W. Richardson y col., *Nucl. Acids Res.* 1983, 11: 6167-6184; D. J. Brigati y col., *Virology* 1983, 126: 32-50; P. Tchen y col., *Proc. Natl. Acad. Sci. EE.UU.*, 1984, 81: 3466-3470; J. E. Landegent y col., *Exp. Cell Res.* 1984, 15: 61-72; y A. H. Hopman y col., *Exp. Cell Res.* 1987, 169: 357-368); y métodos de marcaje mediados por enzimas, tales como cebado aleatorio, traducción de mellas, PCR y adición de nucleótidos no con transferasa terminal (para una revisión sobre el marcaje enzimático, ver, por ejemplo, J. Temsamani y S. Agrawal, *Mol. Biotechnol.* 1996, 5: 223-232). Los sistemas de marcaje de ácido nucleico desarrollados más recientemente incluyen, pero no se limitan a: ULS (Universal Linkage System), que se basa en la reacción de derivados de cisplatino monoreactivos con la posición N7 de los restos de guanina en el ADN (R. J. Heetebrij y col., *Cytogenet. Cell. Genet.* 1999, 87: 47-52), psoraleno-biotina, que se intercala en ácidos nucleicos y tras la irradiación UV se une covalentemente a las bases de nucleótidos (C. Levenson y col., *Methods Enzymol.* 1990, 184: 577-583; y C. Pfannschmidt y col., *Nucleic Acids Res.* 1996, 24: 1702-1709), derivados de azido fotorreactivo (C. Neves y col., *Bioconjugate Chem.* 2000, 11: 51-55), y agentes alquilantes de ADN (M. G. Sebestyen y col., *Nat. Biotechnol.* 1998, 16: 568-576).

Cualquiera de una amplia variedad de agentes de detección puede usarse en la puesta en práctica de la presente invención. Los agentes de detección adecuados incluyen, pero no se limitan a, diversos ligandos, radionucleidos (tales como, por ejemplo,  $^{32}\text{P}$ ,  $^{35}\text{S}$ ,  $^3\text{H}$ ,  $^{14}\text{C}$ ,  $^{125}\text{I}$ ,  $^{131}\text{I}$ , y similares); tintes fluorescentes (para tintes fluorescentes ilustrativos específicos, ver más abajo); agentes quimioluminiscentes (tales como, por ejemplo, ésteres de acridinio, dioxetanos estabilizados y similares); nanocristales semiconductores fluorescentes inorgánicos espectralmente resolubles (es decir, puntos cuánticos), nanopartículas metálicas (por ejemplo, oro, plata, cobre y platino) o nanogrupos; enzimas (tales como, por ejemplo, las utilizadas en un ELISA, es decir, peroxidasa de rábano picante, beta-galactosidasa, luciferasa, fosfatasa alcalina); marcadores colorimétricos (tales como, por ejemplo, tintes, oro coloidal y similares); marcadores magnéticos (tales como, por ejemplo, Dynabeads<sup>TM</sup>); y biotina, dioxigenina u otros haptenos y proteínas para los cuales se encuentran disponibles antisueros o anticuerpos monoclonales.

En ciertas realizaciones, las sondas de detección de la invención se marcan con fluorescencia. Numerosos residuos de marcaje fluorescente conocidos de una amplia variedad de estructuras químicas y características físicas son adecuados para usar en la puesta en práctica de esta invención. Los tintes fluorescentes adecuados incluyen, pero no se limitan a, fluoresceína y tintes de fluoresceína (p. ej., isotiocianato de fluoresceína o FITC, naftofluoresceína, 4',5'-dicloro-2',7'-dimetoxi-fluoresceína, 6 carboxifluoresceína o FAM), carbocianina, merocianina, tintes de estirilo,

tintes de oxonol, ficoeritrina, eritrosina, eosina, tintes de rodamina (p. ej., carboxitetrametilrodamina o TAMRA, carboxirodamina 6G, carboxi-X-rodamina (ROX), lisamina rodamina B, rodamina 6G, rodamina verde, rodamina roja, tetrametilrodamina o TMR), cumarina y tintes de cumarina (p. ej., metoxicumarina, dialquilaminocumarina, hidroxycumarina y aminometilcumarina o AMCA), tintes verdes de Oregon (p. ej., verde de Oregon 488, verde de Oregon 500, verde de Oregon 514), rojo de Texas, rojo de Texas-X, Spectrum Red.TM., Spectrum Green.TM., tintes de cianina (p. ej., Cy-3.TM., Cy-5.TM., Cy-3.5.TM., Cy-5.5.TM.), tintes Alexa Fluor (p. ej., Alexa Fluor 350, Alexa Fluor 488, Alexa Fluor 532, Alexa Fluor 546, Alexa Fluor 568, Alexa Fluor 594, Alexa Fluor 633, Alexa Fluor 660 y Alexa Fluor 680), tintes BODIPY (p. ej., BODIPY FL, BODIPY R6G, BODIPY TMR, BODIPY TR, BODIPY 530/550, BODIPY 558/568, BODIPY 564/570, BODIPY 576/589, BODIPY 581/591, BODIPY 630/650, BODIPY 650/665), IRDyes (por ejemplo, IRD40, IRD 700, IRD 800) y similares. Para más ejemplos de tintes fluorescentes adecuados y métodos para unir o incorporar tintes fluorescentes en moléculas de ácido nucleico ver, por ejemplo, "The Handbook of Fluorescent Probes and Research Products", 9.ª Ed., Molecular Probes, Inc., Eugene, Oreg. Los tintes fluorescentes, así como los kits de marcaje, están disponibles comercialmente en, por ejemplo, Amersham Biosciences, Inc. (Piscataway, N.J.), Molecular Probes Inc. (Eugene, Oregon), y New England Biolabs Inc. (Beverly, Mass.). Otro método contemplado para analizar el estado de metilación de las secuencias es mediante el análisis del ADN seguido de la exposición a enzimas de restricción sensibles a la metilación; ver por ejemplo, las solicitudes estadounidenses n.º 20130084571 y 20120003634.

Se apreciará que el análisis del estado de metilación según los métodos descritos en la presente memoria permite la determinación precisa de la fuente celular de una molécula de ADN, incluso cuando la mayoría del ADN de la muestra se deriva de una fuente celular diferente. Los presentes inventores han demostrado que son capaces de determinar la fuente celular de un ADN particular incluso cuando su contribución a la cantidad total de ADN en la población es inferior a 1:1000, inferior a 1:5000, 1:10.000 o incluso 1:100.000.

Las enfermedades y afecciones patológicas que implican la muerte celular dan como resultado la liberación de ADN degradado de células moribundas a los fluidos corporales (sangre, plasma, orina, líquido cefalorraquídeo). Por lo tanto, los métodos descritos en la presente memoria pueden usarse para analizar la cantidad de muerte celular de una población celular particular en esos fluidos corporales. La cantidad de muerte celular de una población celular particular puede usarse para diagnosticar un estado patológico particular (p. ej., enfermedad) o afección (p. ej., traumatismo).

Por lo tanto, según otro aspecto de la presente invención, se proporciona un método para la detección de la muerte de un tipo de célula o tejido en un sujeto que comprende determinar si el ADN libre de células comprendido en una muestra de fluido del sujeto se deriva del tipo de célula o tejido, en donde la determinación se efectúa al determinar el estado de metilación de al menos cuatro sitios de metilación en una secuencia continua del ADN libre de células, comprendiendo la secuencia no más de 300 nucleótidos, en donde un estado de metilación de cada uno de los al menos cuatro sitios de metilación en la secuencia continua de la característica de ADN del tipo de célula o tejido es indicativo de muerte del tipo de célula o tejido.

Se apreciará que la muerte de un tipo de célula particular puede asociarse con un estado patológico, p. ej., enfermedad o traumatismo.

La monitorización de la muerte de un tipo de célula particular también puede usarse para monitorizar la eficiencia de un régimen terapéutico que se espera que efectúe la destrucción celular de un tipo de célula específico.

La determinación de la muerte de un tipo de célula específico también puede usarse en el estudio clínico o científico de diversos mecanismos de sujetos sanos o enfermos.

Por lo tanto, por ejemplo, la medición de la muerte de células beta pancreáticas es importante en casos de diabetes, hiperinsulinismo y tumores de células de islotes, y para monitorizar la supervivencia de las células beta después del trasplante de islotes, determinar la eficacia de diversos regímenes de tratamiento usados para proteger las células beta de la muerte, y determinar la eficacia de los tratamientos destinados a provocar la muerte de las células de los islotes en tumores de células de los islotes. Similarmente, el método permite la identificación y cuantificación del ADN derivado de células renales muertas (diagnóstico de insuficiencia renal), neuronas muertas (diagnóstico de lesión cerebral traumática, esclerosis lateral amiotrófica (ELA), accidente cerebrovascular, enfermedad de Alzheimer, enfermedad de Parkinson o tumores cerebrales, con o sin tratamiento); células acinares pancreáticas muertas (diagnóstico de cáncer pancreático o pancreatitis); células pulmonares muertas (diagnóstico de patologías pulmonares que incluyen cáncer de pulmón); adipocitos muertos (diagnóstico de alteración del recambio de grasa), hepatocitos muertos (indicativo de insuficiencia hepática, toxicidad hepática o cáncer de hígado), cardiomiocitos muertos (indicativo de enfermedad cardíaca, o fallo de injerto en el caso de trasplante cardíaco), células musculares esqueléticas muertas (diagnóstico de lesiones musculares y miopatías), oligodendrocitos muertos (indicativo de esclerosis múltiple recurrente, daño de la materia blanca en la esclerosis lateral amiotrófica o glioblastoma).

Según una realización, las secuencias analizadas tienen patrones de metilación que caracterizan la célula normal de interés y no son patrones de metilación que caracterizan una célula enferma (no es por ejemplo un patrón de metilación que caracteriza las células cancerosas de un tipo específico). Las secuencias ilustrativas que pueden analizarse están

comprendidas en las secuencias establecidas en las Id de sec. n.º: 1-1484. Estas secuencias se describen adicionalmente en la presente memoria anteriormente.

5 Como se usa en la presente memoria, el término “diagnosticar” se refiere a determinar la presencia de una enfermedad, clasificar una enfermedad, determinar la gravedad de la enfermedad (grado o estadio), monitorizar la progresión de la enfermedad y la respuesta a la terapia, pronosticar un resultado de la enfermedad y/o las perspectivas de recuperación.

10 El método comprende cuantificar la cantidad de ADN libre de células que está comprendido en una muestra de fluido (p. ej., una muestra de sangre) del sujeto que se deriva de un tipo de célula o tejido. Cuando la cantidad de ADN libre de células derivado del tipo de célula o tejido está por encima de un nivel predeterminado, es indicativo de que hay un nivel predeterminado de muerte celular. Cuando el nivel de muerte celular está por encima de un nivel predeterminado, es indicativo de que el sujeto tiene la enfermedad o estado patológico. La determinación del nivel predeterminado puede llevarse a cabo analizando la cantidad de ADN libre de células presente en una muestra derivada de un sujeto  
15 que se sabe que no tiene la enfermedad/estado patológico. Si el nivel del ADN libre de células derivado de un tipo de célula o tejido asociado con la enfermedad en la muestra de prueba es estadísticamente significativamente mayor que el nivel de ADN libre de células derivado del mismo tipo de célula o tejido en la muestra obtenida del sujeto sano (sujeto no enfermo), es indicativo de que el sujeto tiene la enfermedad. Alternativamente, o adicionalmente, la determinación del nivel predeterminado puede llevarse a cabo analizando la cantidad de ADN libre de células presente  
20 en una muestra derivada de un sujeto que se sabe que tiene la enfermedad. Si el nivel del ADN libre de células derivado de un tipo de célula o tejido asociado con la enfermedad en la muestra de prueba es estadísticamente significativamente similar al nivel del ADN libre de células derivado de un tipo de célula de tejido asociado con la enfermedad en la muestra obtenida del sujeto enfermo, es indicativo de que el sujeto tiene la enfermedad.

25 La gravedad de la enfermedad se puede determinar cuantificando la cantidad de moléculas de ADN que tienen el patrón de metilación específico de una población celular asociada con la enfermedad. La cuantificación de la cantidad de moléculas de ADN que tienen el patrón de metilación específico de un tejido diana puede lograrse usando una curva de calibración producida mediante el uso de números conocidos y variables de células del tejido diana.

30 Según una realización, el método comprende determinar la proporción de la cantidad de ADN libre de células derivado de una célula de interés en la muestra: cantidad de ADN total libre de células.

35 Según otra realización más, el método comprende determinar la relación entre la cantidad de ADN libre de células derivado de una célula de interés en la muestra y la cantidad de ADN libre de células derivado de una segunda célula de interés.

40 Los métodos descritos en la presente memoria también pueden usarse para determinar la eficacia de un agente terapéutico o tratamiento, en donde cuando la cantidad de ADN asociado con una población celular asociada con la enfermedad disminuye después de la administración del agente terapéutico, es indicativo de que el agente o tratamiento es terapéutico.

**Kits** (no forman parte de la invención)

45 Cualquiera de los componentes descritos en la presente memoria puede estar comprendido en un kit. En un ejemplo no limitante, el kit comprende al menos un par de cebadores capaces de amplificar una secuencia de ADN cuyo estado de metilación es indicativo de una enfermedad, como se describió anteriormente en la presente memoria. Según una realización, los cebadores comprenden además secuencias código de barras y/o secuencias que permiten la secuenciación aguas abajo, como se describe adicionalmente en la presente memoria anteriormente. Dichas secuencias de cebadores incluyen, por ejemplo, las establecidas en las Id de sec. n.º: 1485-1496. Según una  
50 realización, cada cebador del par de cebadores está comprendido en un recipiente adecuado. Según otra realización, el kit comprende dos pares de cebadores capaces de amplificar dos secuencias de ADN diferentes cuyo estado de metilación es indicativo de una enfermedad, como se ha descrito anteriormente en la presente memoria. Según otra realización, el kit comprende tres pares de cebadores capaces de amplificar tres secuencias diferentes de ADN cuyo estado de metilación es indicativo de una enfermedad, como se ha descrito anteriormente en la presente memoria.  
55 Según otra realización, el kit comprende cuatro pares de cebadores capaces de amplificar cuatro secuencias de ADN diferentes cuyo estado de metilación es indicativo de una enfermedad, como se ha descrito anteriormente en la presente memoria. Según otra realización, el kit comprende cinco o más pares de cebadores capaces de amplificar las cinco o más secuencias de ADN diferentes cuyo estado de metilación es indicativo de una enfermedad, como se ha descrito anteriormente en la presente memoria.

60 En otro ejemplo no limitante, el kit comprende oligonucleótidos que son capaces de detectar el estado de metilación de al menos cuatro sitios de metilación en una secuencia de ácido nucleico, siendo la secuencia de ácido nucleico no más de 300 pares de bases y comprendiendo al menos cuatro sitios de metilación que se metilan diferencialmente en una primera célula de interés con respecto a una segunda célula que no es idéntica a la primera célula de interés. El  
65 kit puede comprender un oligonucleótido que es capaz de detectar el estado de metilación de los al menos cuatro sitios de metilación en una secuencia de ácido nucleico. El kit puede comprender dos oligonucleótidos que, en

- combinación son capaces de detectar el estado de metilación de los al menos cuatro sitios de metilación en una secuencia de ácido nucleico. El kit puede comprender tres oligonucleótidos que, en combinación, son capaces de detectar el estado de metilación de los al menos cuatro sitios de metilación en una secuencia de ácido nucleico. El kit puede comprender cuatro oligonucleótidos que, en combinación, son capaces de detectar el estado de metilación de los al menos cuatro sitios de metilación en una secuencia de ácido nucleico. Los oligonucleótidos de este aspecto de la presente invención pueden marcarse con un resto detectable como se describe adicionalmente en la presente memoria anteriormente.
- Los componentes adicionales que pueden incluirse en cualquiera de los kits descritos anteriormente incluyen al menos uno de los siguientes componentes: bisulfito (y otros reactivos necesarios para la reacción con bisulfito), una enzima polimerasa, reactivos para la purificación de ADN,  $MgCl_2$ . El kit también puede comprender componentes de reacción para secuenciar las secuencias amplificadas o no amplificadas.
- Los kits también pueden comprender secuencias de ADN que sirven como controles. Por lo tanto, por ejemplo, el kit puede comprender un ADN que tiene la misma secuencia que la secuencia amplificada derivada de un sujeto sano (para servir como control negativo) y/o un ADN que tiene la misma secuencia que la secuencia amplificada derivada de un sujeto que se sabe que tiene la enfermedad que se está investigando (para servir como control positivo).
- Además, los kits pueden comprender cantidades conocidas de ADN de tal manera que se pueda llevar a cabo la calibración y cuantificación del ADN de prueba.
- Los recipientes de los kits generalmente incluirán al menos un vial, tubo de ensayo, matraz, botella, jeringa u otros recipientes, en los que se puede colocar un componente, y preferiblemente se dividen en alícuotas de manera adecuada. Cuando hay más de un componente en el kit, el kit generalmente también contendrá un segundo, tercer u otro recipiente adicional en el que se pueden colocar los componentes adicionales por separado. Sin embargo, varias combinaciones de componentes pueden estar comprendidas en un recipiente.
- Cuando los componentes del kit se proporcionan en una o más soluciones líquidas, la solución líquida puede ser una solución acuosa. Sin embargo, los componentes del kit pueden proporcionarse como polvo(s) seco(s). Cuando los reactivos y/o componentes se proporcionan como un polvo seco, el polvo puede reconstituirse mediante la adición de un disolvente adecuado.
- Un kit incluirá preferiblemente instrucciones para el uso de los componentes del kit, así como para el uso de cualquier otro reactivo no incluido en el kit. Las instrucciones pueden incluir variaciones que pueden implementarse.
- Se espera que durante la vida de una patente madurada a partir de esta solicitud se desarrollen muchas tecnologías de secuenciación relevantes (incluidas las que podrán determinar el estado de metilación, sin tratamiento con bisulfito) y se pretende que dentro del alcance del término secuenciación se encuentren *a priori* todas estas nuevas tecnologías.
- Como se usa en la presente memoria, el término “aproximadamente” se refiere a  $\pm 10\%$ .
- Los términos “comprende”, “que comprende”, “incluye”, “que incluye”, “que tiene” y sus conjugados significan “que incluye pero no se limita a”.
- El término “que consiste en” significa “que incluye y se limita a”.
- El término “que consiste esencialmente en” significa que la composición, método o estructura puede incluir ingredientes, etapas y/o partes adicionales, pero solo si los ingredientes, etapas y/o partes adicionales no alteran materialmente las características básicas y novedosas de la composición, método o estructura reivindicada.
- Como se usa en la presente memoria, la forma singular “un”, “una” y “el/la” incluyen referencias en plural a menos que el contexto indique claramente lo contrario. Por ejemplo, el término “un compuesto” o “al menos un compuesto” puede incluir una pluralidad de compuestos, que incluyen mezclas de los mismos.
- A lo largo de esta solicitud, varias realizaciones de esta invención pueden presentarse en un formato de intervalo. Debe entenderse que la descripción en formato de intervalo es simplemente por conveniencia y brevedad y no debe interpretarse como una limitación inflexible del alcance de la invención. Por consiguiente, se debe considerar que la descripción de un intervalo ha descrito específicamente todos los posibles subintervalos, así como los valores numéricos individuales dentro de ese intervalo. Por ejemplo, se debe considerar que la descripción de un intervalo tal como de 1 a 6 ha descrito específicamente subintervalos tales como de 1 a 3, de 1 a 4, de 1 a 5, de 2 a 4, de 2 a 6, de 3 a 6, etc., así como los números individuales dentro de ese intervalo, por ejemplo, 1, 2, 3, 4, 5 y 6. Esto se aplica independientemente de la amplitud del intervalo.
- Como se usa en la presente memoria, el término “método” se refiere a maneras, medios, técnicas y procedimientos para realizar una tarea determinada que incluyen, pero no se limitan a, esas maneras, medios, técnicas y

procedimientos conocidos o desarrollados fácilmente a partir de maneras, medios, técnicas y procedimientos conocidos por los profesionales de las artes químicas, farmacológicas, biológicas, bioquímicas y médicas.

Como se usa en la presente memoria, el término “tratar” incluye suprimir, inhibir sustancialmente, ralentizar o revertir la progresión de una afección, mejorar sustancialmente los síntomas clínicos o estéticos de una afección o prevenir sustancialmente la aparición de síntomas clínicos o estéticos de una afección.

Se comprenderá que ciertas características de la invención, que, para mayor claridad, se describen en el contexto de realizaciones separadas, también pueden proporcionarse en combinación en una sola realización. Por el contrario, diversas características de la invención, que, por brevedad, se describen en el contexto de una única realización, también pueden proporcionarse por separado o en cualquier subcombinación adecuada o según sea adecuado en cualquier otra realización descrita de la invención. Ciertas características descritas en el contexto de diversas realizaciones no deben considerarse características esenciales de esas realizaciones, a menos que la realización no funcione sin esos elementos.

Diversas realizaciones y aspectos de la presente invención como se define anteriormente y como se reivindica en la sección de reivindicaciones a continuación encuentran soporte experimental en los siguientes ejemplos.

#### Ejemplos

Ahora se hace referencia a los siguientes ejemplos, que junto con las descripciones anteriores ilustran algunas realizaciones de la invención de manera no limitativa.

Generalmente, la nomenclatura usada en la presente memoria y los procedimientos de laboratorio utilizados en la presente invención incluyen técnicas moleculares, bioquímicas, microbiológicas y de ADN recombinante. Dichas técnicas se explican minuciosamente en la bibliografía. Ver, por ejemplo, “Molecular Cloning: A laboratory Manual” Sambrook y col., (1989); “Current Protocols in Molecular Biology” Volúmenes I-III Ausubel, R. M., ed. (1994); Ausubel y col., “Current Protocols in Molecular Biology”, John Wiley and Sons, Baltimore, Maryland (1989); Perbal, “A Practical Guide to Molecular Cloning”, John Wiley & Sons, Nueva York (1988); Watson y col., “Recombinant DNA”, Scientific American Books, Nueva York; Birren y col. (eds.) “Genome Analysis: A Laboratory Manual Series”, Vols. 1-4, Cold Spring Harbor Laboratory Press, Nueva York (1998); metodologías como se establece en las patentes estadounidenses n.º 4.666.828; 4.683.202; 4.801.531; 5.192.659 y 5.272.057; “Cell Biology: A Laboratory Handbook”, Volúmenes I-III Cellis, J. E., ed. (1994); “Culture of Animal Cells - A Manual of Basic Technique” por Freshney, Wiley-Liss, N. Y. (1994), Tercera Edición; “Current Protocols in Immunology” Volúmenes I-III Coligan J. E., ed. (1994); Stites y col. (eds.), “Basic and Clinical Immunology” (8.ª edición), Appleton & Lange, Norwalk, CT (1994); Mishell and Shiigi (eds.), “Selected Methods in Cellular Immunology”, W. H. Freeman and Co., Nueva York (1980); los inmunoensayos disponibles se describen ampliamente en la literatura científica y de patentes, ver, por ejemplo, las patentes estadounidenses n.º 3.791.932; 3.839.153; 3.850.752; 3.850.578; 3.853.987; 3.867.517; 3.879.262; 3.901.654; 3.935.074; 3.984.533; 3.996.345; 4.034.074; 4.098.876; 4.879.219; 5.011.771 y 5.281.521; “Oligonucleotide Synthesis” Gait, M. J., ed. (1984); “Nucleic Acid Hybridization” Hames, B. D., y Higgins S. J., eds. (1985); “Transcription and Translation” Hames, B. D., y Higgins S. J., eds. (1984); “Animal Cell Culture” Freshney, R. I., ed. (1986); “Immobilized Cells and Enzymes” IRL Press, (1986); “A Practical Guide to Molecular Cloning” Perbal, B., (1984) y “Methods in Enzymology” Vol. 1-317, Academic Press; “PCR Protocols: A Guide To Methods And Applications”, Academic Press, San Diego, CA (1990); Marshak y col., “Strategies for Protein Purification and Characterization - A Laboratory Course Manual” CSHL Press (1996). Se proporcionan otras referencias generales a lo largo de este documento. Se cree que los procedimientos descritos en la presente memoria son bien conocidos en la técnica y se proporcionan para comodidad del lector.

#### Materiales y Métodos

**Pacientes:** Todos los estudios clínicos contaron con la aprobación de los comités de ética local pertinentes, y se obtuvo el consentimiento informado de todos los sujetos o sus tutores legales antes de la toma de muestras de sangre.

1. Pacientes recientemente diagnosticados con T1D: se preparó plasma de 11 pacientes (edades 4-20, media 9,5 años) que fueron diagnosticados con T1D 1-4 meses antes.

2. Receptores de injerto de islotes: Los pacientes tenían 44-57 años de edad, padecían de T1D desde hacía 10-36 años y tenían niveles de glucosa en sangre mal controlados (HbA1C 6,4-10). La terapia contra el rechazo incluyó Alemtuzumab, Etanercept y Anakinra. La terapia de mantenimiento incluyó tacrolimus y MMF.

3. Pacientes con EM/NMO: Los pacientes con EM y NMO se diagnosticaron según los criterios de McDonald 2010 (1) y los criterios de diagnóstico de NMO respectivamente (2). Las características de los pacientes fueron las siguientes: Pacientes con EM con recaídas y remisiones, n = 49, 74 % mujeres, edad promedio = 36±12,5, intervalo 18-68 años, duración de la enfermedad 4±4,5 años, intervalo de 0-14 años. Escala ampliada del estado de discapacidad (EDSS) = 2,8 ±1,8, intervalo 1-7,5. Ninguno de los pacientes había recibido tratamiento con esteroides

durante 2 meses antes de la prueba. En los pacientes en recaída, se extrajo sangre antes de la terapia con esteroides IV. En el momento de la toma de muestras, se trató un paciente con Coxona y 4 con Imuran.

4. Pacientes con paro cardíaco: las muestras se recogieron en la unidad de cuidados intensivos (UCI) del Hospital Universitario de Uppsala, Suecia. Los pacientes inconscientes con paro cardíaco se reanimaron con el retorno de la circulación espontánea (ROSC). Se administraron inmediatamente después de la reanimación un tratamiento de hipotermia a una temperatura corporal de 32-34 °C durante 24 h, ventilación y soporte farmacológico, como se describe (Mörtberg E et al., Resuscitation 2011;82:26-31). Los pacientes se definieron como comatosos si (i) no estaban despiertos, (ii) no seguían ninguna orden, y (iii) no respondían a ningún estímulo. Todos los pacientes recibieron un catéter arterial en la arteria radial o femoral para extraer muestras de sangre. Se recogieron muestras de sangre en serie, comenzando tan pronto como fue posible en la fase de emergencia y continuando a las 24, 48, 72, 96 y 108 horas después del paro cardíaco. Las alícuotas de suero se congelaron a -70 °C hasta el análisis.

5. Lesión cerebral traumática: 5 pacientes (3 hombres y 2 mujeres, todos caucásicos, con una edad promedio de 39 años) con lesión cerebral traumática (LCT) grave se inscribieron en un estudio clínico en la unidad de cuidados intensivos neurológicos (UCIN) del Hospital Universitario de Sahlgrenska, Gothenburg, Suecia. Todos los pacientes tenían una mezcla de contusiones focales y edema general. Todos tenían LCT grave según los siguientes criterios: 1) escala de nivel de reacción (RLS) 4, correspondiente a una puntuación de 8 en la escala de coma de Glasgow (3 = no responde, 15 = despierto) (3); 2) necesitaban tratamiento con ventilador; 3) monitorización de la presión intracraneal (ICP). Se tomaron muestras de sangre venosa en días consecutivos después del trauma. Después de las evaluaciones clínicas y radiológicas, los pacientes se sometieron a una intervención neuroquirúrgica horas después de la admisión, para recibir un catéter ventricular permanente para la monitorización de la presión intracraneal (ICP)/drenaje terapéutico del LCR. Cuando fue apropiado, se extirparon quirúrgicamente lesiones ocupantes de espacio como hemorragias y contusiones. A continuación, los pacientes se trataron según un protocolo estandarizado: “el concepto de Lund”, con el objetivo de mantener la presión de perfusión cerebral por encima de 60 mm Hg y la presión intracraneal por debajo de 20 mm Hg (4). Los datos recopilados incluyeron variables demográficas y clínicas tales como edad, sexo y momento de la lesión. Las variables fisiológicas y de laboratorio se registraron continuamente durante todo el período de estudio y se ajustaron simultáneamente para permanecer dentro de los siguientes límites: hemoglobina >120 g/l, sodio en suero >135 a <150 mmol/l, potasio en suero >4,0 a <5,0 mmol/l, albúmina en suero >35 a <50 g/l, temperatura central 37 ±0,5 °C, presión arterial media (MABP) entre 70 y 100 mm Hg, PIC <20 mm Hg, presión de perfusión cerebral PPC (MABP - PIC) >60 mm Hg, PO<sub>2</sub> >12 a <18 kPa, PCO<sub>2</sub> alrededor de 4,5 kPa y pH normalizado. La glucosa en sangre se mantuvo entre 4 y 6 mmol/l según la rutina de la UCIN. Ningún paciente recibió esteroides.

6. Cáncer pancreático y pancreatitis crónica: se preparó plasma de 42 pacientes con adenocarcinoma pancreático patológicamente confirmado (28 hombres y 14 mujeres; edad promedio: 68 años, intervalo: 41-87) y 10 pacientes con pancreatitis crónica. Se utilizó la estadificación TNM del cáncer de páncreas del Comité Conjunto Estadounidense sobre el Cáncer (2010). En el momento de la recolección de plasma, 29 pacientes tenían una enfermedad localizada (4 en el estadio I y 25 en el estadio II, todos preoperatorios) y 13 pacientes tenían una enfermedad metastásica, estadio IV.

7. Controles sanos: Un total de 40 individuos sanos (50 % mujeres; edades: 22 a 60) se ofrecieron como voluntarios para participar en el estudio como controles sanos no pagados. Todos negaron tener algún signo de síntomas relacionados con el estado patológico estudiado.

**Procesamiento de ADN**: se aisló ADN libre de células de plasma o suero usando un kit (Qiaquick, Qiagen), y se trató con bisulfito (Zymo research). El ADN tratado con bisulfito se amplificó por PCR, usando cebadores específicos para el ADN tratado con bisulfito pero independientes del estado de metilación en los sitios CpG monitorizados. Los cebadores tenían códigos de barras, lo que permitió mezclar muestras de diferentes individuos cuando se secuenciaron productos usando MiSeq (Illumina).

**Metiloma de células acinares y ductales pancreáticas** Se aislaron células ductales y acinares de páncreas humano cadavérico disociado, como se ha descrito anteriormente. Las células vivas se tiñeron con marcadores de superficie celular y se clasificaron. El ADN genómico se aisló usando fenol/cloroformo y se procesó para matrices Illumina 450k según las instrucciones del fabricante.

Insulina

Secuencias de cebadores: Id de sec. n.º: 1485 y 1486

MBP3

Secuencias de cebadores: Id de sec. n.º: 1495 y 1496

CG10809560 (WM1)

Secuencias de cebadores: Id de sec. n.º: 1491 y 1492

CG09787504

5 Secuencias de cebadores: Id de sec. n.º: 1493 y 1494

Páncreas (CUX2)

10 Secuencias de cebadores: Id de sec. n.º: 1487 y 1488

Páncreas (REG1A)

Secuencias de cebadores: Id de sec. n.º: 1489 y 1490

15 **Análisis estadístico:** Para evaluar la importancia de las diferencias entre los grupos se usó una prueba de Man Whitney bilateral, basada en los valores del ADN específico de tejido no metilado en cada paciente.

Ejemplo 1

20 Identificación de marcadores de metilación específicos de tejido

25 Los presentes inventores identificaron marcadores de metilación del ADN específicos de tejido, distinguiendo los tejidos individuales o tipos de células de otros tejidos. Se prestó especial atención a los marcadores que diferencian entre un tejido de interés y las células hematopoyéticas, que se cree que son el principal contribuyente del ADNc y, por lo tanto, la principal fuente potencial de ruido en el sistema. Se analizaron metilomas disponibles públicamente (principalmente datos de la matriz Illumina 450k del proyecto El Atlas del Genoma del Cáncer [TCGA] y la base de datos Gene Expression Omnibus [GEO]) para identificar dinucleótidos de CpG individuales con patrones de metilación diferenciales, no metilados específicamente en un tejido y metilados en cualquier otro sitio (ver el esquema del procedimiento, Figuras 5A-B).

30 Las matrices de Illumina proporcionan información sobre el estado de metilación de dinucleótidos de CpG individuales. El poder discriminatorio de cada sitio es limitado, ya que puede metilarse aleatoriamente o no metilado en una pequeña fracción de moléculas de tejidos donde típicamente no se metila o se metila, respectivamente. Para aumentar la relación señal/ruido del ensayo, los presentes inventores aprovechan la naturaleza regional de la metilación del ADN. Definieron una “ventana ampliada” de 4-9 sitios CpG adyacentes al sitio del marcador CpG original, deduciendo que las posibilidades para la metilación o desmetilación accidental de múltiples citosinas adyacentes en la misma molécula son pequeñas. Para determinar el estado de metilación de estas ventanas ampliadas, obtuvieron ADN de diferentes tejidos humanos y lo trataron con bisulfito para convertir citosinas no metiladas en uracilos. Los fragmentos cortos que contenían el sitio CpG característico y múltiples CpG adyacentes se amplificaron por PCR, y se secuenciaron múltiples moléculas del producto de PCR usando Illumina MiSeq.

45 Como un enfoque alternativo para las comparaciones entre matrices de metiloma Illumina, en algunos casos los presentes inventores seleccionaron y validaron marcadores específicos de tejido basados en promotores de genes específicos de tejido conocidos (que podrían no representarse adecuadamente en las matrices de Illumina) (Figuras 5A-B). Como se muestra en los ejemplos siguientes, la puntuación de las moléculas de ADN en las que múltiples sitios CpG adyacentes comparten el mismo patrón de metilación específico de tejido proporcionó un poder discriminatorio significativamente más elevado entre el tejido de interés y otros tejidos, en comparación con el contenido de información de sitios CpG individuales. Por lo tanto, los presentes inventores han definido secuencias cortas de ADN, que contienen 4-9 sitios CpG, cuyo estado de metilación combinado constituye una firma epigenética única para un tejido de interés en relación con las células sanguíneas y otros tejidos.

50 Ejemplo 2

55 Presencia del promotor del gen de la insulina no metilado en la circulación de pacientes con T1D

60 Para detectar el ADNc derivado de células beta, se usó el promotor del gen de la insulina como un marcador de metilación específico de la célula beta. Estudios anteriores que buscan identificar ADN derivado de células beta en muestras de sangre periférica han utilizado la PCR específica de metilación basada en el estado de metilación de 2-3 dinucleótidos de CpG en el promotor de la insulina (J y col., Diabetes 62, 1676-1680 (2013)). Sin embargo, el promotor de la insulina contiene sitios CpG adicionales muy próximos, que pueden usarse para mejorar la distinción entre el ADN de las células beta y el de otros tejidos (Figura 1A). Para analizar este concepto, se amplificó un fragmento de 160 pb del promotor del gen de la insulina a partir de ADN tratado con bisulfito obtenido de múltiples tejidos, y el producto se secuenció para determinar el estado de metilación de cada CpG en cada tejido. Como se muestra en la Figura 1B, cada CpG no estaba metilado en el 90-95 % de las moléculas de ADN de las células beta humanas, ni en el 5-15 % de las moléculas de ADN de otros tejidos. Sin embargo, cuando esta información se combinó y se calculó la fracción de moléculas de ADN en las que los 6 sitios CpG no estaban metilados, la diferencia entre las células beta

y todos los demás tejidos se volvió significativamente mayor: mientras que -80 % de las moléculas de ADN de la célula beta estaban completamente no metiladas, <0,01 % de las moléculas de cualquier otro tejido estaban completamente no metiladas. Por lo tanto, un tramo de 6 sitios CpG no metilados adyacentes en el promotor del gen de la insulina (comprendido en la Id de sec. n.º: 1241) distingue poderosamente las células beta de otros tejidos con una relación señal/ruido cercana a 10.000:1.

A continuación, esta información se usó para buscar ADNlc derivado de células beta en la circulación de pacientes con T1D. El ADN plasmático de pacientes se trató con bisulfito, se amplificó por PCR y se secuenció para determinar la fracción de moléculas que contenían ADN promotor de la insulina completamente no metilado. La fracción obtenida se multiplicó por la concentración de ADNlc medido en cada muestra, para obtener un valor de ADN derivado de células beta (ng/ml) que circulaba en la sangre de cada paciente (Figuras 5A-B). El ADNlc de voluntarios sanos (n = 25) tuvo una frecuencia extremadamente baja de moléculas del promotor del gen de la insulina completamente no metiladas (hasta 0,12 % de los fragmentos del promotor de la insulina circulante). Cuando se multiplicó por la cantidad total de ADNlc en cada individuo, se encontró que <0,06 ng/ml de ADN circulante derivaba de células beta (equivalentes a 10 genomas), lo que corresponde a una tasa muy baja de recambio de células beta en adultos sanos (Figura 1C). El plasma de pacientes con T1D (n = 11) muestreado 2-16 semanas después del diagnóstico mostró una clara señal de ADN promotor de la insulina no metilado en ADNlc (1,06-8,6 ng de ADN de células beta por 1 ml de plasma), indicativo de la destrucción autoinmunitaria continua de células beta (Figura 1C).

También se estudiaron muestras de plasma tomadas de pacientes con T1D de larga data que se sometieron a trasplante de islotes alogénicos cadavéricos y se trataron con supresores inmunitarios. Como se muestra en la Figura 1D, el plasma de todos los pacientes tenía una señal elevada (ADN no metilado de insulina) 1-2 horas después del trasplante, que disminuyó significativamente en las horas y días siguientes. La gran pérdida de células beta injertadas inmediatamente después del trasplante, posiblemente resultante de una isquemia aguda, es coherente con un estudio previo de imágenes de un paciente sometido a trasplante. En la mayoría de los pacientes, las señales claramente por encima del fondo se detectaron a los 7 días e incluso 1 mes después del trasplante, lo que sugiere una pérdida continua y de bajo nivel de células beta a pesar de la supresión inmunitaria.

Para confirmar que el patrón de metilación combinado de múltiples sitios CpG en el promotor del gen de la insulina era necesario para detectar el ADN derivado de células beta en la circulación, se examinó el estado de metilación de cada CpG individual en el plasma de

individuos sano y pacientes recientemente diagnosticados con T1D. Cada CpG individual no tenía un patrón diferente en el plasma de controles sanos y pacientes con T1D (no estaban metilados en 224 -15 % de las moléculas de ADNlc). Sin embargo, en conjunto, los 6 sitios CpG produjeron una señal clara en el plasma de pacientes con T1D, ausente en los controles sanos (Figuras 6A-B).

Estos resultados respaldan la sensibilidad y especificidad muy altas de este método basado en secuenciación de próxima generación (NGS) para la detección de ADNlc derivado de tejidos específicos. Con respecto a la T1D, la separación completa entre la señal en los controles sanos y los pacientes recientemente diagnosticados se comparó favorablemente con los informes anteriores, que mostraban una superposición significativa de la señal entre los controles sanos y los pacientes diabéticos. Esto sugiere que puede ser posible usar este ensayo para identificar la muerte de las células beta antes del diagnóstico clínico, así como también en entornos adicionales de interés, tales como la monitorización de la eficacia de la supresión inmunitaria usada para prevenir la destrucción de células beta trasplantadas.

### Ejemplo 3

#### Identificación de ADNlc derivado de oligodendrocitos en esclerosis múltiple

La detección no invasiva de la muerte de células cerebrales es particularmente difícil. En teoría, se pueden usar patrones de metilación específicos para el cerebro para identificar el ADNlc derivado del cerebro. Los presentes inventores buscaron evidencia de ADN de oligodendrocitos/glial circulando en la sangre de pacientes con esclerosis múltiple (EM) y neuromielitis óptica (NMO), enfermedades autoinmunitarias en las que se destruyen oligodendrocitos productores de mielina en la materia blanca y astrocitos. Se analizó el metiloma publicado de materia blanca humana normal y se identificaron grupos de sitios CpG adyacentes en la UTR en 3' de la proteína básica de mielina (denominada aquí MBP3) y alrededor de un locus no anotado (CG10809560 en la matriz de Illumina, que se denominó WM1 para materia blanca 1) que no estaban metilados selectivamente en los oligodendrocitos (Figura 2A). Al igual que con el promotor del gen de la insulina, los CpG individuales en estos grupos mostraron una relación de señal a ruido moderada: no estaban metilados en un 60-85 % de las moléculas de ADN derivadas de fuentes ricas en oligodendrocitos (PREP en células gliales, materia blanca y cerebro completo), y en el 2-35 % de ADN de otros tejidos (Figuras 7A-E y 8A-E). La combinación de todos los CpGs en los loci de MBP3 y WM1 aumentó en gran medida la discriminación entre ADN enriquecido de oligodendrocitos y ADN de otras fuentes que incluyen la sangre (Figuras 7A-E y 8A-E). Por lo tanto, el ADN de los loci de MBP3 (comprendido en la Id de sec. n.º: 1248) o WM1 (comprendido en la Id de sec. n.º: 1247) no metilados en todos los sitios CpG adyacentes puede servir como un marcador exclusivo de oligodendrocitos.

Los individuos sanos ( $n = 19$ ) tenían niveles insignificantes de *MBP3* o *WM1* no metilados en su plasma, lo que sugiere un recambio basal mínimo de oligodendrocitos (Figura 2B). La mayoría de los pacientes con EM estable ( $n = 30$ ) no tenían una señal o la señal era muy baja. Sin embargo, la mayoría de los pacientes durante la exacerbación de la enfermedad (una recaída documentada tanto clínicamente como usando la IRM cerebral cerca del momento del muestreo,  $n = 19$ ) mostraron en su plasma ADN no metilado de ya sea *MBP3* o *WM1*, o de ambos (Figura 2B). Esta observación es coherente con la noción de que el ADN de *MBP3* o *WM1* no metilado circulante de corta duración refleja muerte aguda de células de oligodendrocitos. El análisis inicial no reveló correlaciones clínicas con la falta de señal en algunos pacientes en recaída. No se observó correlación entre la señal en sangre y la edad, sexo, EDSS (Escala ampliada del estado de discapacidad) o duración de la enfermedad. Estos resultados indican que la destrucción autoinmunitaria aguda de los oligodendrocitos puede manifestarse como un aumento de los niveles circulantes de fragmentos de ADN completamente no metilados de los loci de *MBP3* o *WM1*, lo que proporciona la base para el desarrollo de una prueba sensible para el diagnóstico y monitorización de enfermedades desmielinizantes. Se puede desarrollar marcadores de metilación adicionales de oligodendrocitos para aumentar aún más la especificidad y sensibilidad del ensayo.

#### Ejemplo 4

##### Identificación de ADNlc derivado del cerebro después de daño cerebral agudo

Para obtener un marcador más general para la lesión cerebral, las matrices de Illumina se analizaron en busca de loci cuyo estado de metilación distinguiera el ADN cerebral del de otros tejidos. Un grupo de 9 sitios CpG alrededor del locus CG09787504 (denominado aquí Cerebro1; comprendido en la Id de sec. n.º: 1251) estaba completamente no metilado en el 70 % de ADN de varias fuentes de tejido cerebral (enriquecido de neuronas o glía), y en <5 % de moléculas de ADN de otros tejidos (lo que posiblemente refleja el ADN de neuronas periféricas presentes en estos tejidos). Es importante destacar que <0,03 % de las moléculas en la sangre no estaban metiladas, lo que proporciona una diferencia >2000 veces en la metilación de este locus entre el cerebro y la sangre (Figura 3A y Figuras 9A-E).

Los individuos sanos tenían niveles extremadamente bajos de Cerebro1 completamente no metilado en el plasma (Figura 3B). Esta línea de base baja puede reflejar ya sea un recambio neuronal por debajo del límite de sensibilidad del ensayo o un mecanismo alternativo para el aclaramiento del ADN de las células cerebrales que mueren. Se examinaron muestras de plasma de pacientes en dos entornos de daño cerebral, ambos conocidos por implicar lesiones neuronales en combinación con la interrupción de la barrera hematoencefálica. Sorprendentemente, los pacientes ( $n=10$ ) a los que se tomó muestras en múltiples puntos de tiempo después del paro cardíaco con daño cerebral isquémico documentado mostraron altos niveles de Cerebro1 no metilado en plasma (Figura 3C). Similarmente, los pacientes ( $n=5$ ) hospitalizados en una unidad de cuidados intensivos por neurotrauma después de una lesión cerebral traumática (TBI) grave presentaban niveles elevados de Cerebro1 no metilado en plasma (Figura 3D). Ambos conjuntos de resultados son coherentes con los fragmentos de ADN circulantes derivados de células cerebrales muertas (neuronas y/o glía) en estos pacientes. La cantidad y los patrones temporales de ADNlc derivado del cerebro variaron entre pacientes. En el grupo con paro cardíaco, las señales más fuertes se observaron en el primer punto de tiempo, poco después de la reanimación, con una disminución en los días posteriores en la mayoría de los pacientes. En el grupo de pacientes con TBI, se observó un patrón más retrasado de ADNlc derivado del cerebro. Estos hallazgos indican que el ADN específico del cerebro, así como también el ADN específico de los oligodendrocitos, pueden identificarse en la circulación de pacientes con patologías cerebrales neuroinflamatorias, traumáticas e isquémicas, basándose en marcadores de metilación únicos.

#### Ejemplo 5

##### Identificación de ADNlc derivado de páncreas exocrino en cáncer pancreático y pancreatitis

Los presentes inventores sometieron a prueba el enfoque para determinar si se puede usar para detectar ADNlc en el contexto de cáncer. Si bien los tumores presentan grandes cambios en el metiloma en comparación con el tejido normal, se cree que la mayoría de los sitios de metilación específicos de tejido permanecen intactos en los tumores. Por lo tanto, la muerte celular en tumores debe dar lugar a ADNlc que porta los patrones de metilación normales del tejido de origen del tumor. Se cree que el adenocarcinoma ductal pancreático se origina a partir de células acinares o ductales en el páncreas exocrino. Se usaron anticuerpos para las células ductales y acinares purificadas por FACS provenientes de material humano cadavérico, y sus metilomas se obtuvieron usando matrices Illumina 450k (resultados no publicados). El análisis de estos datos reveló múltiples CpG que no se metilaban en el páncreas exocrino y se metilaban en la mayoría de los otros tejidos. Se seleccionaron dos sitios para análisis adicionales y se identificaron grupos de CpG adyacentes que podrían usarse como marcadores para el páncreas exocrino y que podrían distinguir las células acinares y ductales de los otros tipos de células (Figura 4A, Figuras 10A-E y 11A-E). Los sujetos sanos ( $n = 25$ ) tenían niveles muy bajos de marcadores de páncreas exocrino no metilados en su ADNlc, coherente con un bajo recambio de este tejido (Figura 4B). Casi la mitad de los pacientes con cáncer pancreático (20 de 42) mostraron ADNlc derivado de páncreas exocrino por encima del nivel de fondo (Figura 4C). Se observó una tendencia a una señal más fuerte en pacientes con enfermedad avanzada, y estos pacientes tenían más probabilidades de mostrar una señal por encima del nivel de fondo. No obstante, algunos pacientes en los estadios 1

y 2 (enfermedad localizada) tenían una señal clara (11 de 29), lo que sugiere que este método puede, en principio, identificar la muerte celular en el cáncer pancreático en un estadio resecable.

Para probar aún más la hipótesis de que todas las etiologías de la muerte celular conducen a aumentos en el ADNc específico de tejido, se examinó el plasma de pacientes con pancreatitis crónica. De hecho, 7 de 10 pacientes con esta enfermedad no maligna tenían niveles elevados de ADNc derivado de páncreas (Figura 4C). Se observó que los pacientes con pancreatitis tenían una señal más clara con un marcador (REG1A) que no estaba metilado tanto en las células acinares como en las ductales, mientras que los pacientes con cáncer pancreático tenían una señal más fuerte con un marcador (CUX2) que estaba preferiblemente no metilado en células ductales, lo que potencialmente refleja la identidad epigenética de células moribundas en cada patología. En resumen, el ADNc que porta patrones de metilación del páncreas exocrino está presente en la sangre de pacientes con cáncer pancreático y pancreatitis, lo que refleja la muerte de células exocrinas en estas afecciones.

#### Ejemplo 6

Identificación del ADN derivado del cerebro en el plasma de pacientes con ELA

En la enfermedad neurodegenerativa de esclerosis lateral amiotrófica (ELA), las neuronas motoras mueren, seguidas de la muerte de las células musculares. Los presentes inventores realizaron un ensayo para determinar si se podían identificar fragmentos de ADN derivados del cerebro en la circulación de pacientes con ELA. Como se muestra en la Figura 12, el 40 % de los pacientes con ELA (n = 29) mostraron niveles medibles de ADN derivado del cerebro en su plasma (basados en la fracción de CG0978 no metilado [Cerebro1], multiplicado por la cantidad total de ADN libre de células en su plasma), en comparación con la señal cercana a cero en individuos sanos (n = 12). Además, los presentes inventores observaron la presencia de ADN glial en el plasma de pacientes con ELA. La Figura 13 muestra que el 70 % de los pacientes con ELA analizados (n = 10) tenían en su plasma al menos dos marcadores gliales (WM1 y MBP3), en comparación con ninguna señal en individuos sanos. Estos hallazgos son coherentes con informes clínicos sobre daños a la materia blanca en pacientes con ELA. En el análisis preliminar, los presentes inventores también identificaron ADN muscular en la sangre de pacientes con ELA (datos no mostrados). Por lo tanto, el ensayo puede usarse para detectar y monitorizar la muerte de células neuronales, gliales y musculares en pacientes con ELA, con fines de diagnóstico, monitorización de la progresión de la enfermedad y evaluación de la actividad del fármaco.

#### Ejemplo 7

Identificación del ADN glial en el plasma de pacientes con glioblastoma

El glioblastoma se origina en las células gliales. Los presentes inventores examinaron el plasma de pacientes con glioblastoma para detectar la presencia de ADN glial (fragmentos no metilados de WM1 o MBP3). Se encontró que el 30 % de los pacientes con glioblastoma analizados (n = 10) tenían una señal clara por encima del nivel mínimo en individuos sanos. Por lo tanto, el método puede usarse para identificar y monitorizar la muerte celular en glioblastomas.

#### Ejemplo 8

Identificación de ADN epitelial de colon en plasma de pacientes con cáncer de colon o enfermedad de Crohn

Los presentes inventores identificaron varios marcadores de ADN de colon, todos tenían un grupo no metilado de CpG en el colon que no estaba metilado en otros tejidos. La distribución tisular de las moléculas no metiladas se muestra en las Figuras 14A-D.

A continuación, los presentes inventores determinaron si estos marcadores están presentes en el plasma de pacientes con enfermedades de colon. Como se muestra en la Figura 15, los individuos sanos (n = 8) tenían niveles muy bajos de ADN no metilado de cualquiera de los cuatro marcadores. Esto es coherente con la idea de que las células que mueren durante el recambio normal del colon se desprenden hacia el lumen y su ADN no alcanza la circulación. Por el contrario, la mayoría de los pacientes con cáncer de colon tenían niveles elevados de uno a cuatro de los marcadores de colon en su plasma. Este hallazgo es coherente con la muerte extensa de las células de cáncer de colon y la liberación de su ADN en la circulación, como se muestra previamente usando la identificación de mutaciones específicas de tumor en la sangre. Un solo paciente con enfermedad de Crohn que se analizó también dio positivo para un marcador de colon, lo que sugiere una extensa muerte patológica de las células de colon y la liberación de ADN en la sangre.

Por lo tanto, el método puede identificar ADN de colon en la sangre de pacientes con cáncer de colon o enfermedad de Crohn. Nótese que, si bien los métodos existentes para la detección de cáncer de colon usando sangre se basan en mutaciones somáticas específicas del paciente, el presente método es universal ya que se basa en marcadores de colon que se conservan entre individuos y aparentemente permanecen estables incluso en el cáncer.

Ejemplo 9

Identificación del ADN pulmonar en plasma de pacientes con cáncer de pulmón

Los presentes inventores identificaron y validaron varios marcadores de células pulmonares, que no estaban metilados en el ADN del epitelio pulmonar pero estaban metilados en otros tejidos, y analizaron sus niveles en el plasma de individuos sanos y en el plasma de pacientes con cáncer de pulmón.

La Figura 16 muestra la distribución tisular del SFTP/A1 no metilado, un gen que se expresa específicamente en células pulmonares y tampoco se metila específicamente en el pulmón. Se encontró que SFTP/A1 no metilado no existe en el plasma de la mayoría de los individuos sanos, pero está presente en el plasma de la mayoría de los pacientes con cáncer de pulmón.

La Figura 17 muestra la distribución tisular del SFTP/C no metilado, otro gen que se expresa específicamente en células pulmonares y tampoco se metila específicamente en pulmón. Se encontró que el SFTP/C no metilado no existe en el plasma de la mayoría de los individuos sanos, pero está presente en el plasma de muchos pacientes con cáncer de pulmón.

La Figura 18 muestra la distribución tisular de CHST no metilado, un gen que no se metila específicamente en pulmón. Se encontró que el CHST no metilado no existe en el plasma de la mayoría de los individuos sanos, pero está presente en el plasma de muchos pacientes con cáncer de pulmón.

La Figura 19 muestra la distribución del tejido de RAB4 no metilado, un gen que no se metila específicamente en el pulmón. Se encontró que RAB4 no metilado no existe en plasma de individuos sanos, pero está presente en el plasma de algunos pacientes con cáncer de pulmón.

Se encontró que el plasma de pacientes con cáncer de pulmón tiende a contener más de un marcador pulmonar. Esta característica distingue entre el plasma de pacientes con cáncer de pulmón y el de individuos sanos.

Ejemplo 10

Identificación del ADN del músculo esquelético en plasma después del ejercicio y en distrofias musculares

Los presentes inventores identificaron y validaron tres marcadores de metilación del músculo esquelético que no se metilan en el músculo esquelético y se metilan en otros tejidos (incluido el corazón). Las Figuras 20A-C muestran la distribución tisular de estos marcadores (TNN, TPO y MAD1).

La Figura 21 muestra que los niveles de dos de estos marcadores (TPO y TNN no metilados) en el plasma de controles sanos son muy bajos, lo que refleja un recambio muscular muy bajo al inicio del estudio (un control sano mostró una señal, por razones poco claras). Tres individuos sanos poco después de un ejercicio físico intensivo muestran una señal clara en ambos marcadores, lo que sugiere que estos marcadores pueden capturar la muerte de células musculares inducida por ejercicio. Entre 15 pacientes con distrofia muscular de Duchenne o Becker (BMD o DMD), 5 mostraron una señal clara que refleja la muerte de las células musculares. Por lo tanto, el ensayo puede usarse para detectar y monitorizar la muerte de células musculares esqueléticas después del ejercicio y en afecciones patológicas.

Ejemplo 11

Identificación del ADN derivado del endotelio vascular en la circulación

Para identificar marcadores de metilación de células endoteliales, los presentes inventores determinaron el metiloma de células endoteliales humanas seleccionadas de cordones umbilicales. La Figura 22 muestra un marcador de células endoteliales, que no se metila en células endoteliales (de cordones umbilicales) pero se metila completamente en todos los tipos celulares específicos analizados (linfocitos y células acinares pancreáticas, células alfa y células ductales). El ADN de las biopsias de tejido mostró aproximadamente un 10 % de falta de metilación en este marcador, lo que refleja la presencia de células endoteliales en todos los tejidos. La mayoría de los individuos sanos no tienen señal en su suero, lo que sugiere un bajo recambio basal de las células endoteliales. La sangre de una mujer durante el ciclo menstrual mostró una señal alta como se esperaba debido a un colapso vascular extenso. Las mujeres embarazadas tenían una señal que era más fuerte en mujeres con preeclampsia. Todos los pacientes con cáncer analizados mostraron una señal clara.

Estos hallazgos sugieren que el método permite la identificación de la muerte de células endoteliales en diversos entornos, por ejemplo para evaluar la actividad de fármacos antiangiogénicos en el cáncer u otras patologías, y en patologías tales como la preeclampsia.

Ejemplo 12

Identificación del ADN derivado del hígado en la circulación

Los presentes inventores identificaron y validaron marcadores de hepatocitos. La Figura 23 muestra que el promotor de la albúmina (ALB) no se metila en los hepatocitos (y hasta cierto punto en el riñón y el páncreas) pero se metila en cualquier otro sitio. La sangre de individuos sanos no contenía ninguna señal o tenía un nivel relativamente alto de ADN promotor de la albúmina no metilado, lo que sugiere un recambio o aclaramiento basal fluctuante de los hepatocitos. Todos los pacientes con hepatitis analizados (n = 7) dieron positivo, lo que sugiere que el método puede detectar la muerte patológica de hepatocitos.

Ejemplo 13

Identificación del ADN circulante libre de células derivado de no linfocitos

Las Figuras 24A-B muestran marcadores que se identificaron como no metilados en linfocitos y metilados en cualquier otro sitio. En la sangre de la mayoría de los individuos sanos, la mayoría de las moléculas no se metilan, lo que refleja el hecho de que la mayoría de los ADN circulantes libres de células en condiciones basales se derivan de células sanguíneas moribundas. Sin embargo, en el suero de individuos sanos, poco después de un ejercicio intenso o pacientes con cáncer, hubo altos niveles de estos marcadores metilados, indicativos de ADN circulante libre de células derivado de no linfocitos (aparentemente ADN muscular después del ejercicio y ADN tumoral en pacientes con cáncer). Estos marcadores pueden usarse para evaluar de manera amplia una desviación de lo normal en un individuo: evidencia de muerte celular en tejidos distintos de la sangre.

Ejemplo 14

Identificación del ADN derivado del riñón en la circulación

La Figura 25 muestra que AQP (una secuencia de uno de los genes de la acuaporina) no se metila en células renales y se metila en la sangre. Los individuos sanos no tienen una AQP no metilada en la sangre (lo que probablemente refleja la eliminación de células moribundas en el riñón normal a la orina en lugar de a la sangre). Las mujeres embarazadas con preeclampsia (que se sabe que tienen daño renal) mostraron una señal fuerte. Estos hallazgos indican que el método puede usarse para detectar la muerte de las células renales en diversas afecciones patológicas (por ejemplo, necrosis tubular aguda en algunos pacientes con sepsis).

Ejemplo 15

Identificación del ADN de adipocitos en la circulación

Se ha demostrado que el número total de adipocitos permanece estable durante la vida adulta, con evidencia de una formación considerable de nuevos adipocitos. Por lo tanto, se predice que la tasa de muerte de adipocitos debe ser igual a la tasa de formación de adipocitos.

Las Figuras 26A-D muestran cuatro loci diferentes que no se metilan en adipocitos y se metilan en cualquier otro sitio (aquí se muestran solo para la sangre).

Las Figuras 27A-D muestran que el plasma de la mayoría de los individuos sanos contiene múltiples marcadores de metilación de ADN de adipocitos, indicativo de un recambio de adipocitos en curso, coherente con la formación y destrucción continuas de estas células. Por lo tanto, este método puede usarse para monitorizar la muerte de adipocitos, por ejemplo, para estudiar afecciones fisiológicas y patológicas, así como fármacos que influyen en este proceso.

La mención o identificación de cualquier referencia en esta solicitud no debe interpretarse como una admisión de que dicha referencia esté disponible como técnica anterior a la presente invención. En la medida en que se usen encabezados de sección, no deben interpretarse como necesariamente limitantes.

REIVINDICACIONES

1. Un método para detectar la muerte de un tipo de célula o tejido en un sujeto que comprende determinar si el ADN libre de células comprendido en una muestra de sangre del sujeto se deriva del tipo de célula o tejido, en donde dicha determinación se efectúa determinando el estado de metilación de al menos cuatro sitios de metilación en una secuencia continua en la misma molécula del ADN libre de células, comprendiendo dicha secuencia no más de 300 nucleótidos, en donde un estado de metilación de cada uno de dichos al menos cuatro sitios de metilación en dicha secuencia continua de dicha misma molécula del ADN característico de dicho tipo de célula o tejido es indicativo de muerte del tipo de célula o tejido.
2. Un método para determinar si el ADN se deriva de un tipo de célula o tejido de interés en una muestra, comprendiendo el método:
  - determinar el estado de metilación de al menos cuatro sitios de metilación en una secuencia continua en la misma molécula de ADN, comprendiendo dicha secuencia no más de 300 nucleótidos, en donde un estado de metilación de cada uno de dichos al menos cuatro sitios de metilación en dicha secuencia continua de la misma molécula de ADN es indicativo de que el ADN se deriva del tipo de célula o tejido de interés.
3. El método de las reivindicaciones 1 o 2, en donde
  - a. dicho estado de metilación es característico de un tipo de célula o tejido de interés no enfermos;
  - b. dicha secuencia comprende entre 50-250 nucleótidos;
  - c. dicho tipo de célula o tejido es un tipo de célula o tejido humanos;
  - d. dicho tipo de célula se selecciona del grupo que consiste en una célula beta pancreática, una célula exocrina pancreática, un hepatocito, una célula cerebral, una célula pulmonar, una célula de útero, una célula renal, una célula de mama, un adipocito, una célula de colon, una célula de recto, un cardiomiocito, una célula muscular esquelética, una célula de próstata y una célula de tiroides; o
  - e. dicho tejido se selecciona del grupo que consiste en tejido pancreático, tejido hepático, tejido pulmonar, tejido cerebral, tejido de útero, tejido renal, tejido de mama, grasa, tejido de colon, tejido de recto, tejido cardíaco, tejido muscular esquelético, tejido de próstata y tejido de tiroides.
4. El método de la reivindicación 2, en donde dicho ADN es ADN libre de células o ADN celular.
5. El método de la reivindicación 2, en donde la muestra comprende un fluido corporal o la muestra es una muestra de sangre.
6. El método de la reivindicación 5, en donde dicho fluido corporal se selecciona del grupo que consiste en sangre, plasma, esperma, leche, orina, saliva y líquido cefalorraquídeo.
7. El método de las reivindicaciones 1-2, 4 y 5, en donde dicha determinación o identificación se lleva a cabo:
  - a. usando al menos un oligonucleótido dependiente de metilación;
  - b. usando un oligonucleótido independiente de metilación;
  - c. usando al menos dos oligonucleótidos independientes de metilación;
  - d. usando una reacción múltiple; o
  - e. mediante:
    - (i) la puesta en contacto del ADN de la muestra con bisulfito para convertir citosinas desmetiladas del ADN en uracilos;
    - (ii) la amplificación clonal de dicha secuencia continua de ADN usando oligonucleótidos que se hibridan con una secuencia de ácido nucleico adyacente al primer y último de dichos al menos cuatro sitios de metilación en dicha secuencia continua del ADN; y
    - (iii) la secuenciación de dicha secuencia continua de ADN amplificada clonalmente.
8. El método de las reivindicaciones 1 o 4, en donde la muestra comprende ADN libre de células que se deriva de una segunda célula que no es idéntica a dicho tipo de célula o tejido.

9. El método de la reivindicación 8, que comprende además analizar la cantidad de ADN libre de células derivado de dicho tipo de célula o tejido: la cantidad de ADN libre de células derivado de dicha segunda célula, o analizar la cantidad de ADN libre de células derivado de dicho tipo de célula o tejido: la cantidad total de ADN libre de células en la muestra; o que comprende analizar la cantidad de ADN libre de células derivado de dicho tipo de célula o tejido: la cantidad total de ADN libre de células en la muestra.
- 5

FIG. 1A

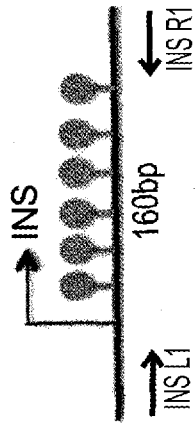


FIG. 1B

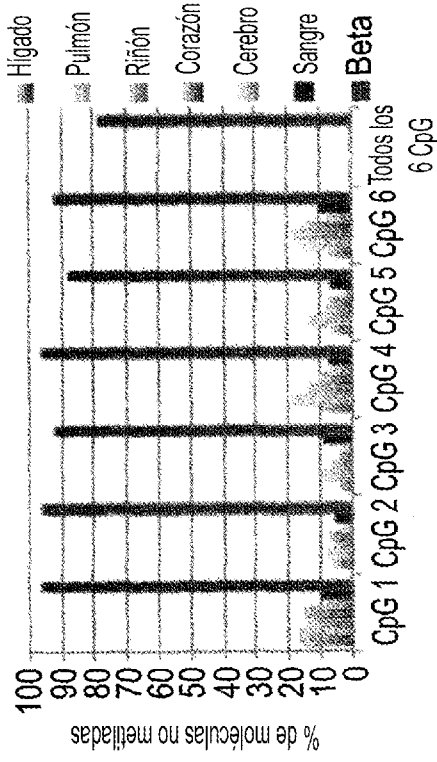


FIG. 1C

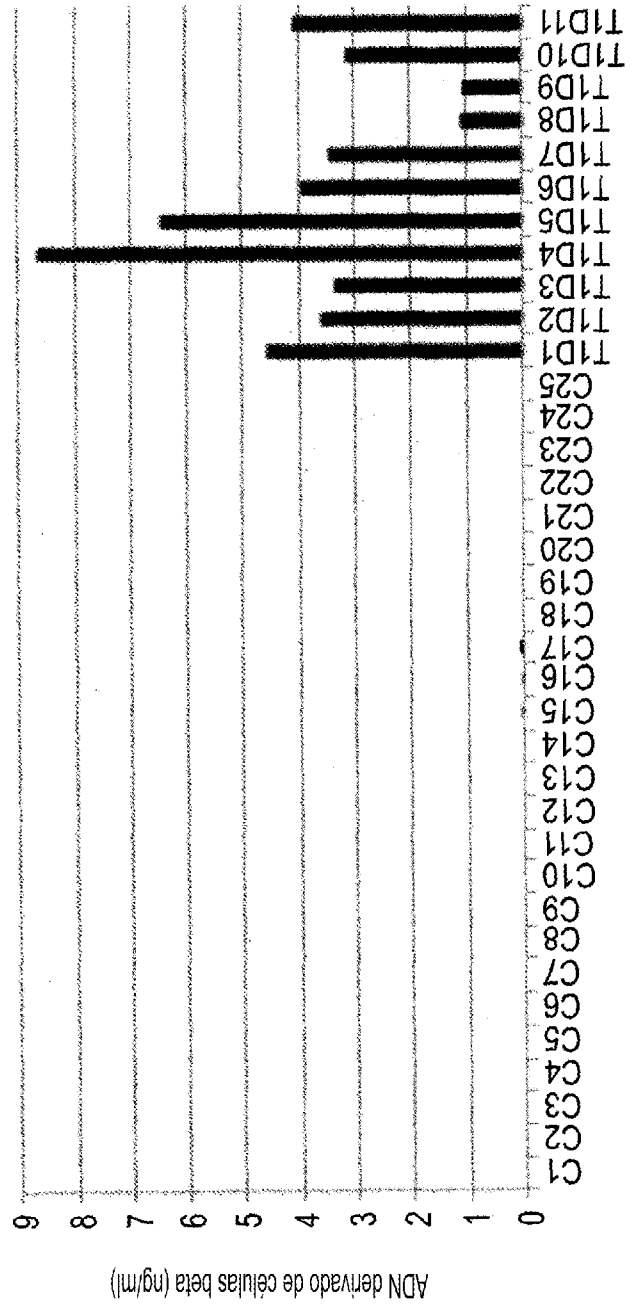


FIG. 1D

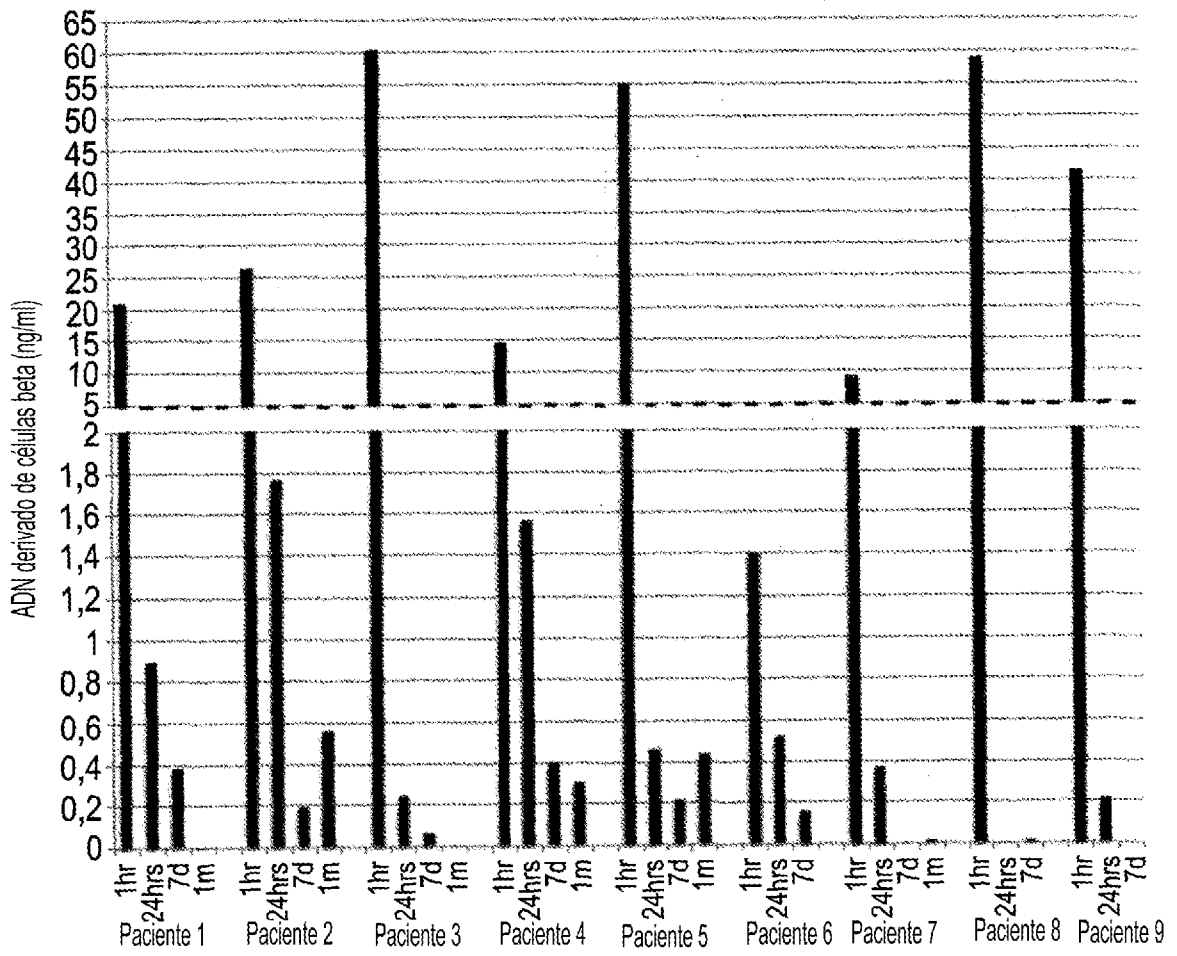


FIG. 2A

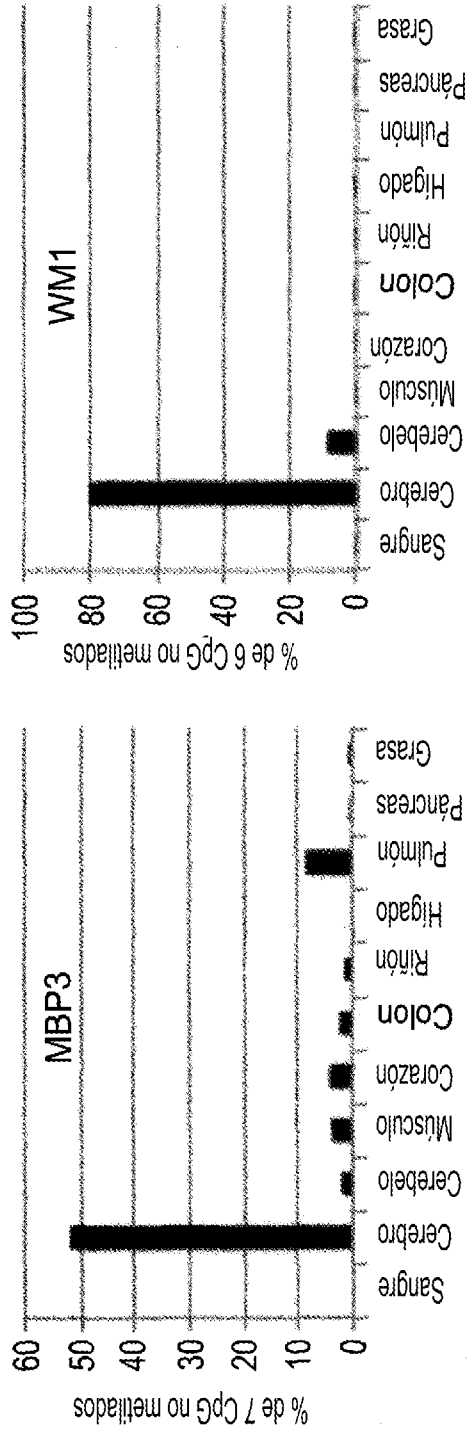


FIG. 2B

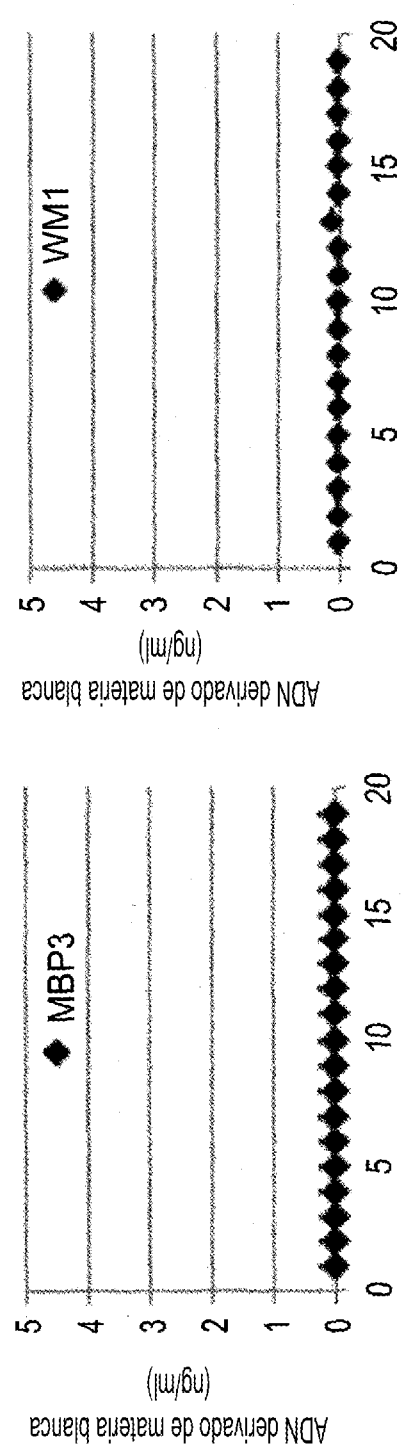


FIG. 2C

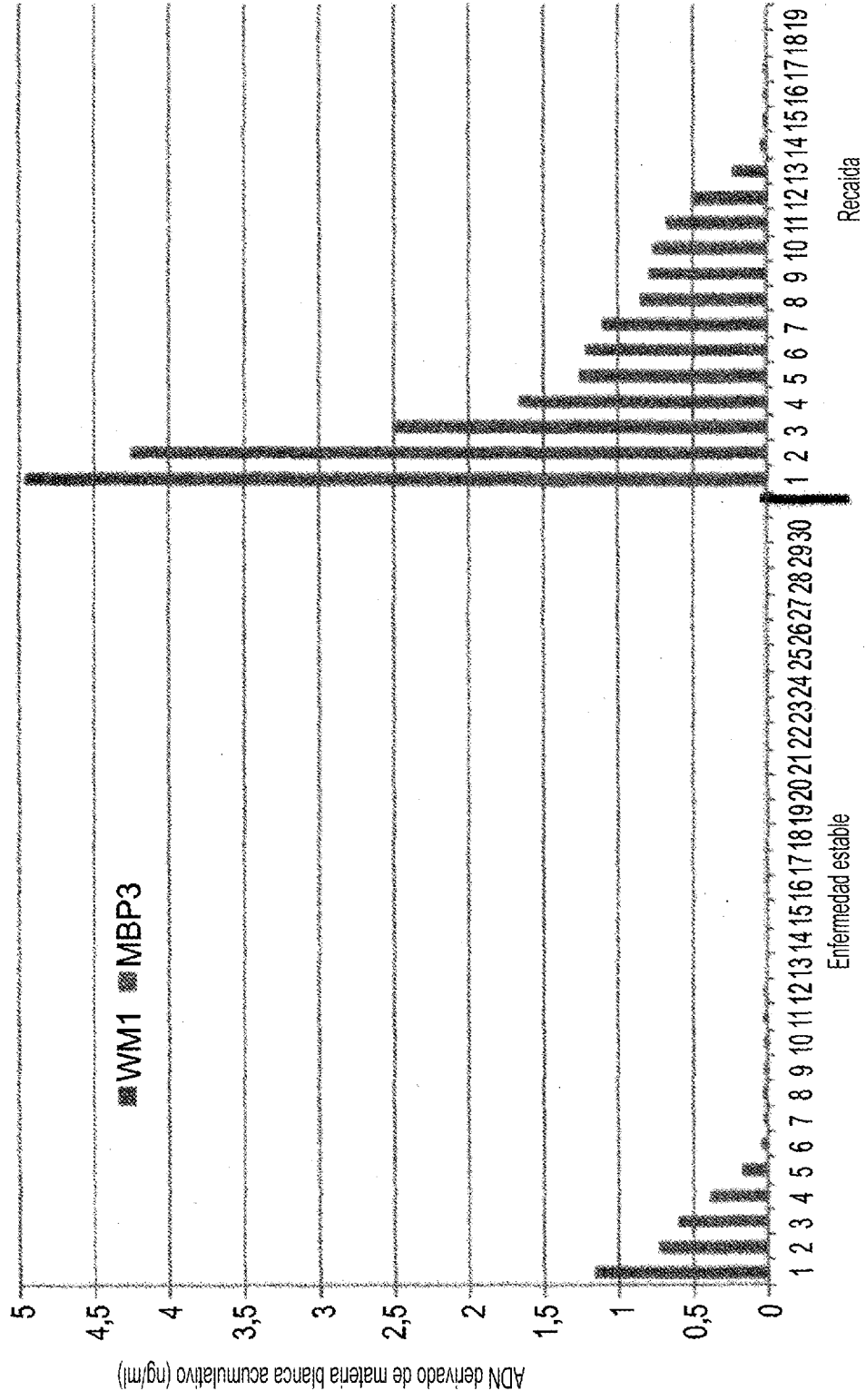


FIG. 3A

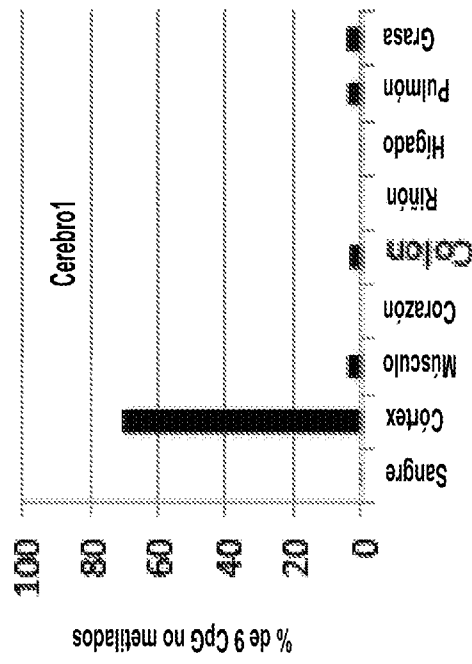


FIG. 3B

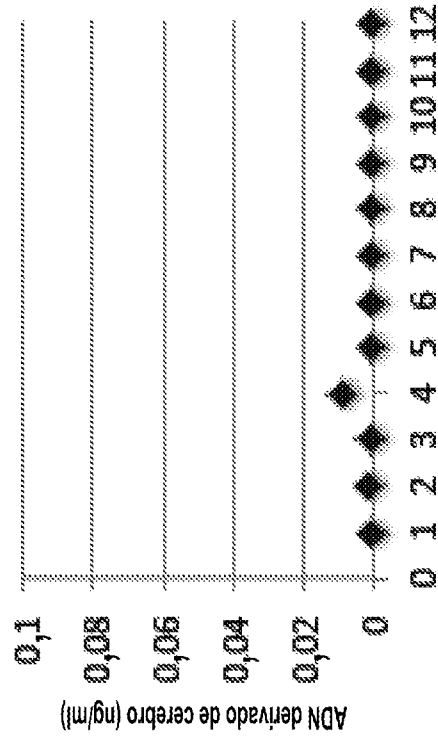


FIG. 3C

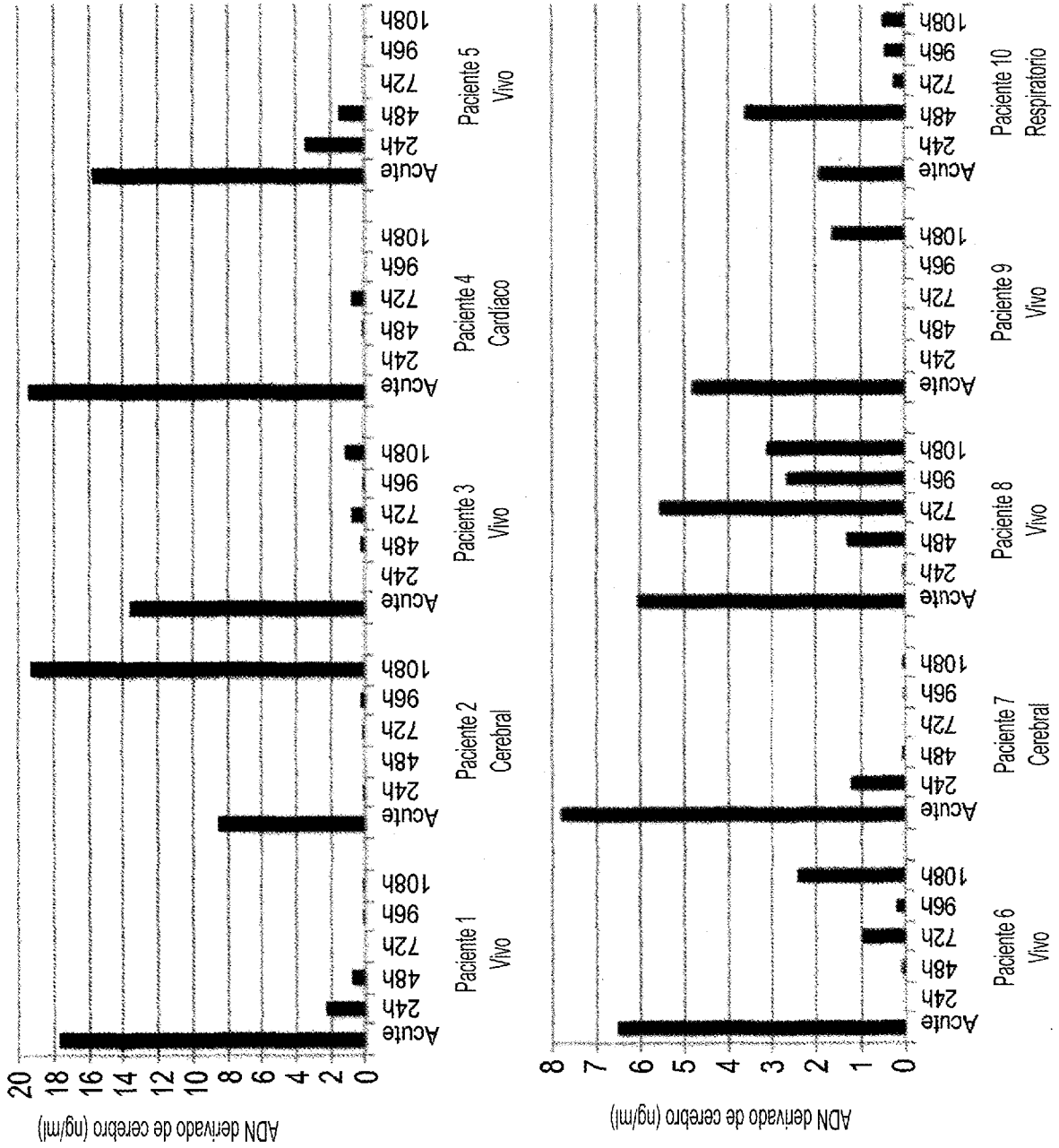


FIG. 3D

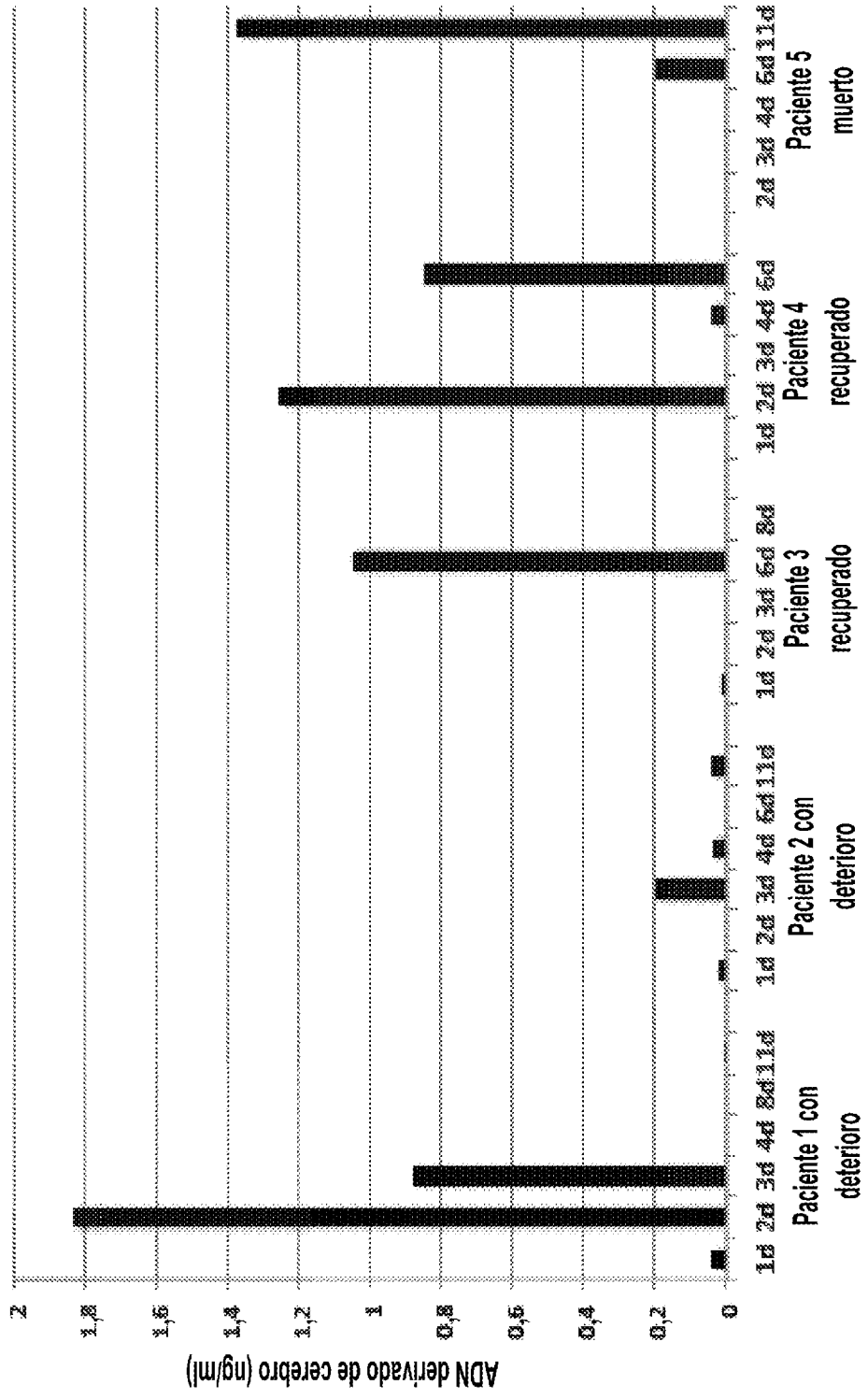


FIG. 4A

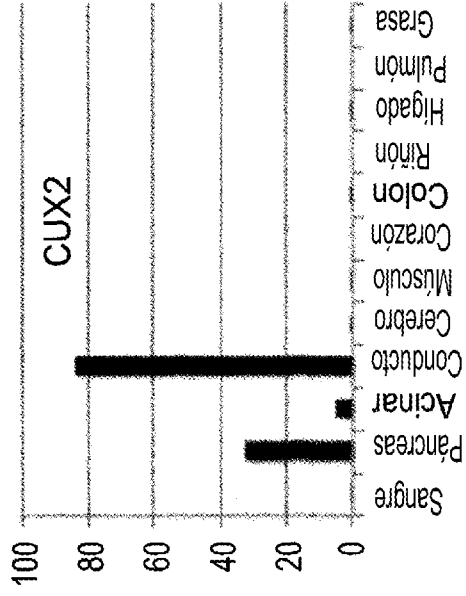
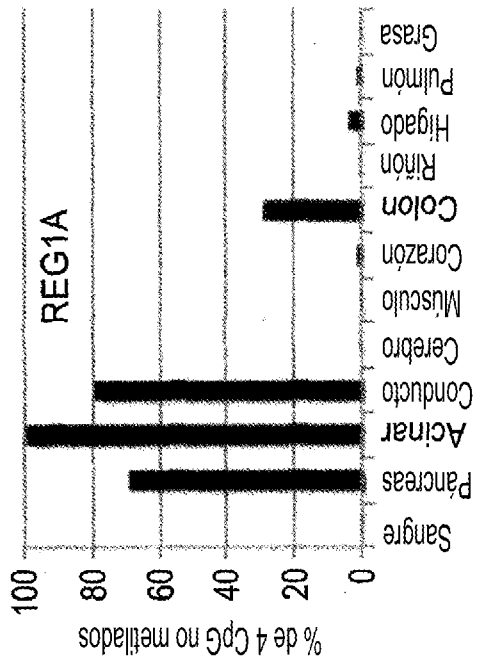


FIG. 4B

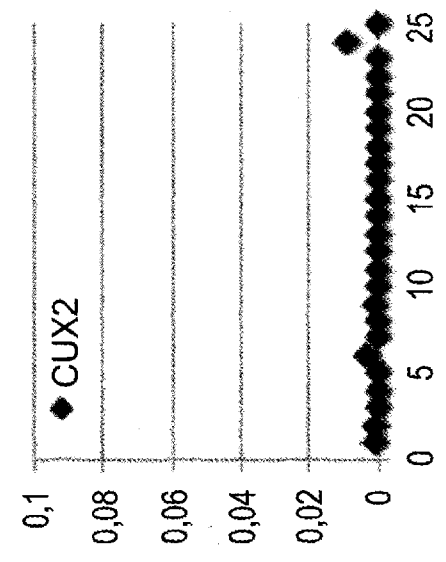
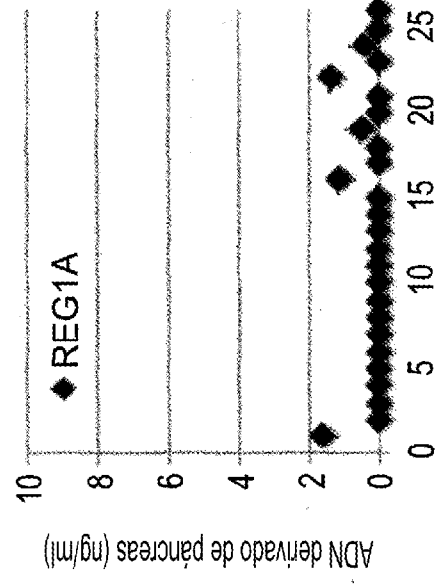


FIG. 4C

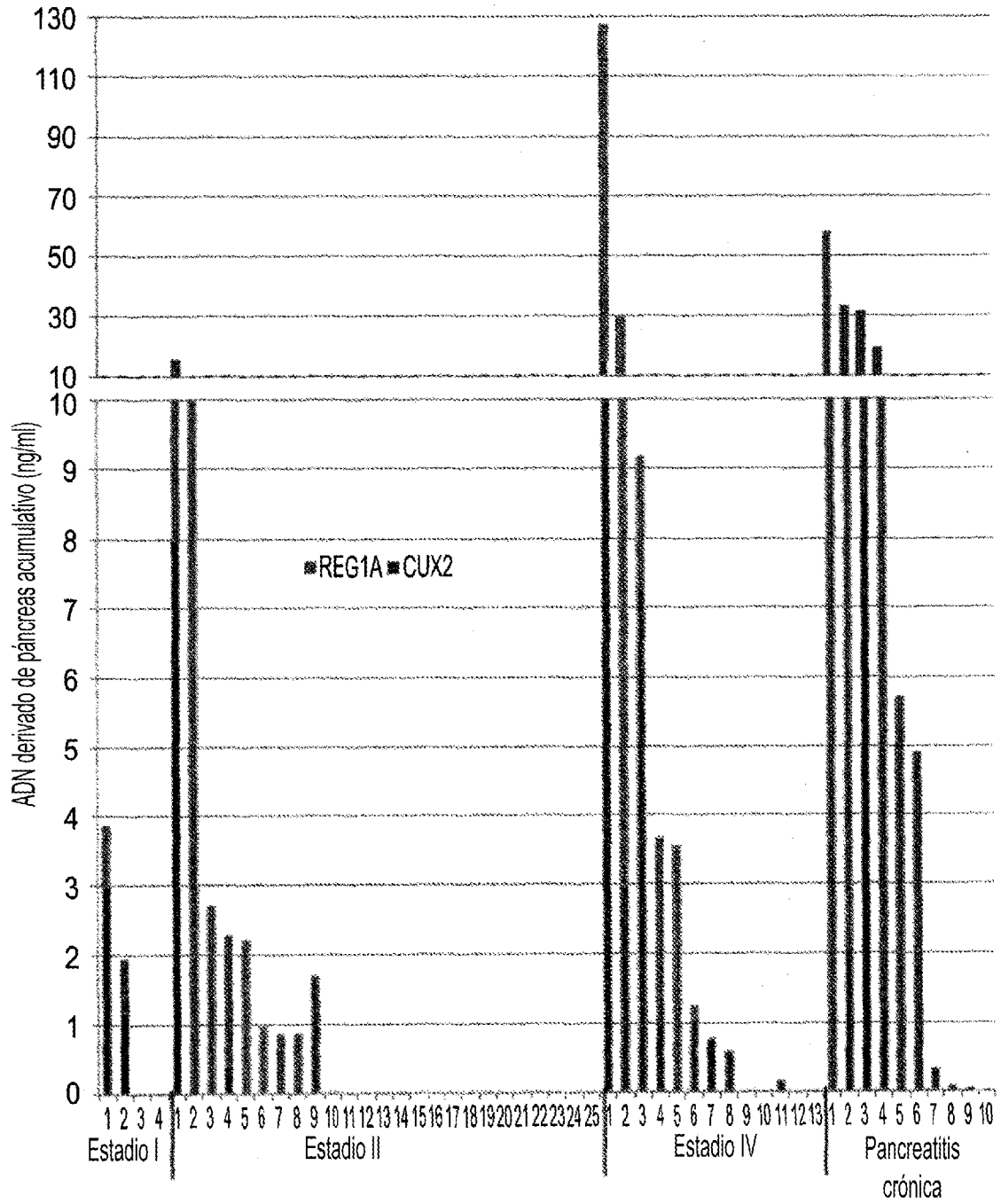


FIG. 5A

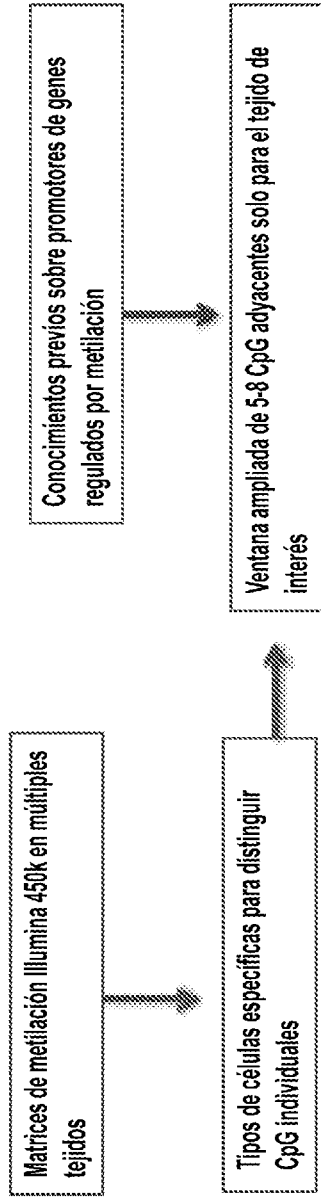


FIG. 5B

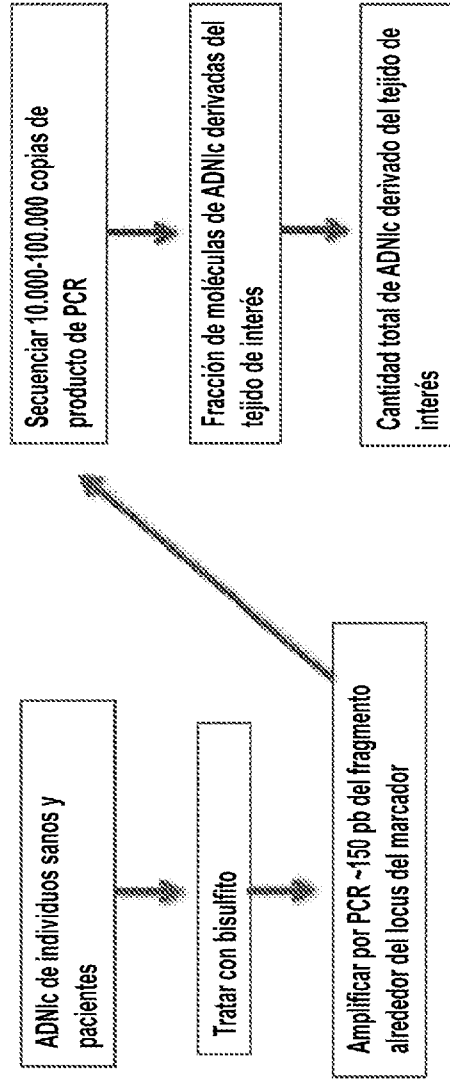


FIG. 6A

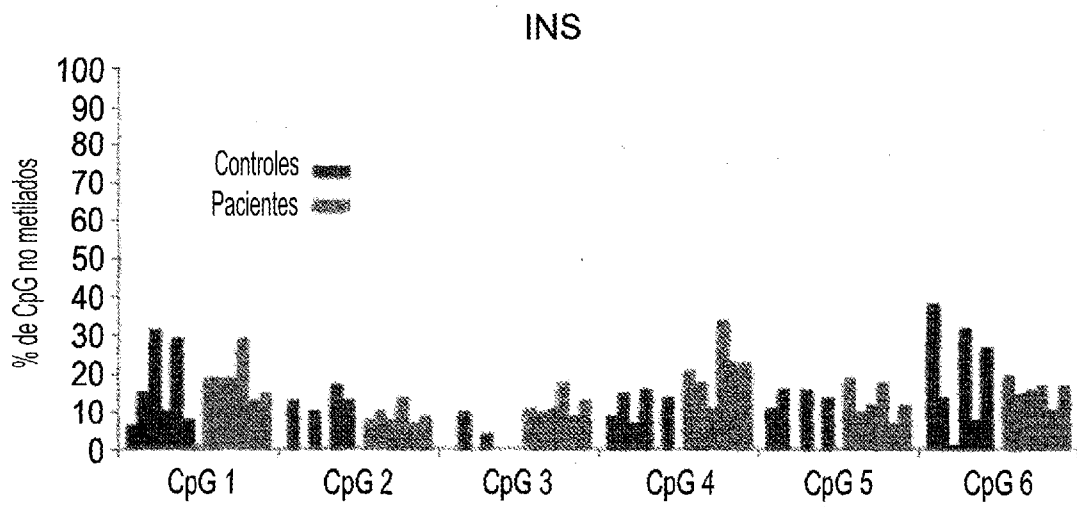
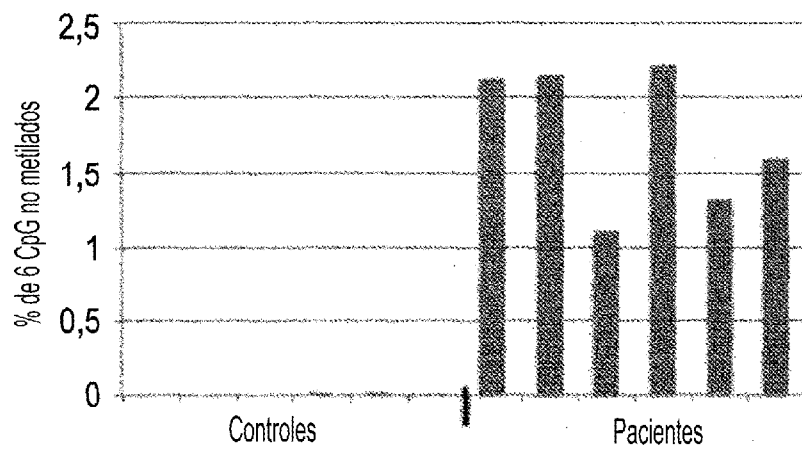


FIG. 6B



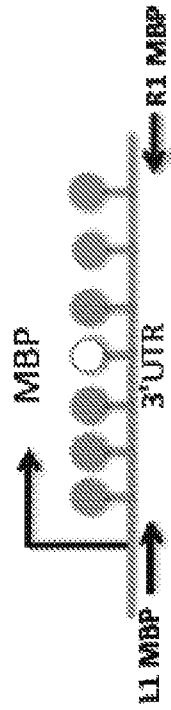


FIG. 7A

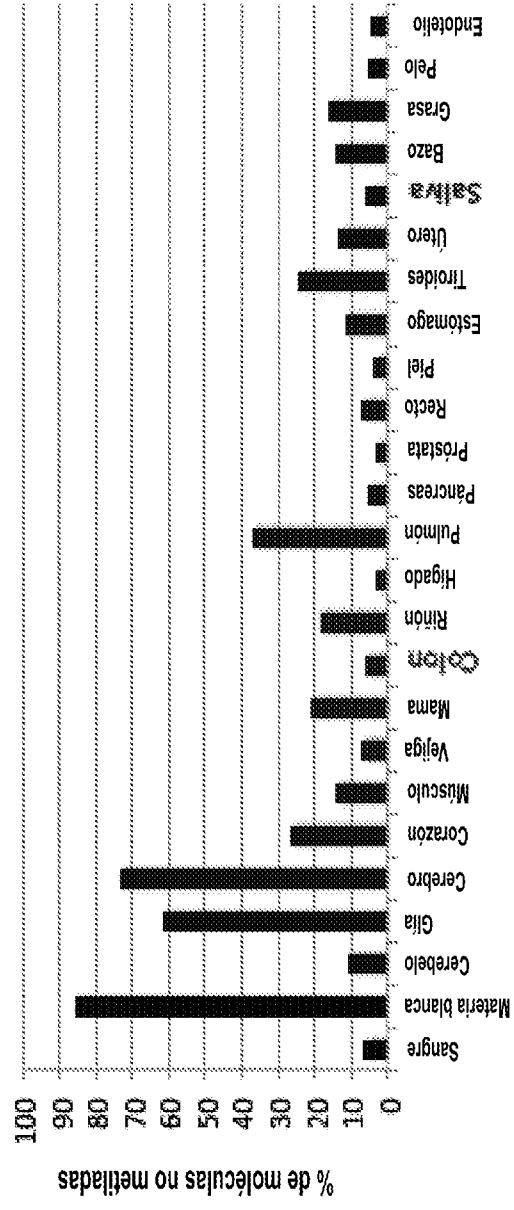


FIG. 7B

FIG. 7C

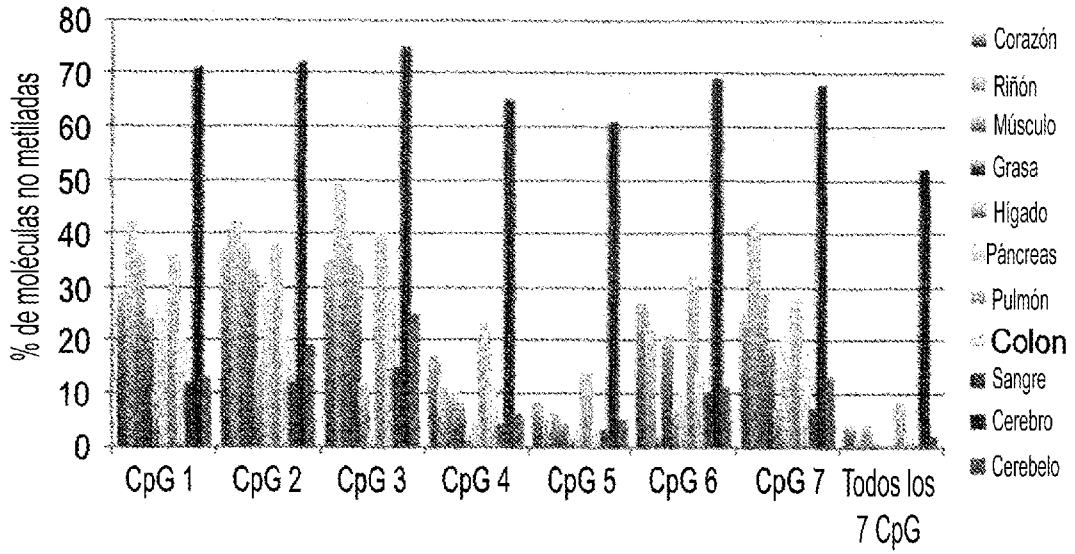


FIG. 7D

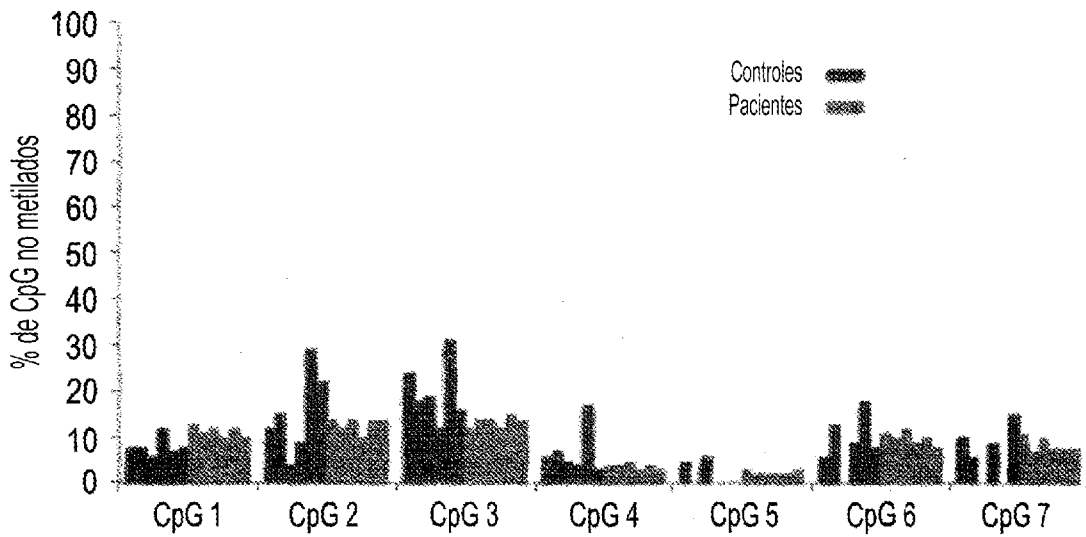
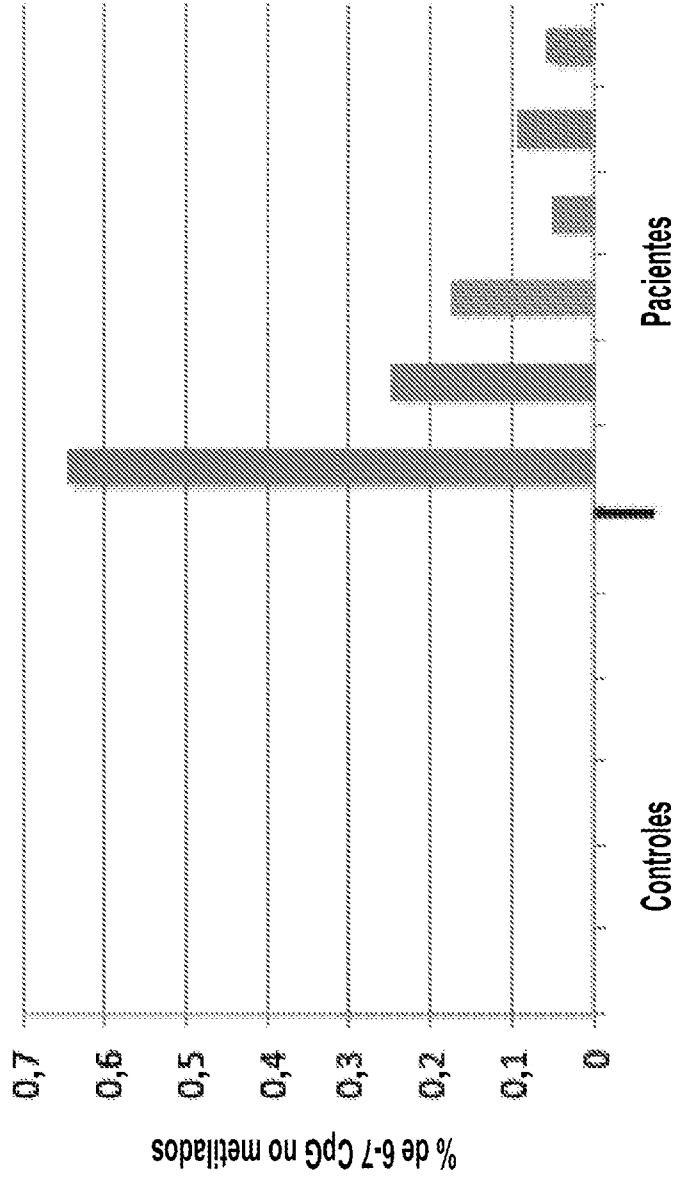


FIG. 7E



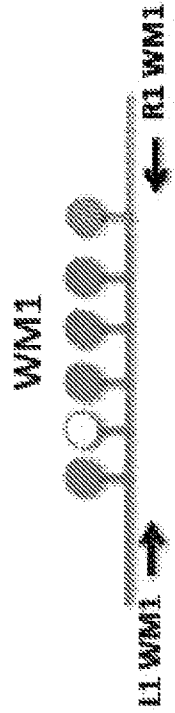


FIG. 8A

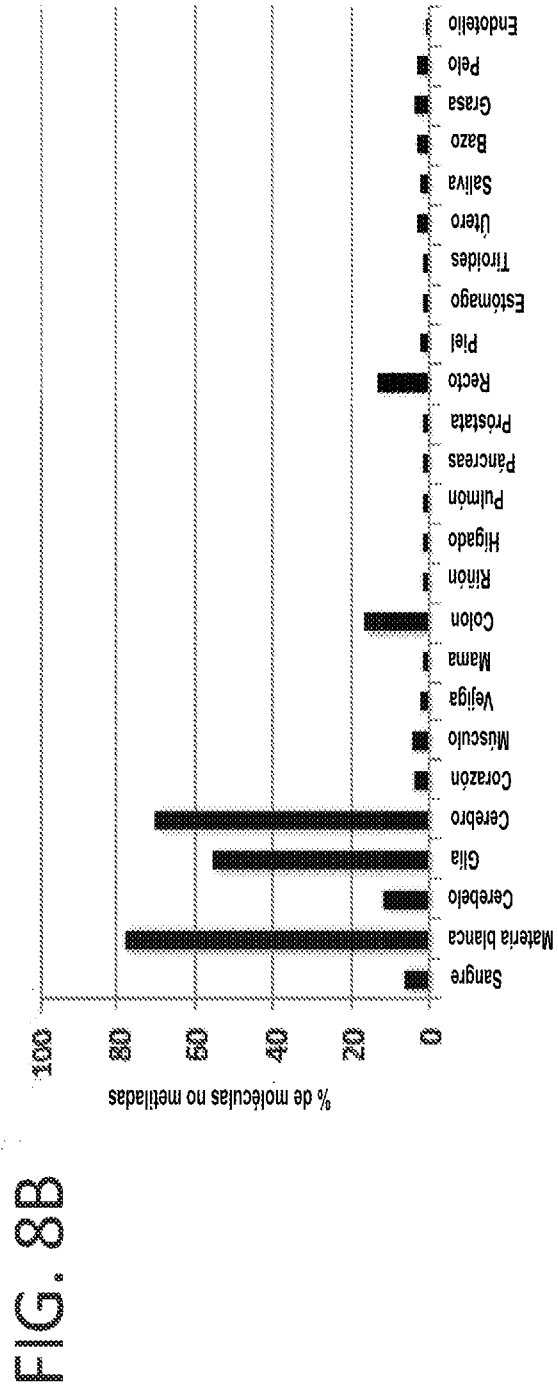


FIG. 8C

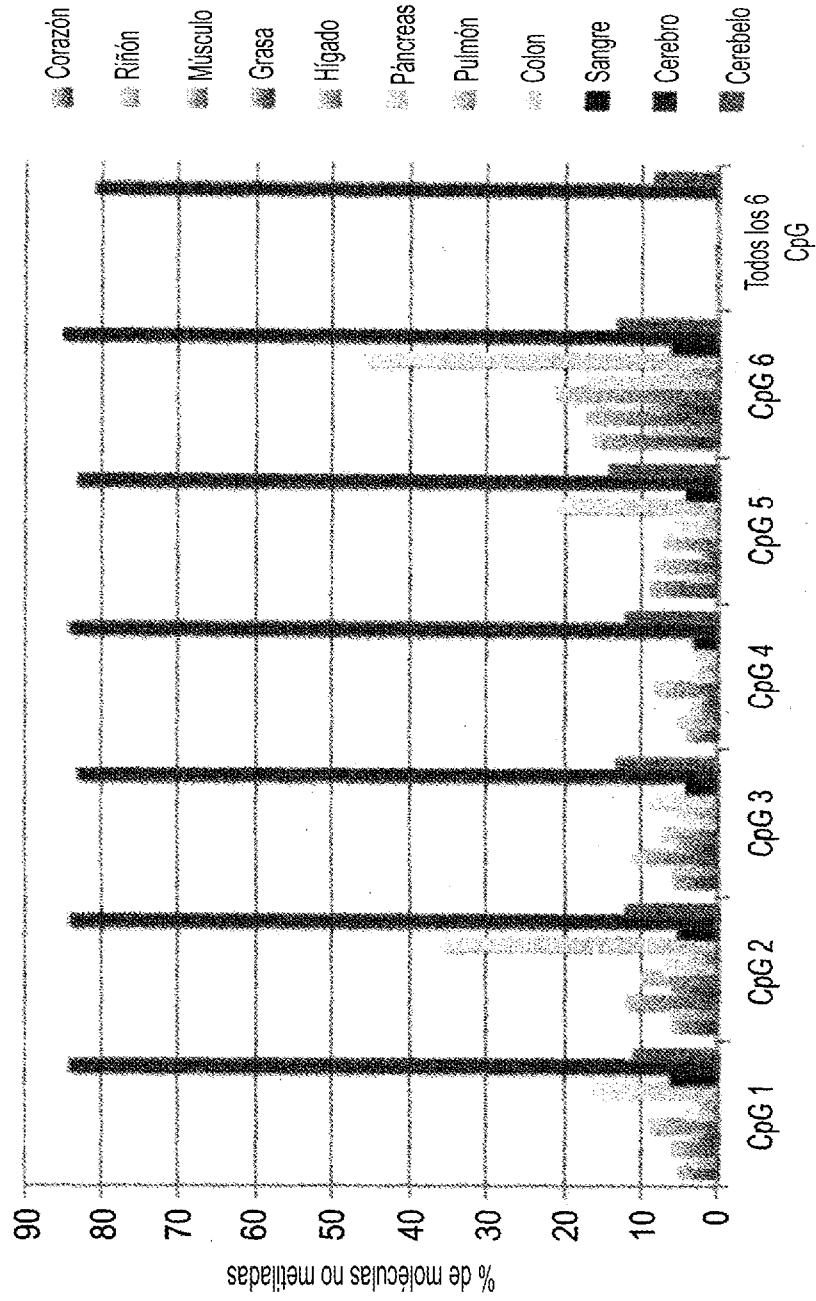


FIG. 8D

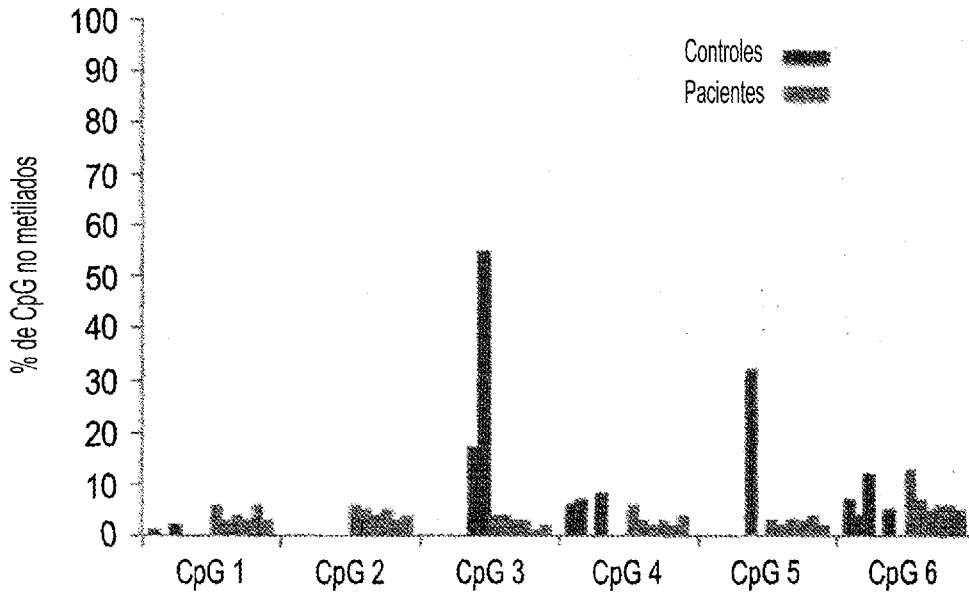
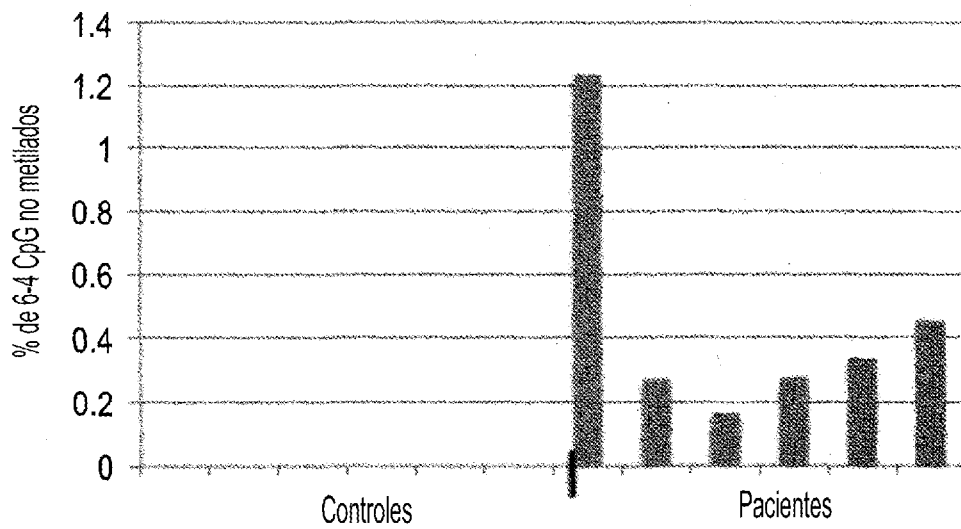


FIG. 8E



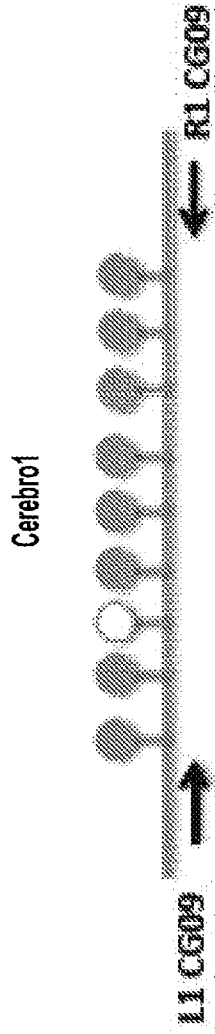


FIG. 9A

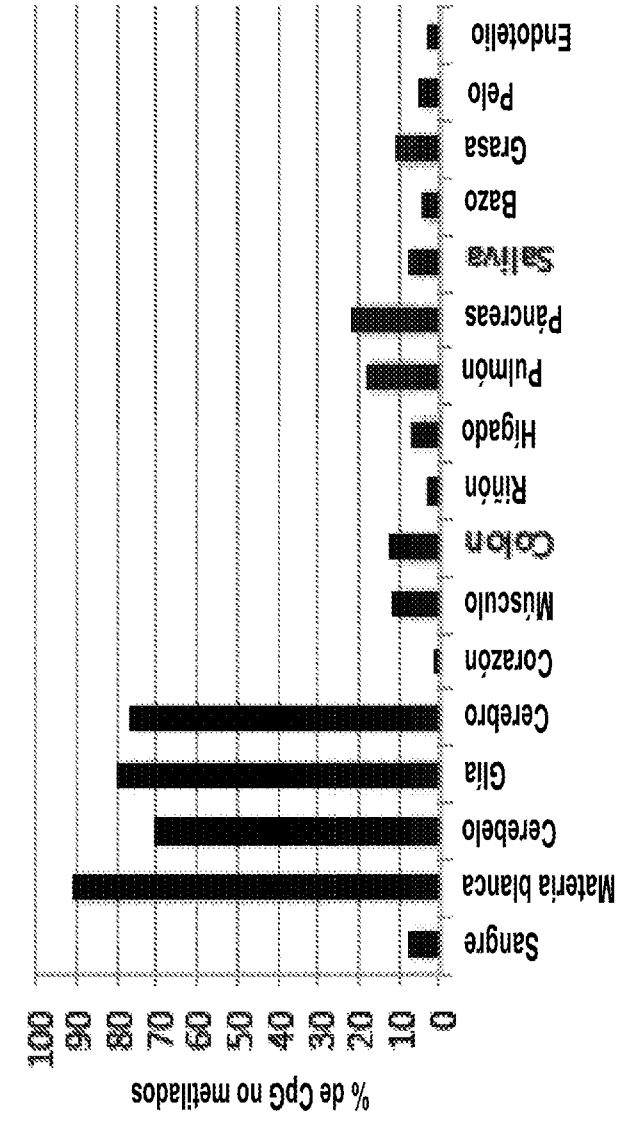


FIG. 9B

FIG. 9C

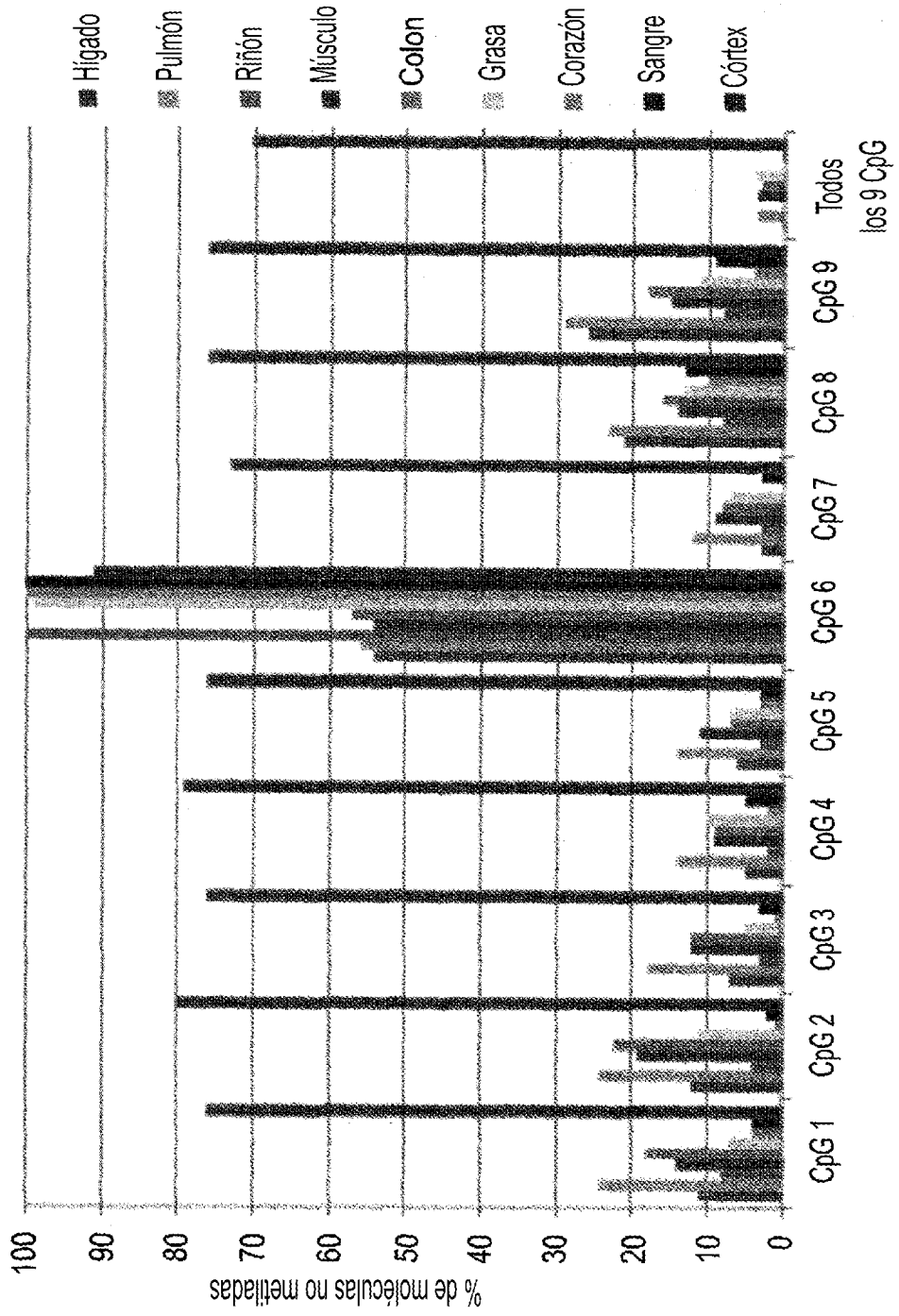


FIG. 9D

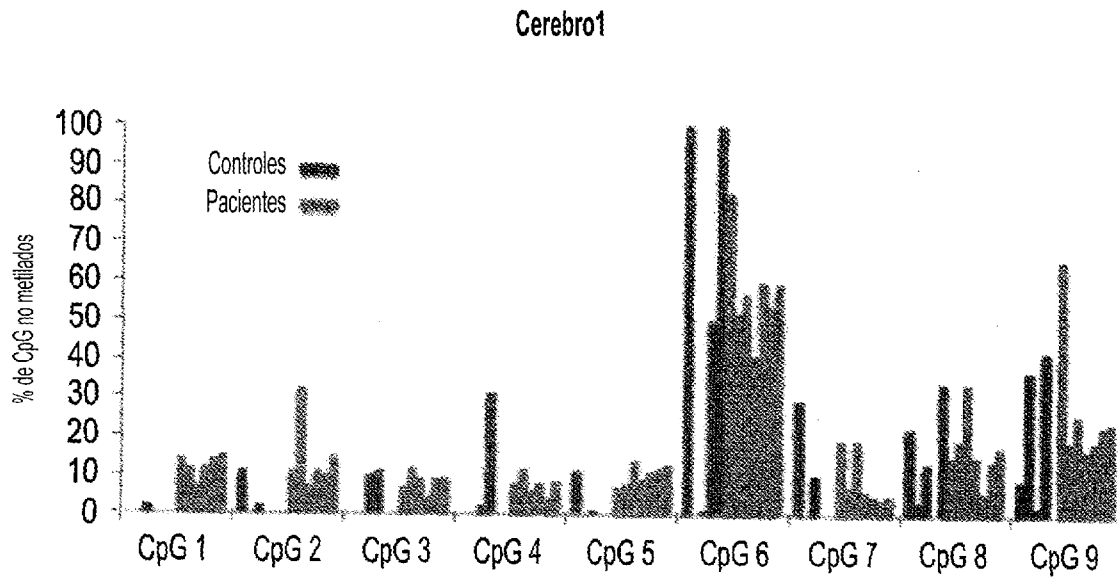


FIG. 9E

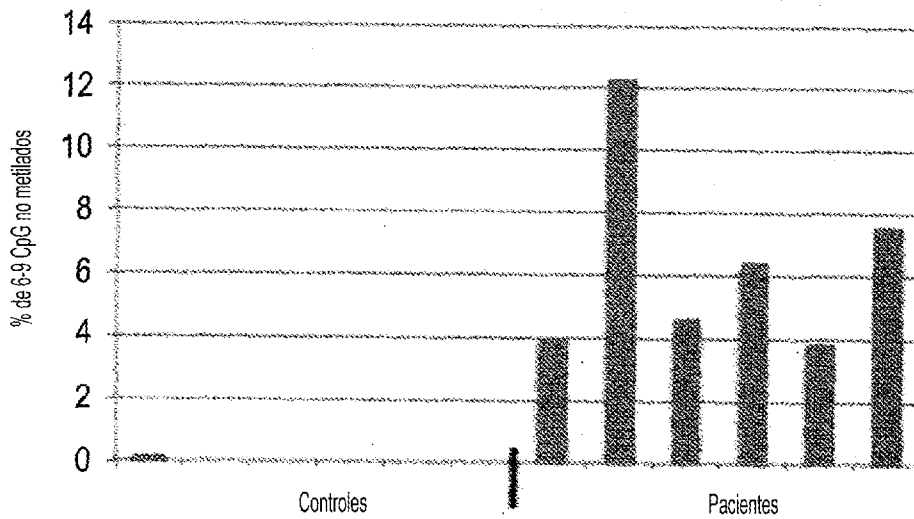


FIG. 10A

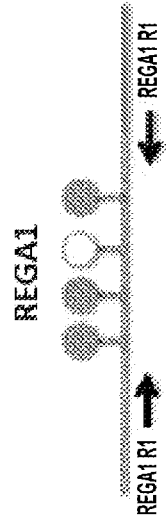


FIG. 10B

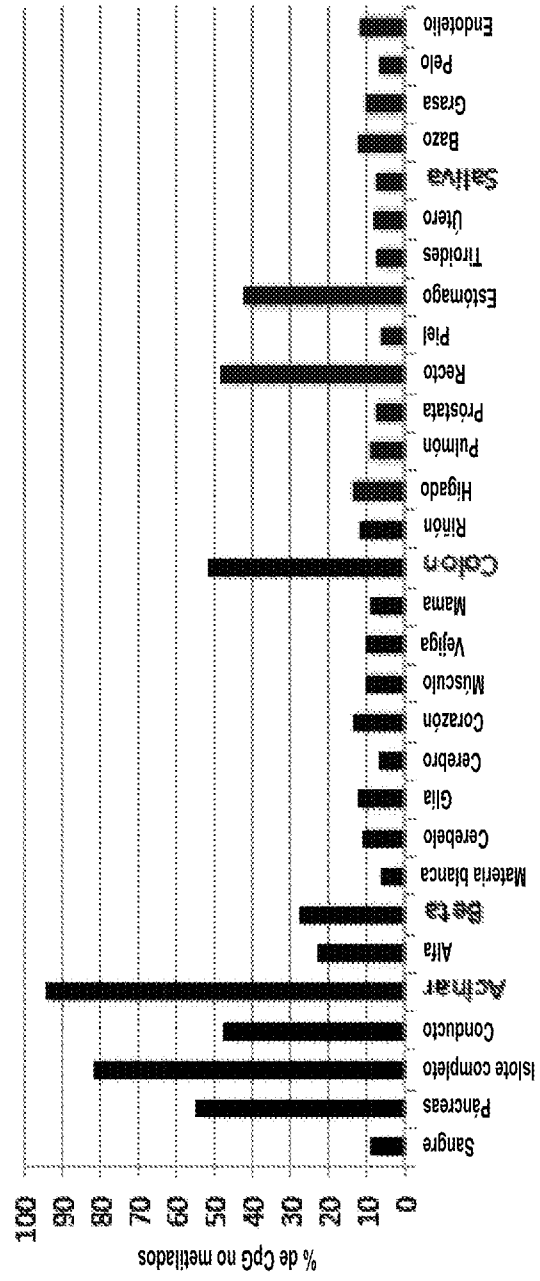


FIG. 10C

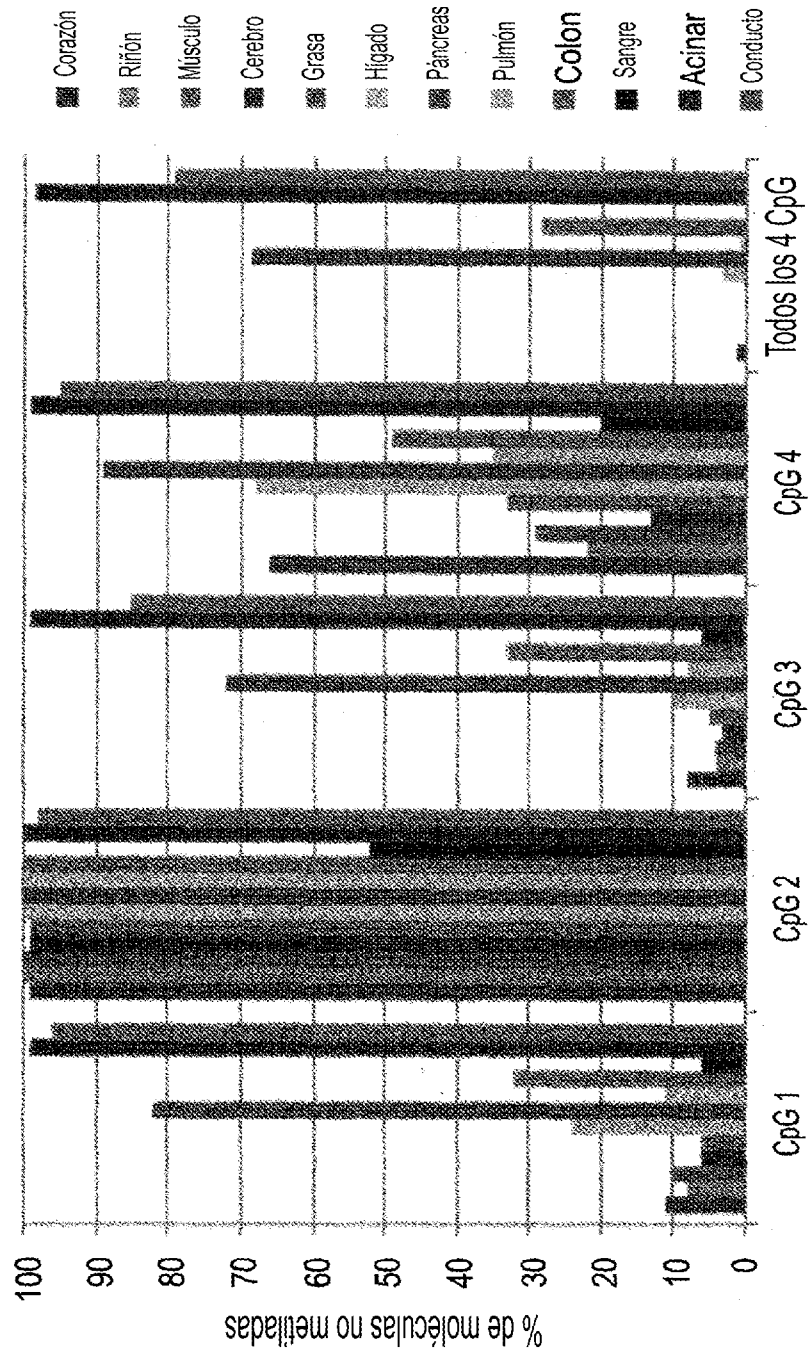


FIG. 10D

REGA1

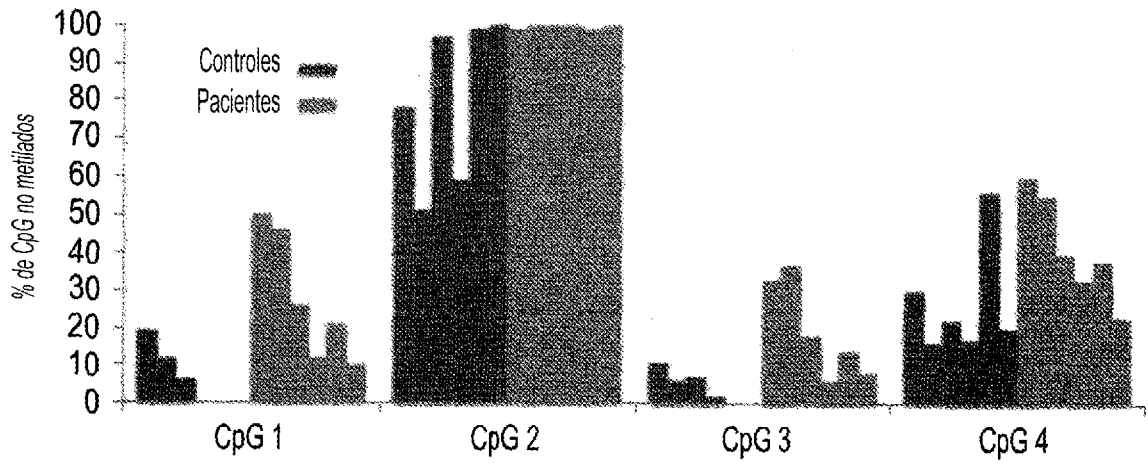


FIG. 10E

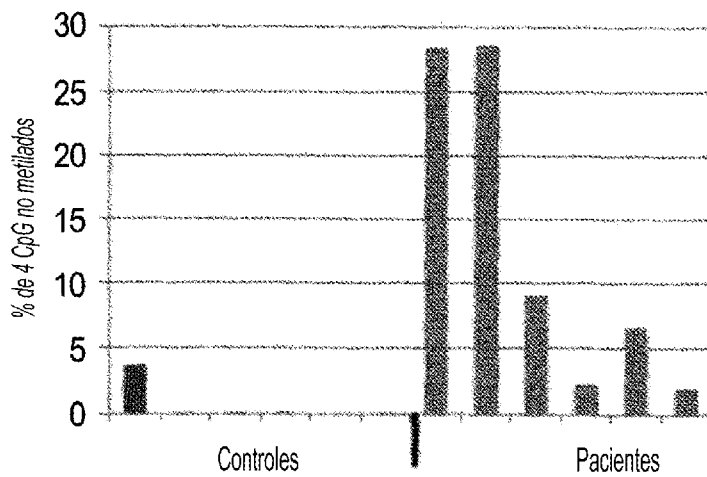


FIG. 11A

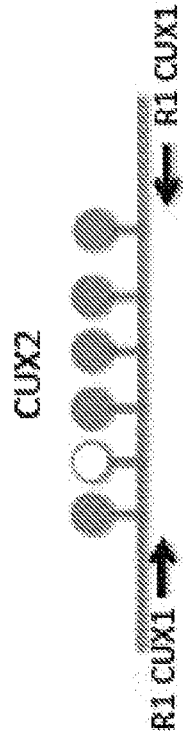
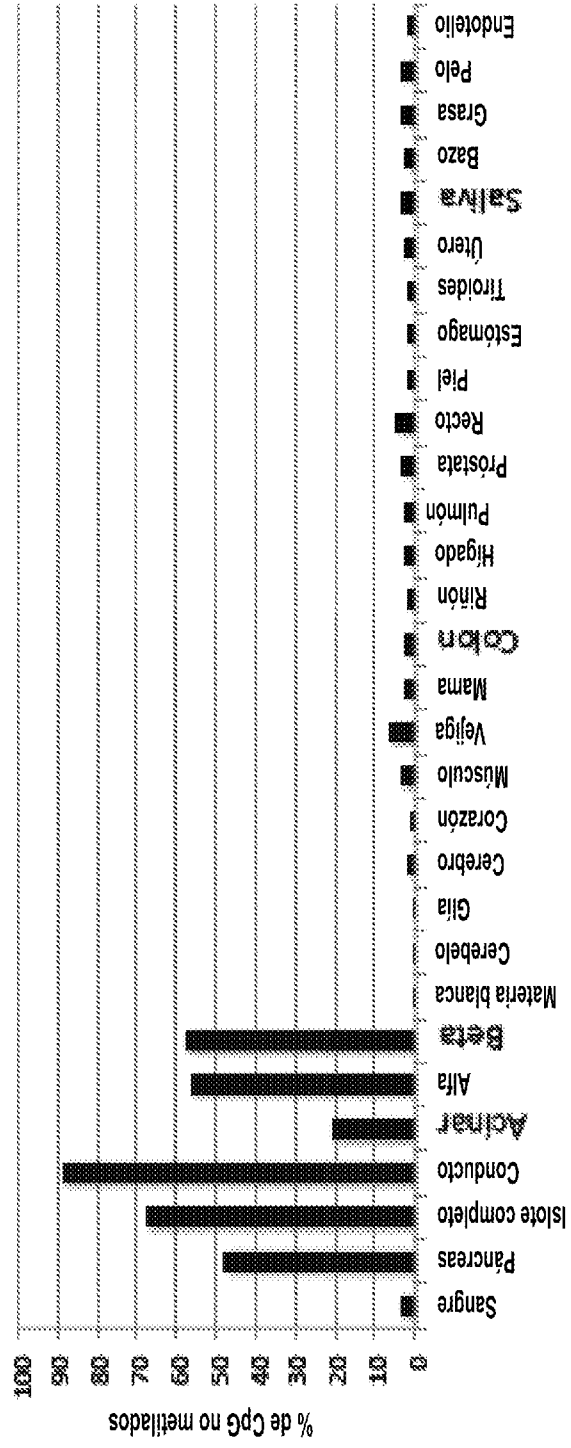


FIG. 11B



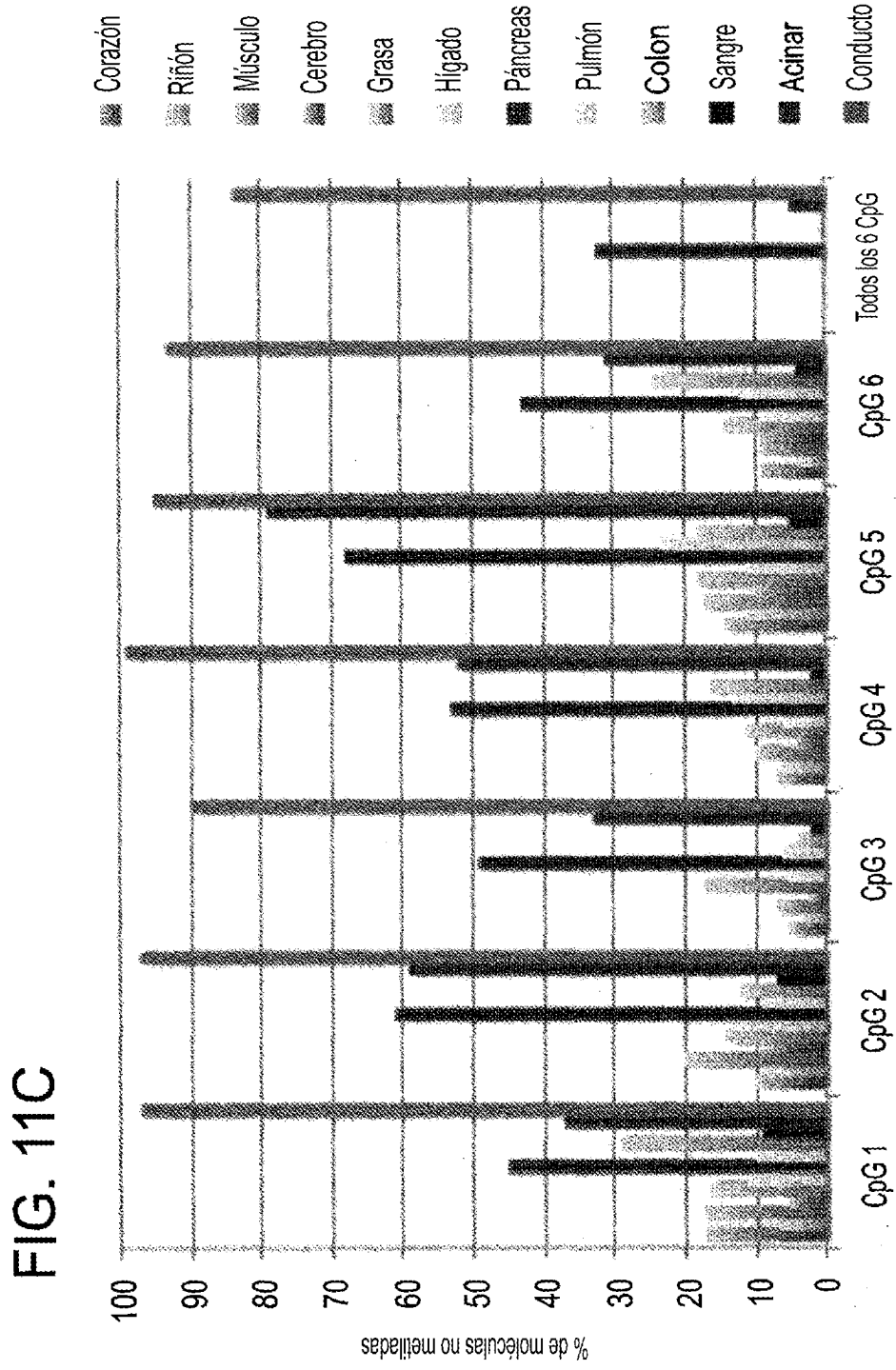


FIG. 11D

CUX2

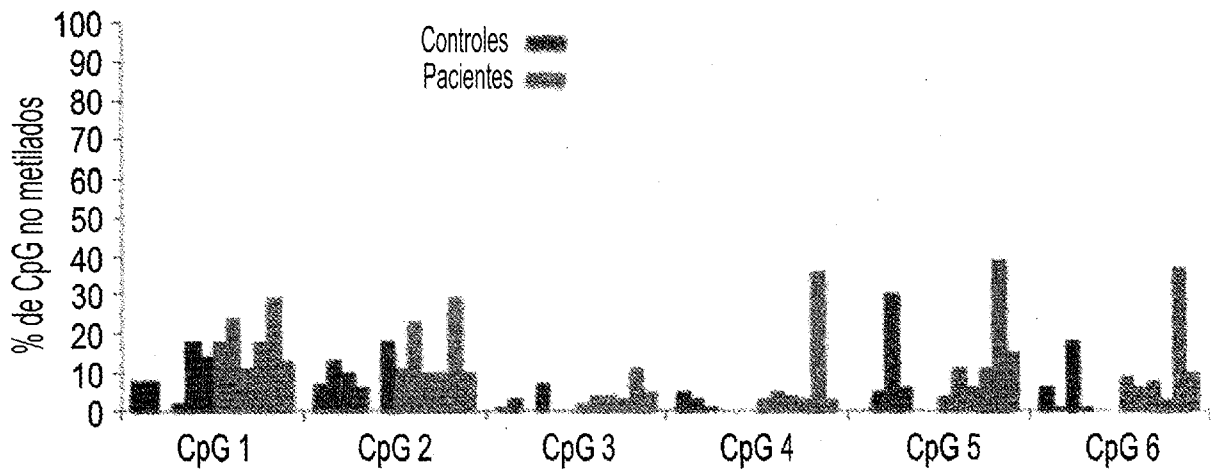
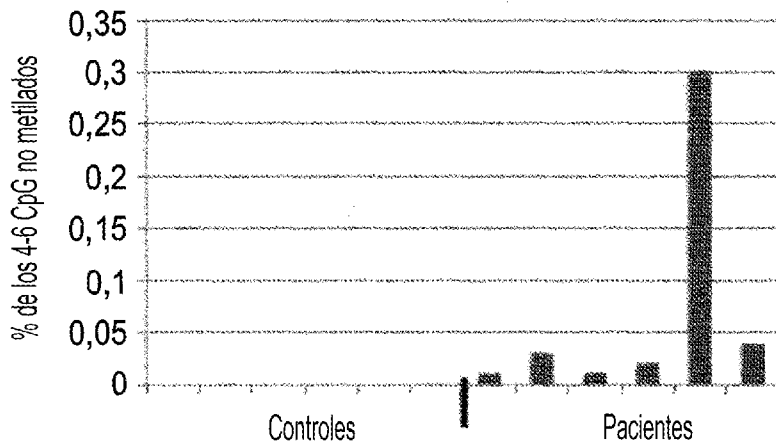


FIG. 11E



**FIG. 12**

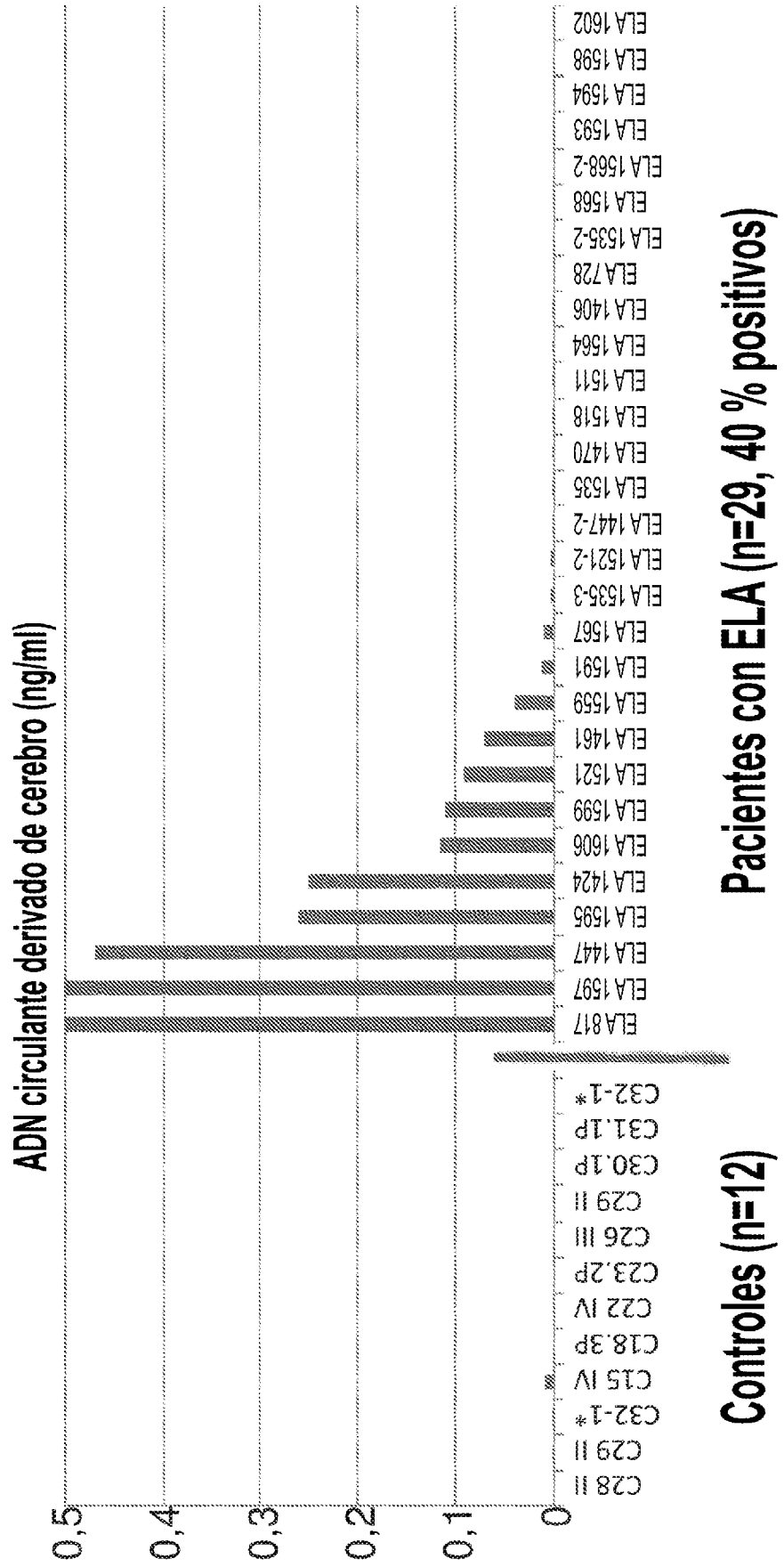


FIG. 13

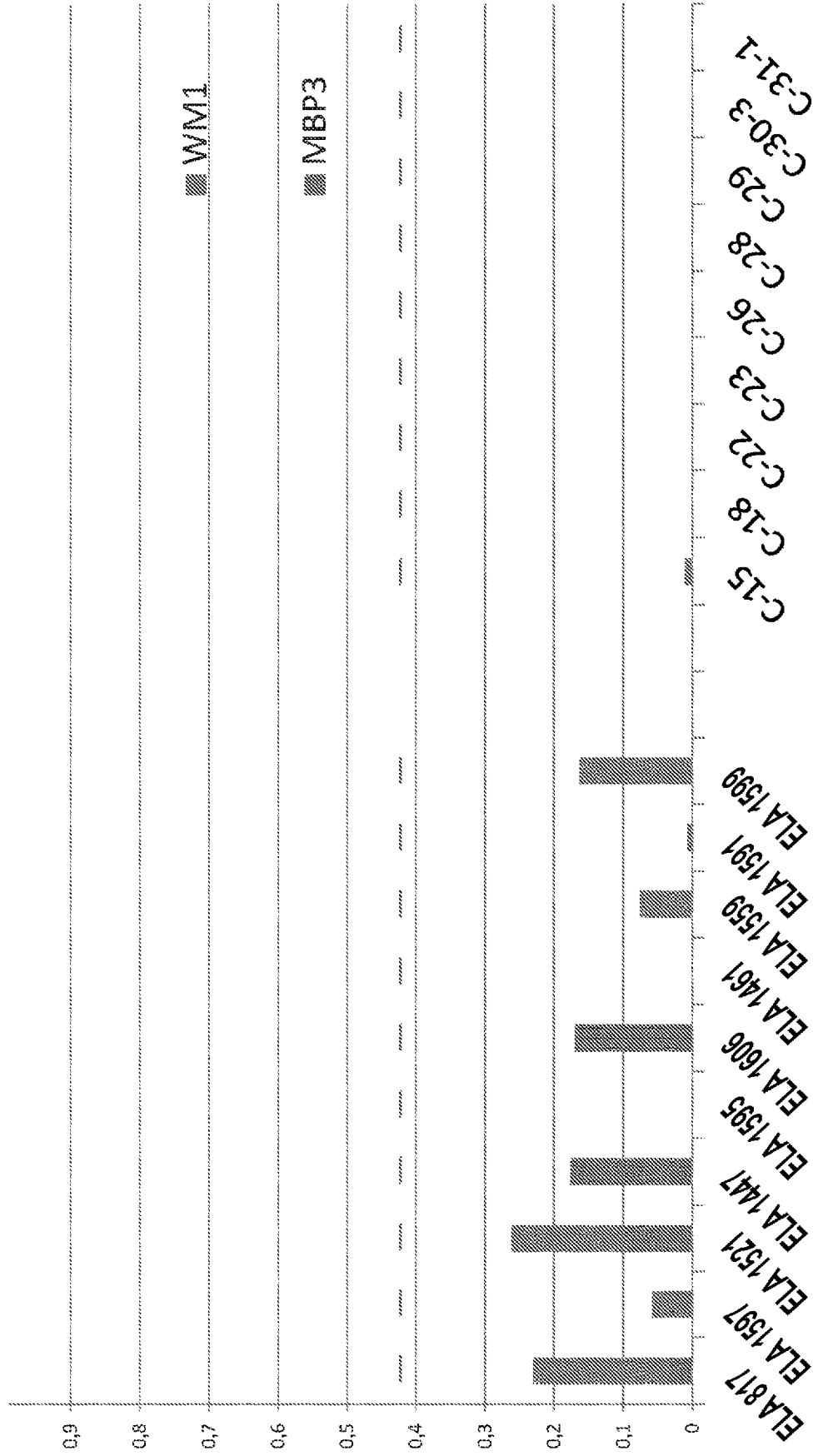


FIG. 14A

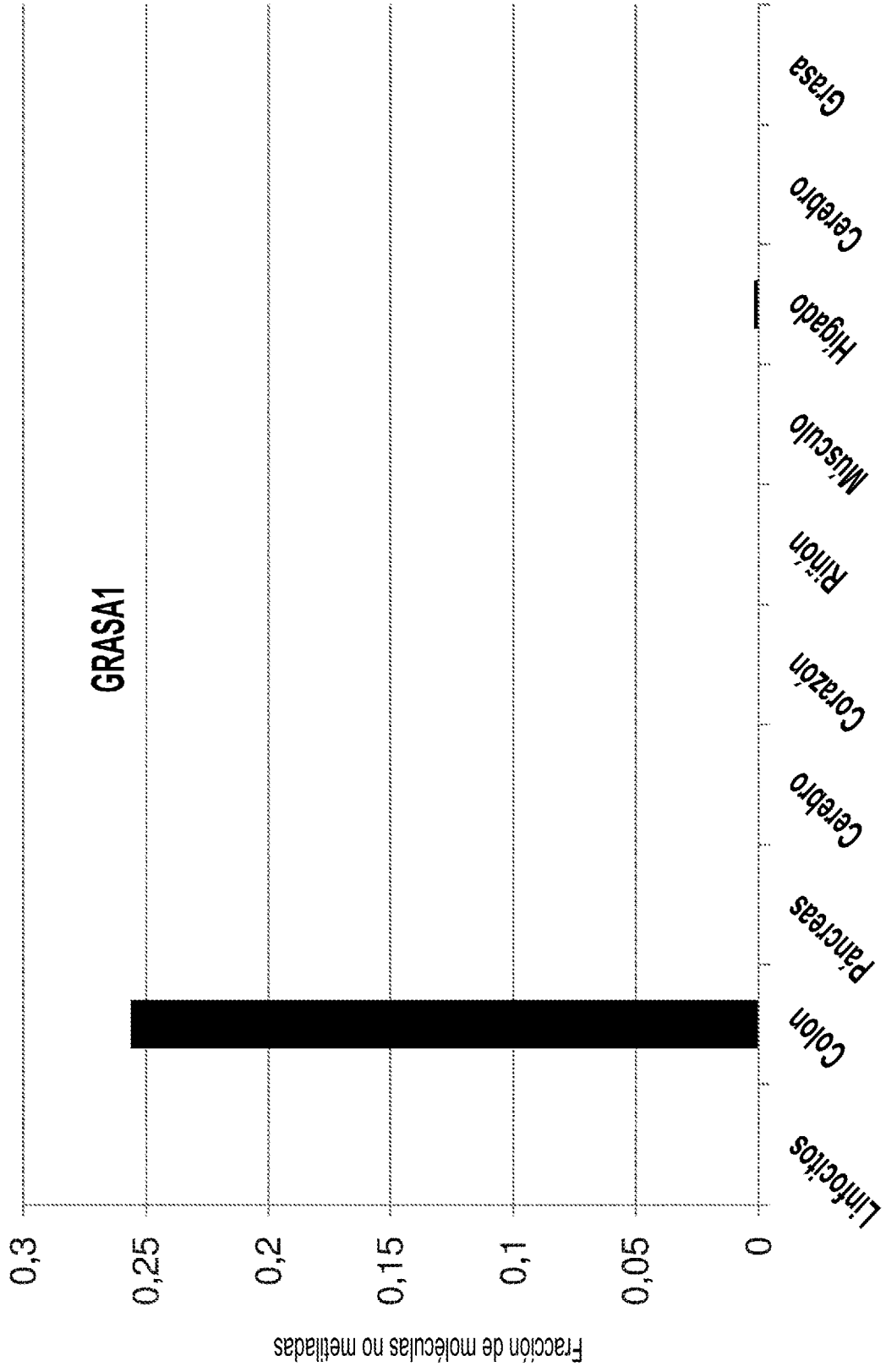


FIG. 14B

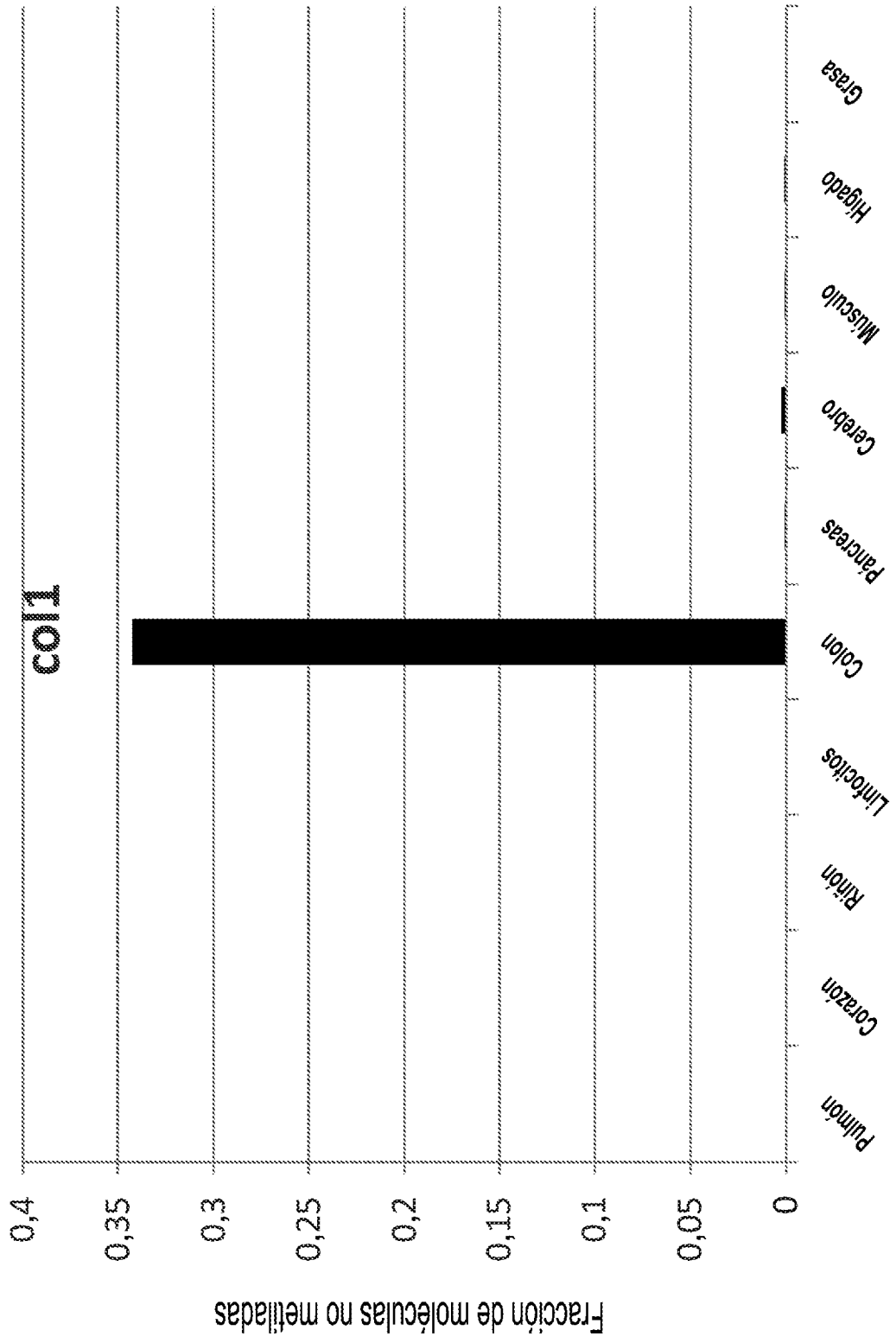


FIG. 14C

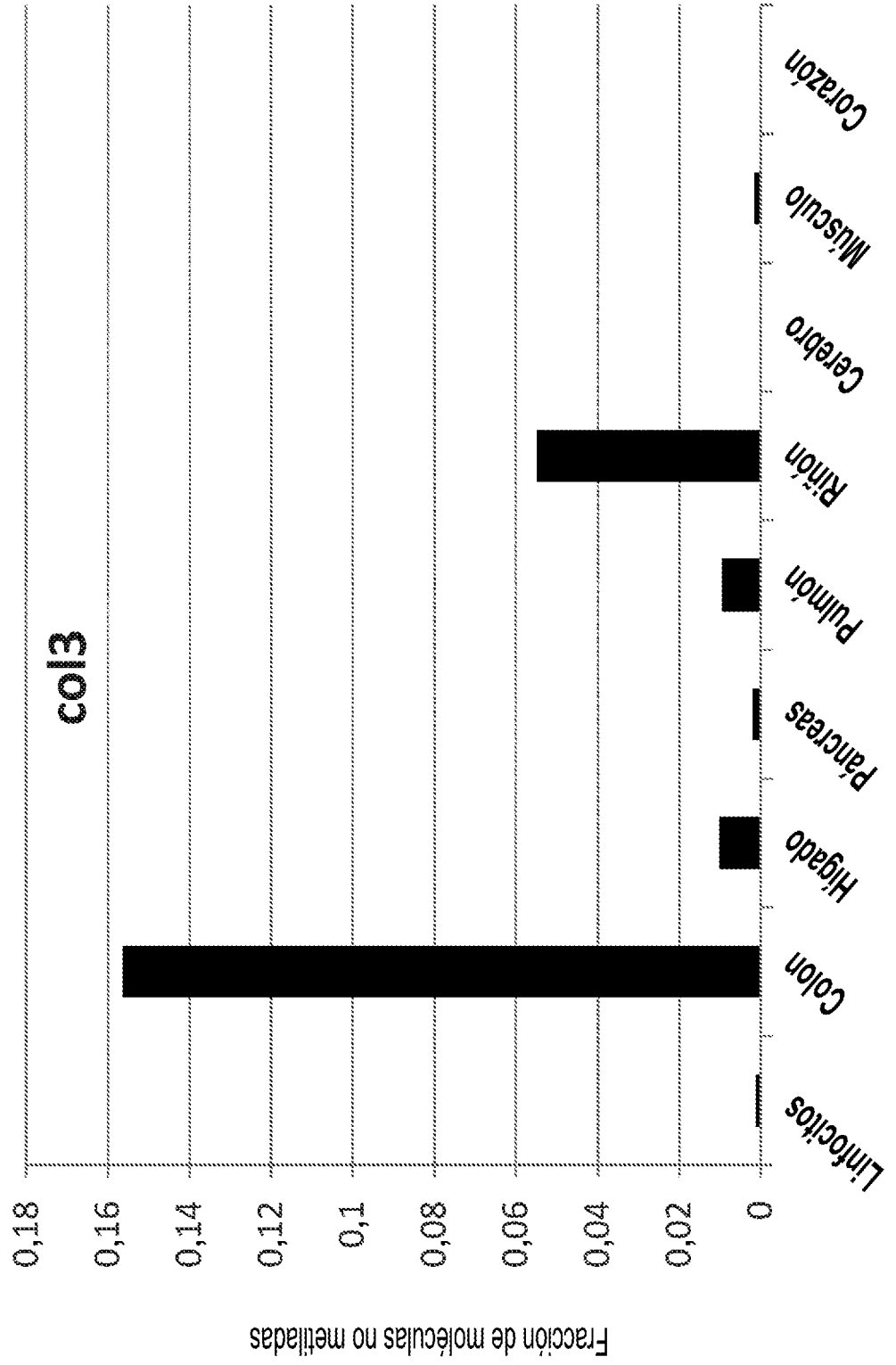


FIG. 14D

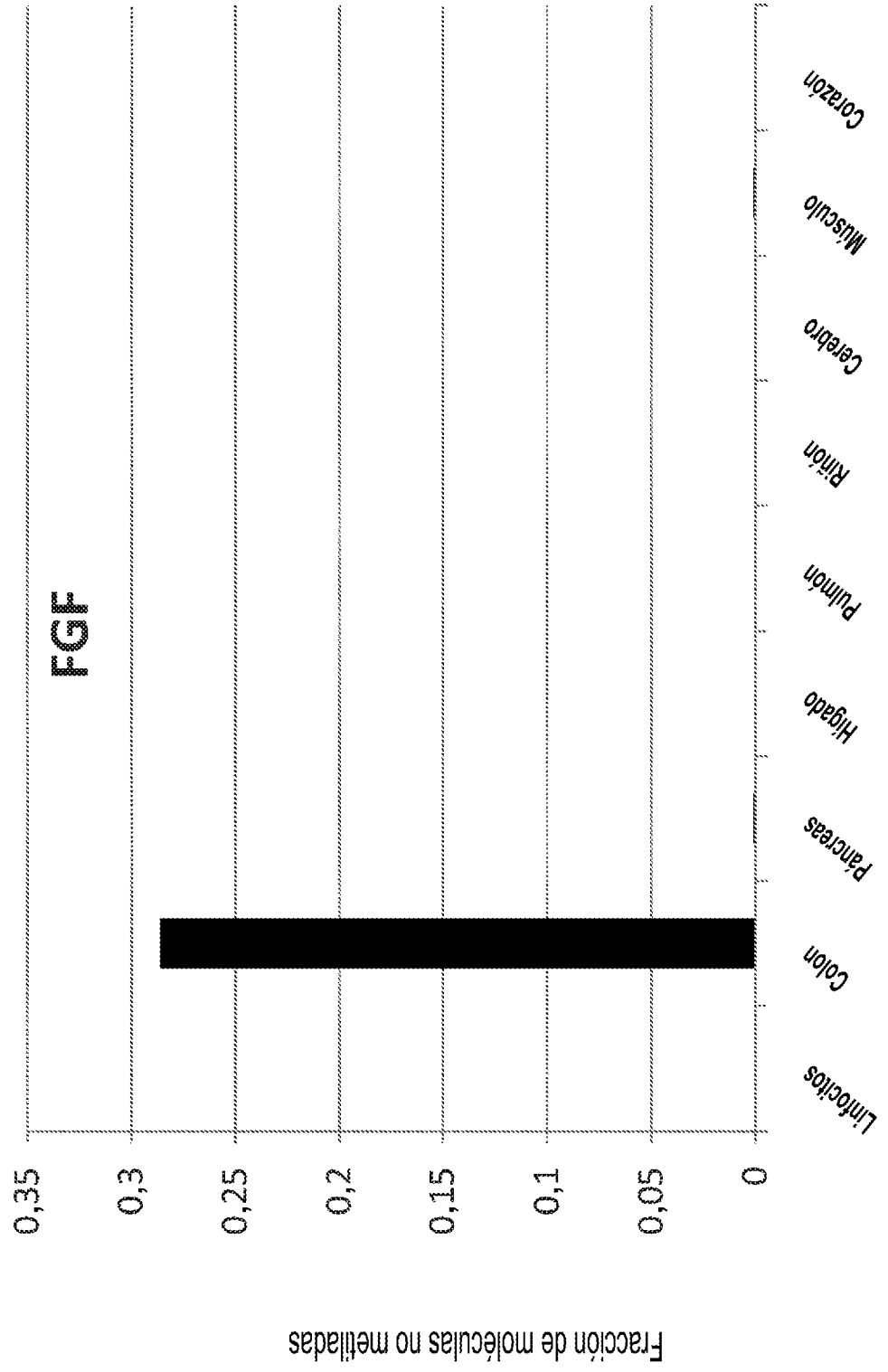


FIG. 15

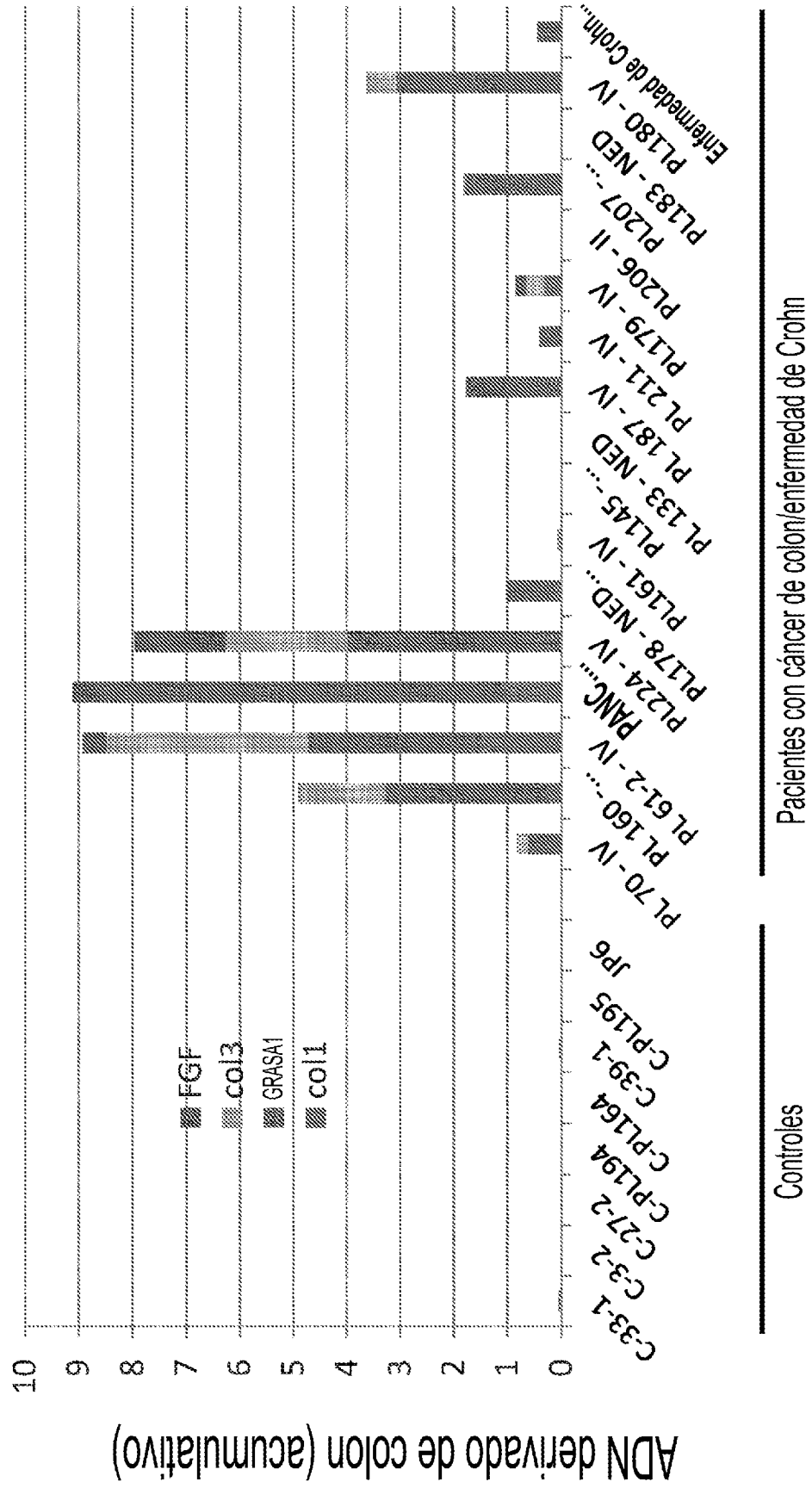


FIG. 16

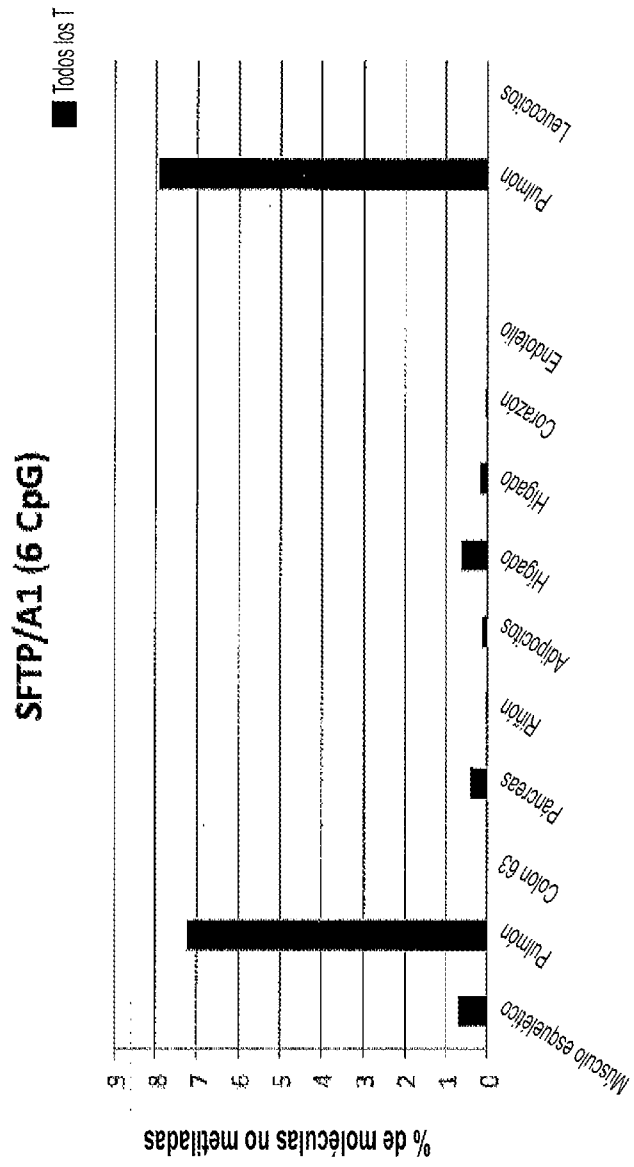
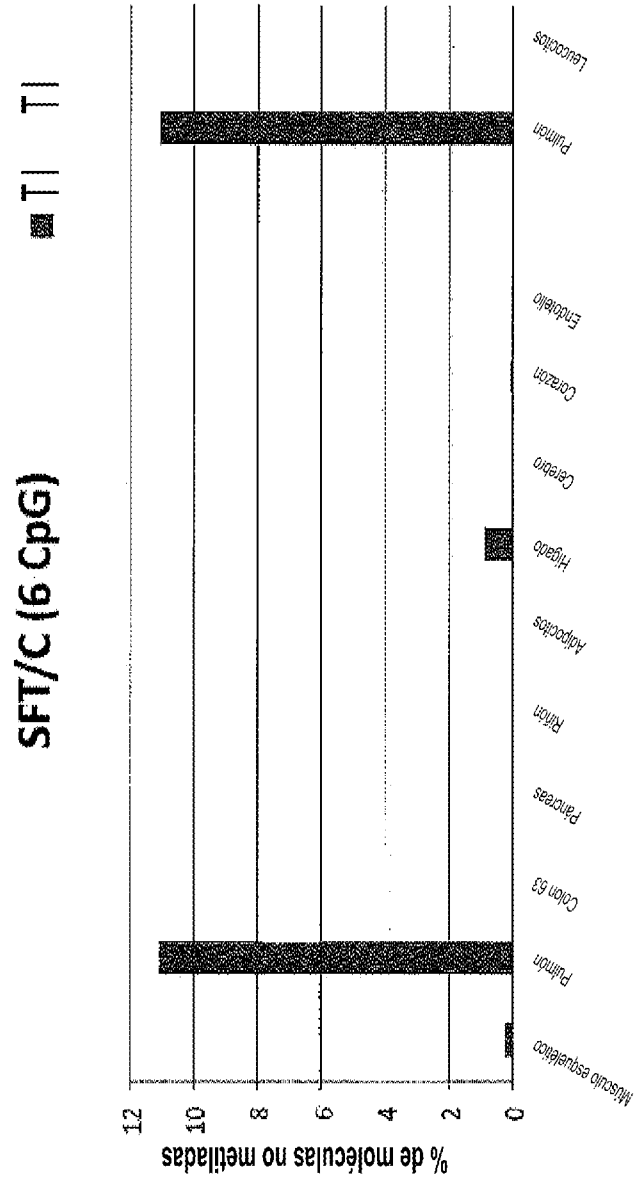


FIG. 17



**FIG. 18**

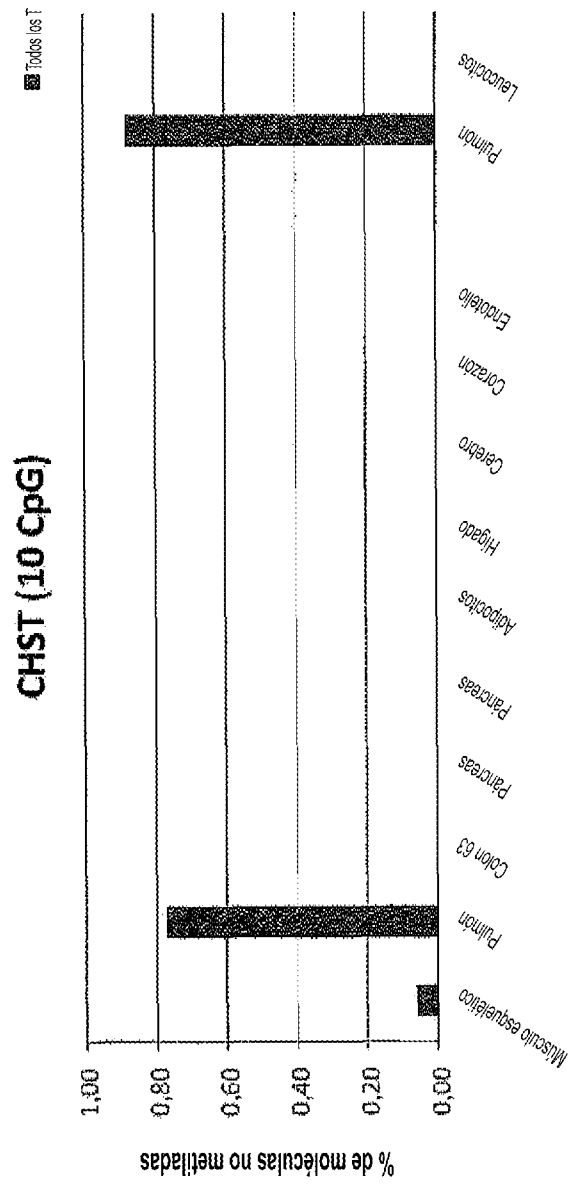
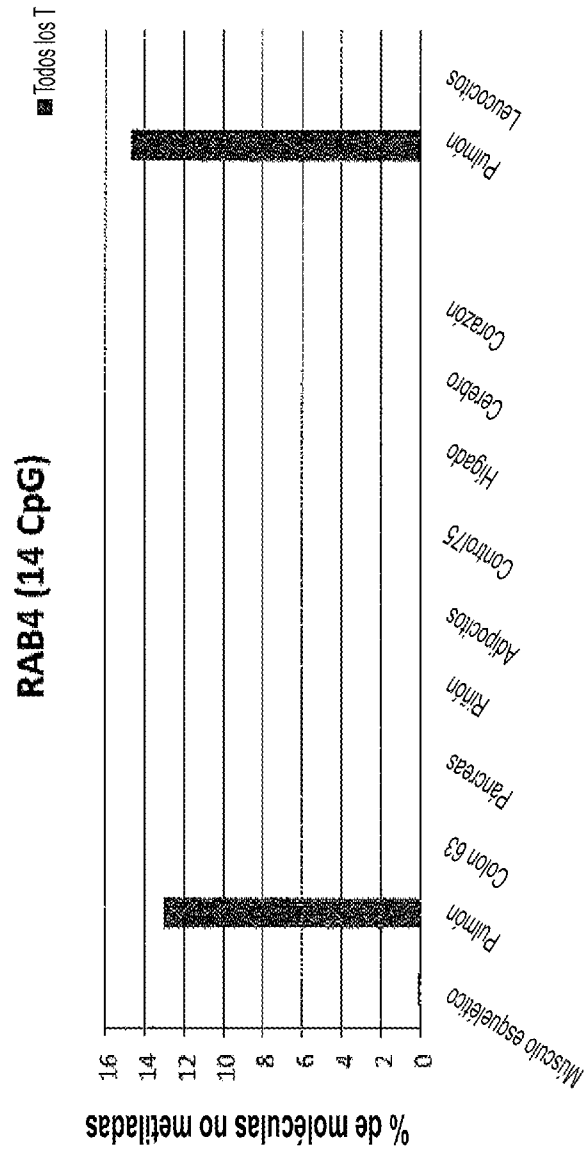


FIG. 19



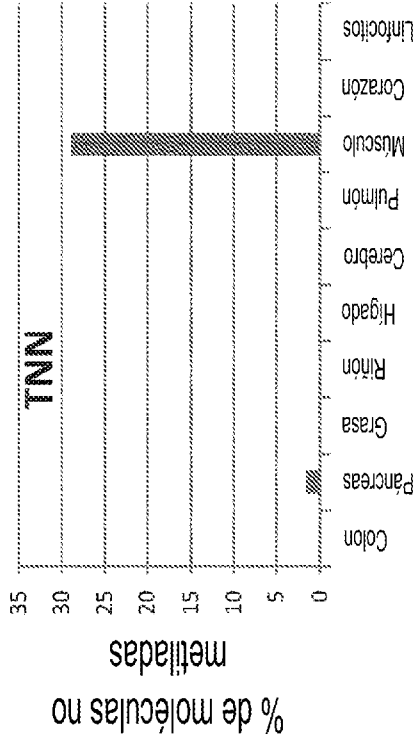


FIG. 20A

FIG. 20C

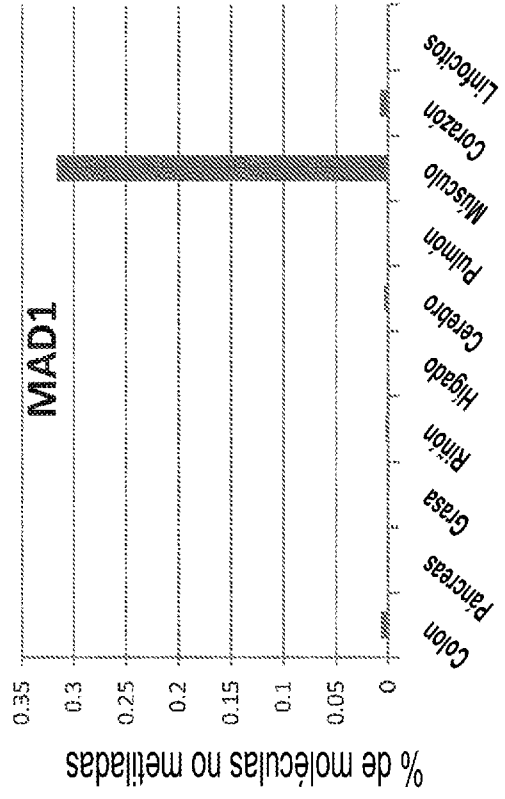


FIG. 20B

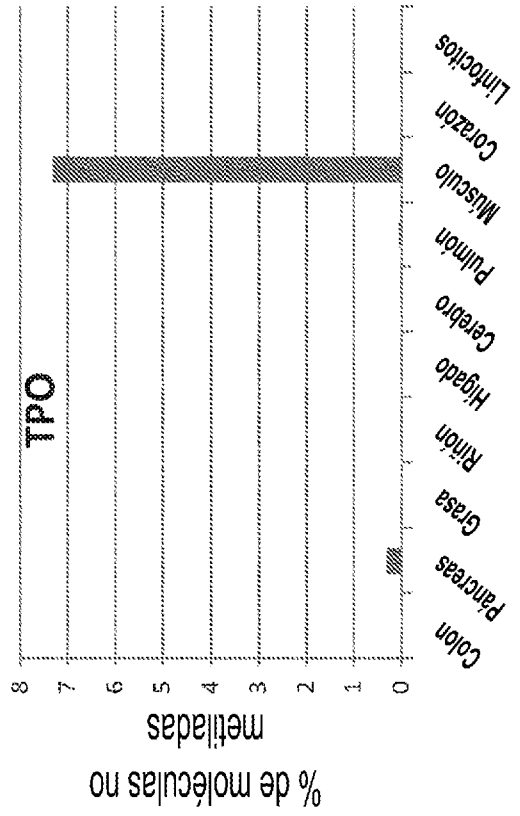


FIG. 21

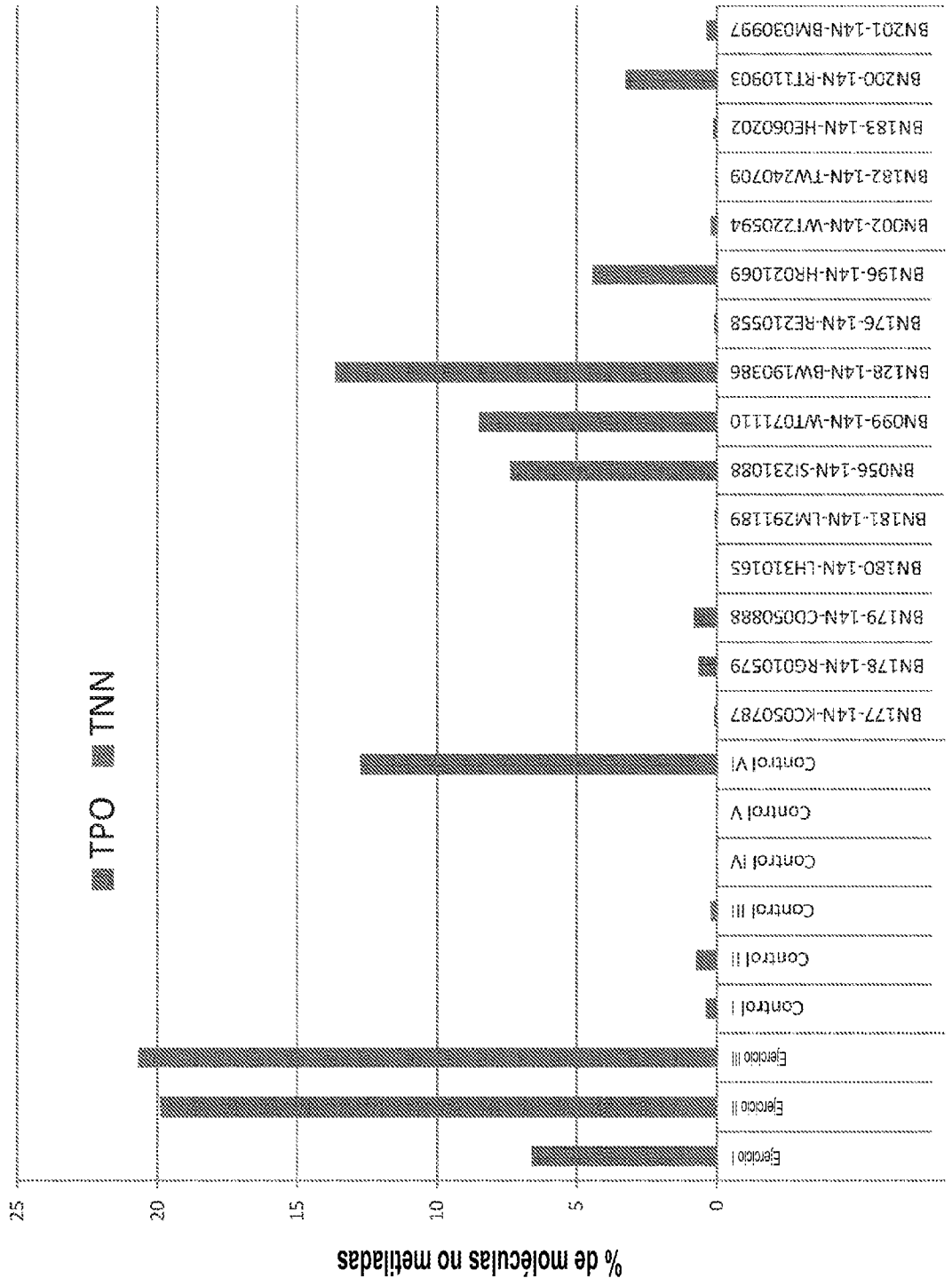


FIG. 22

Marcador endotelial - Panel de tejido DCUN1D2

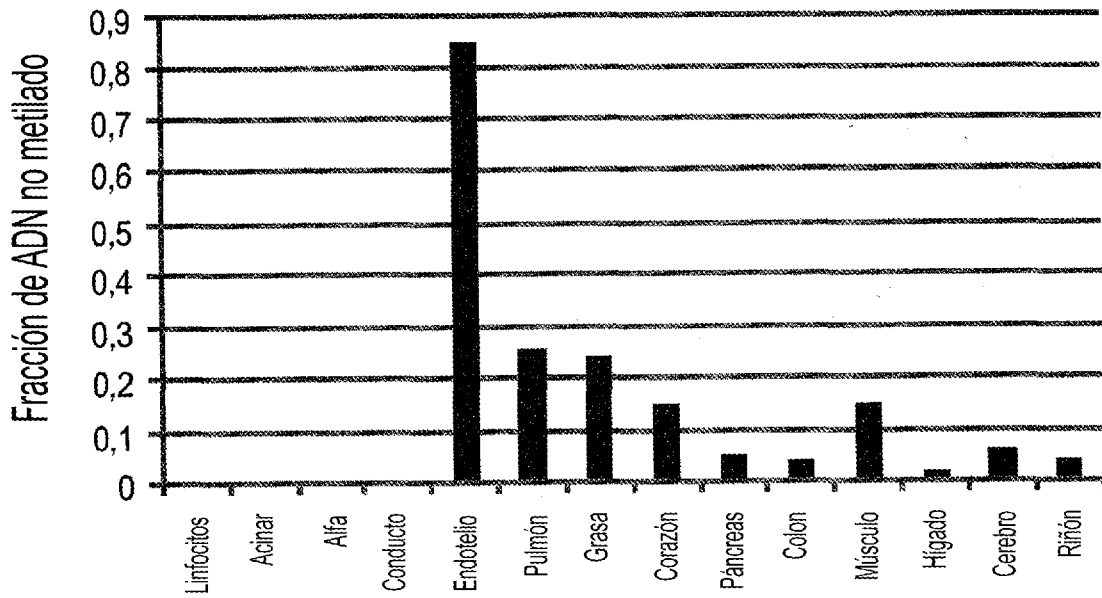
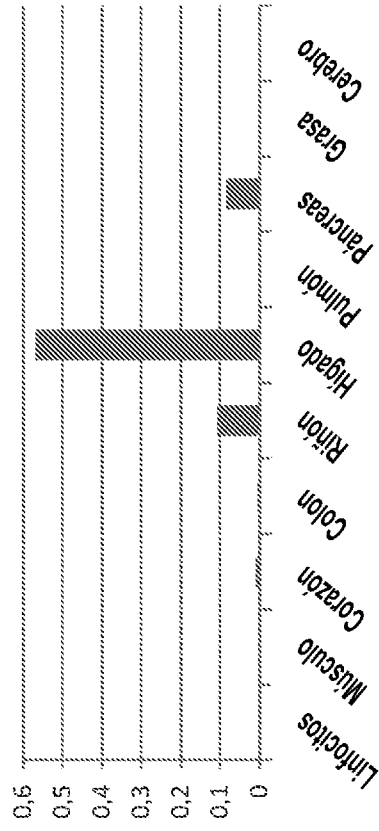
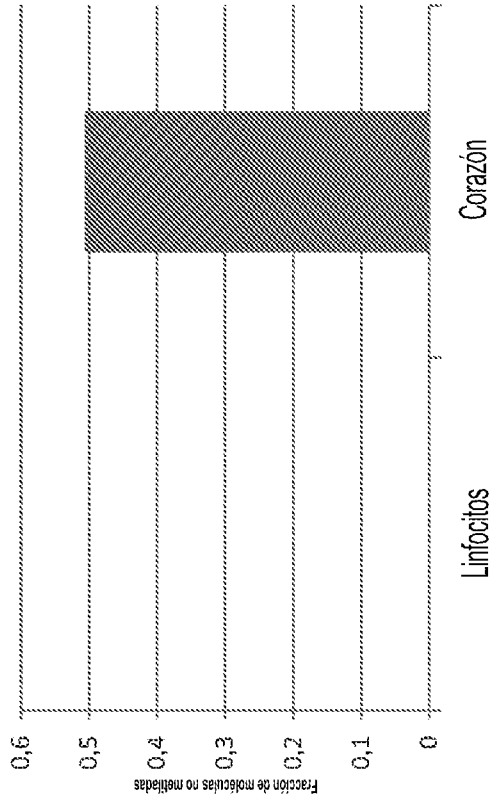


FIG. 23  
Marcador de hígado - panel de  
tejido ALB

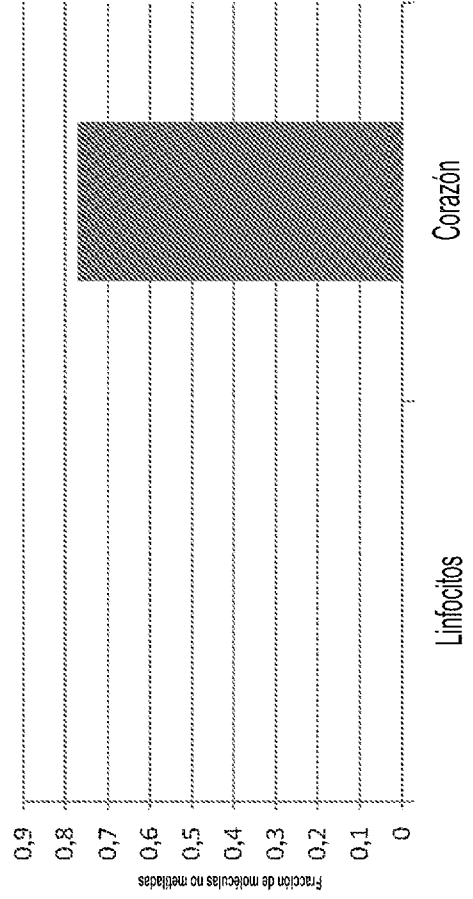


**Marcador de linfocitos-PTPRCAP**



**FIG. 24A**

**Marcador de linfocitos-LOC**



**FIG. 24B**

**FIG. 25**

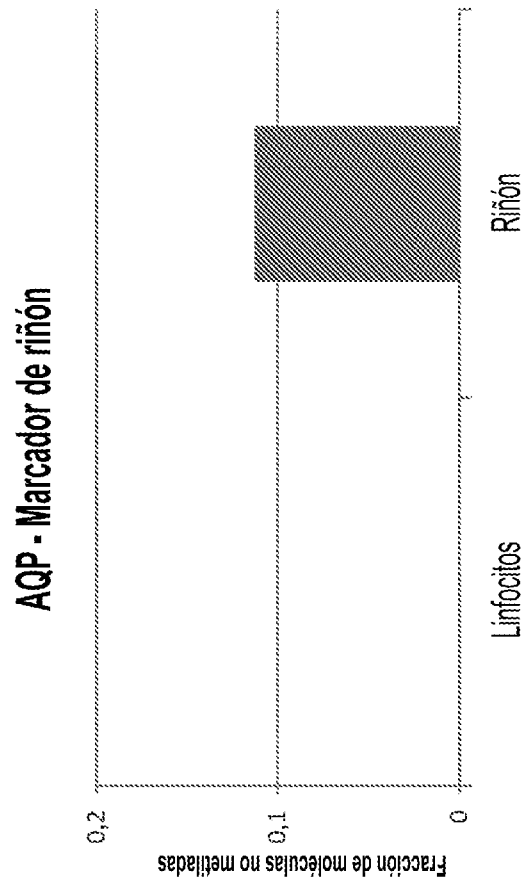


FIG. 26A

ACOT 7 - Marcador de grasa

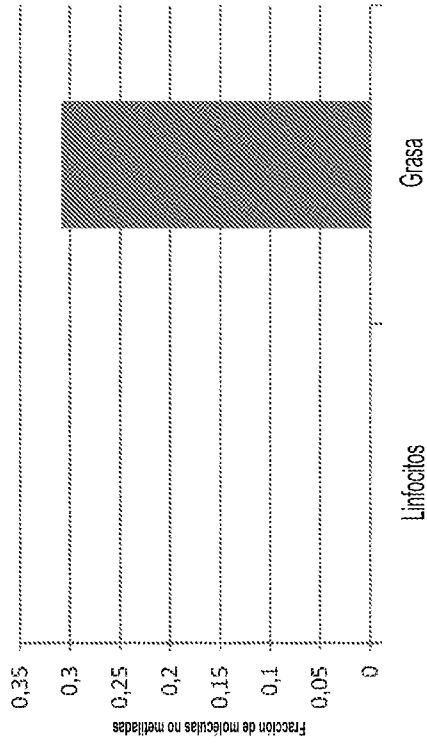


FIG. 26B

FRMD4A - Marcador de grasa

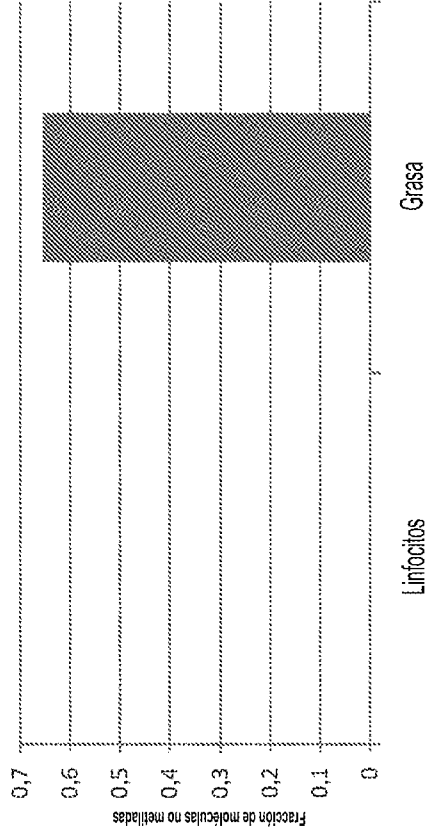


FIG. 26C

COL4A1 - Marcador de grasa

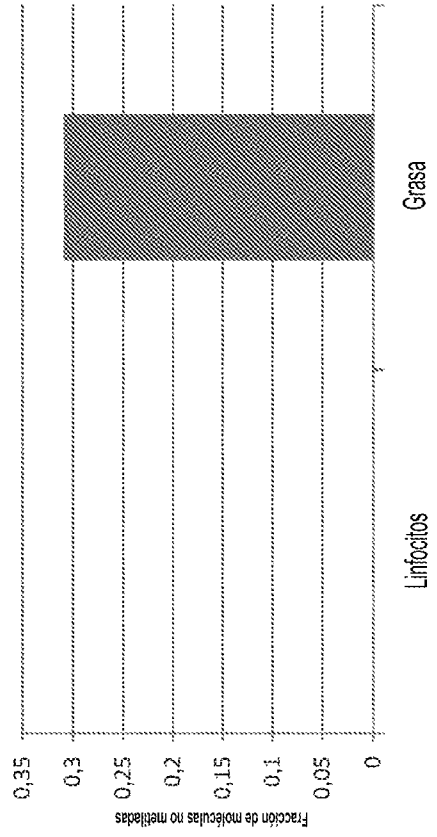


FIG. 26D

NNMT - Marcador de grasa

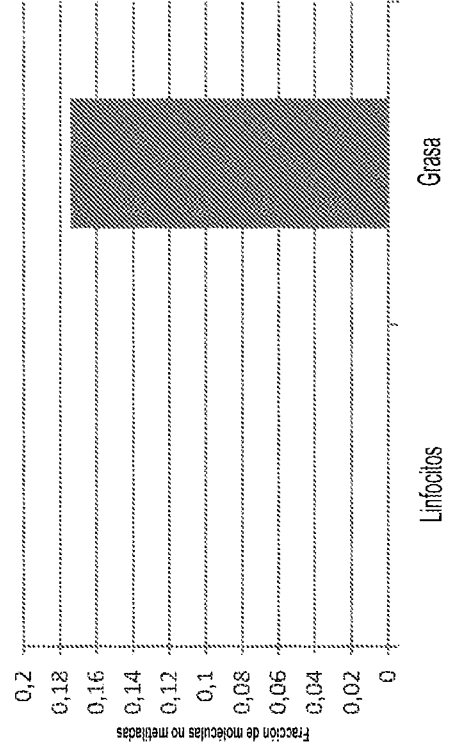


FIG. 27A

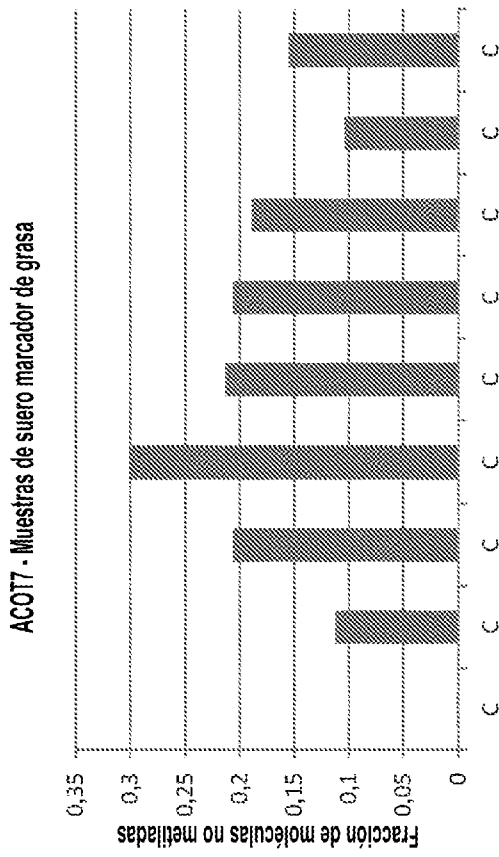


FIG.

27C

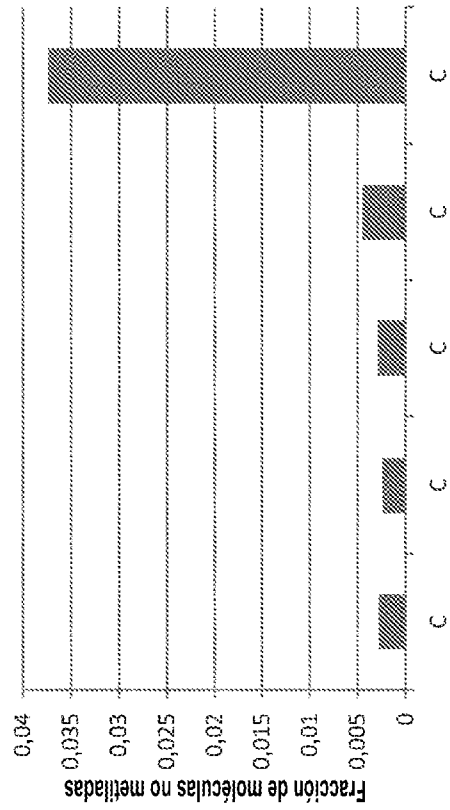


FIG. 27B

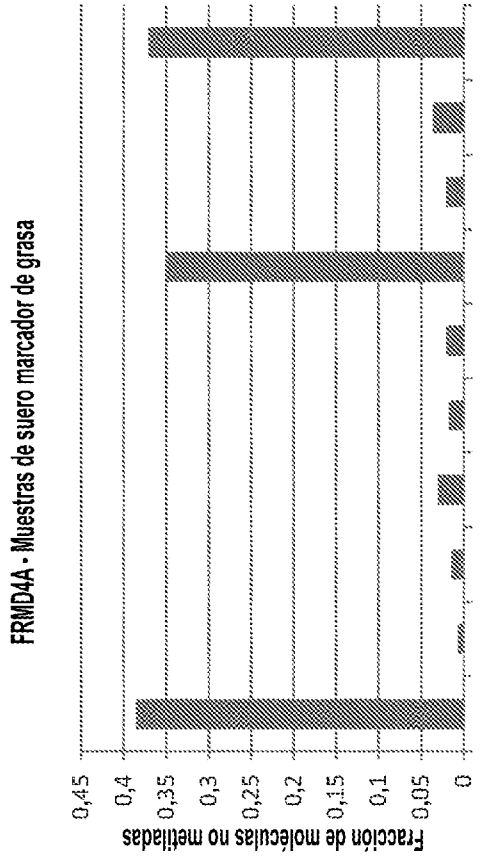


FIG.

27D

