

19



OFICINA ESPAÑOLA DE
PATENTES Y MARCAS

ESPAÑA



11 Número de publicación: **2 936 408**

51 Int. Cl.:

C12Q 1/6858 (2008.01)

12

TRADUCCIÓN DE PATENTE EUROPEA

T3

86 Fecha de presentación y número de la solicitud internacional: **29.09.2017 PCT/KR2017/010907**

87 Fecha y número de publicación internacional: **12.04.2018 WO18066910**

96 Fecha de presentación y número de la solicitud europea: **29.09.2017 E 17858704 (4)**

97 Fecha y número de publicación de la concesión europea: **14.12.2022 EP 3524688**

54 Título: **Método de detección múltiple de ADN metilado**

30 Prioridad:

06.10.2016 KR 20160129110

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

16.03.2023

73 Titular/es:

**GENOMICTREE, INC. (100.0%)
44-6, Techno 10-ro, Yuseong-gu
Daejeon 34027, KR**

72 Inventor/es:

**AN, SUNGWHAN y
OH, TAEJEONG**

74 Agente/Representante:

VALLEJO LÓPEZ, Juan Pedro

ES 2 936 408 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

Método de detección múltiple de ADN metilado

5 **Campo técnico**

La presente divulgación se refiere a un método para detectar ADN metilado usando qMSP (PCR específica de metilación cuantitativa) que comprende:

- 10 (a) tratar una muestra que contiene ADN diana con al menos un reactivo que modifica un sitio de ADN no metilado para distinguirlo de un sitio de ADN metilado;
- (b) construir un cebador inverso, que comprende una secuencia específica de diana diseñada para poder unirse de forma complementaria al ADN diana tratado con el reactivo y un cebador universal que no se une de forma complementaria al ADN diana y el cebador universal está unido al extremo 5' de la secuencia específica de diana;
- 15 (c) realizar una amplificación lineal asimétrica en una dirección para el ADN metilado mediante PCR unidireccional usando, como un molde, el ADN diana tratado con el reactivo en la etapa (a) y usando, como un cebador, el cebador inverso construido en la etapa (b);
- (d) amplificar el ADN diana usando un cebador directo, que es capaz de unirse de manera complementaria al ADN amplificado linealmente en la etapa (c) y un cebador universal que no se une de manera complementaria al ADN
- 20 diana amplificado linealmente; y
- (e) detectar la metilación del ADN diana mediante una sonda capaz de hibridarse de forma complementaria con la secuencia de ADN diana amplificada en la etapa (d).

Antecedentes de la técnica

25 En el ADN genómico de células de mamíferos, existe la quinta base además de A, C, G y T, concretamente, 5-metilcitosina, en la cual un grupo metilo está unido al quinto carbono del anillo de citosina (5-mC). 5-mC siempre está fijada solo a la C de un dinucleótido CG (5'-mCG-3'), que se marca frecuentemente como CpG. La C de CpG está metilada principalmente por unión con un grupo metilo. La metilación de esta CpG inhibe una secuencia repetitiva en

30 los genomas, tales como Alu o transposón, de expresarse. Además, este CpG es un sitio donde aparece con mayor frecuencia un cambio epigenético en células de mamíferos. Los 5 mC de este CpG se desaminan de forma natural a T y, por lo tanto, el CpG en genomas de mamíferos muestra solo el 1 % de frecuencia, que es mucho más bajo que una frecuencia normal ($1/4 \times 1/4 = 6,25\%$).

35 Las regiones en las cuales los CpG están excepcionalmente integrados se conocen como islas CpG. La expresión "islas CpG" hace referencia a sitios que tienen una longitud de 0,2 a 3 kb y tienen un contenido de C+G de más del 50 % y una proporción de CpG de más del 3,75 %. Hay aproximadamente 45.000 islas CpG en el genoma humano y se encuentran principalmente en regiones promotoras que regulan la expresión de genes. Realmente, las islas CpG se encuentran en los promotores de los genes constitutivos y representan aproximadamente el 50 % de los genes

40 humanos. Se sabe que la metilación aberrante del ADN se produce principalmente en la región reguladora 5' del gen para reducir la expresión del gen.

En el presente documento, la región reguladora 5' del gen incluye una región promotora, una región potenciadora y una región no traducida en 5'. Recientemente, un intento de examinar la metilación del promotor de genes relacionados con tumores en sangre, esputo, saliva, heces u orina y usar los resultados examinados para el diagnóstico y

45 tratamiento de varios tipos de cáncer, se ha llevado a cabo activamente.

Es bien sabido que las células anormales del tejido canceroso de los pacientes con cáncer liberan ADN a la sangre mediante procesos que incluyen la apoptosis y la necrosis y, por lo tanto, existen como ADN tumoral libre de células en el suero o plasma de la sangre, y los fragmentos de ADN metilados también están presentes en el ADN tumoral sin células. La presencia de esta metilación aberrante del ADN se ha usado como marcador para diagnosticar el

50 cáncer.

Mientras tanto, generalmente, los métodos para analizar la metilación de genes se realizan mediante la detección de un gen control, que no está implicado en la metilación, por PCR para confirmar la idoneidad de la PCR y la presencia o ausencia de ADN de entrada, y realizar la PCR para detectar la metilación del ADN diana en paralelo a la misma.

55

En particular, como métodos de análisis de metilación por PCR en tiempo real, pueden tomarse en consideración los siguientes métodos: i) un método que usa cebadores independientes de la metilación del ADN diana como cebadores para PCR en tiempo real y usa un cebador de detección específico de metilación, que es capaz de hibridarse con el ADN diana metilado, para la detección del producto de amplificación por PCR; ii) un método que usa cebadores

60 específicos de metilación del ADN diana como cebadores para la PCR en tiempo real y usa una sonda de detección capaz de hibridar con una secuencia independiente de la metilación contenida en el producto de amplificación de la PCR; y iii) un método que usa cebadores específicos de metilación del ADN diana como cebadores para PCR en tiempo real y usa una sonda de detección específica de metilación, que es capaz de hibridarse con ADN diana metilado, para la detección del producto de amplificación por PCR.

65

Sin embargo, todos estos métodos usan ADN no enriquecido directamente como molde y necesariamente usan dos cebadores (directo e inverso) para amplificar el ADN diana, al mismo tiempo. En consecuencia, existe el problema de que se requieren además dos cebadores a la vez cada vez que aumenta la diana a amplificar en un tubo (reactor único).

Los cebadores para PCR múltiplex están diseñados de tal manera que diferentes cebadores en un solo tubo pueden tener propiedades de hibridación similares. La temperatura de hibridación y la concentración de cebador pueden calcularse hasta cierto punto o también pueden usarse empíricamente. Como la hibridación no específica aumenta cada vez que se añade un par de cebadores, las condiciones de reacción deben modificarse siempre que se añada cada par de cebadores. Además, pueden producirse artefactos debido al agotamiento del par de cebadores o similares. Se ha informado sobre el uso de oligonucleótidos etiquetados en 5' en la reacción de PCR. Sin embargo, una característica clave de este método de amplificación es que comprende una etapa de hibridación de cada cebador y aislamiento de las reacciones de extensión del cebador y, por lo tanto, no es adecuado para el concepto real de PCR múltiplex. Por lo tanto, crear las condiciones perfectas para la PCR múltiplex es un proceso muy difícil y costoso. Por tanto, es necesario desarrollar un método de PCR múltiplex capaz de amplificar simultáneamente varias dianas en la misma medida en las mismas condiciones, independientemente de las diversas características de los diferentes cebadores.

Con estos antecedentes técnicos, los autores de esta solicitud han realizado grandes esfuerzos para resolver los problemas descritos anteriormente y desarrollar un método para detectar ADN diana metilado, que tiene un alto límite de detección y precisión, y como resultado, han descubierto que cuando el ADN diana se enriquece mediante amplificación lineal asimétrica usando un oligonucleótido unido a un cebador universal y se detecta usando este ADN diana enriquecido como un molde y un cebador universal se une a un oligonucleótido específico de la diana, el ADN metilado puede detectarse con la alta sensibilidad y precisión deseadas, incluso si solo se añade un cebador para la detección múltiplex del ADN diana, a diferencia de una técnica convencional, completando de este modo la presente divulgación.

Los siguientes documentos fueron citados en el informe de búsqueda suplementario europeo:

D1 (US 2010/028890 A1) se refiere a composiciones, métodos y kits para analizar la metilación del ADN.

D2 (US 2012/0252013 A1) se refiere a métodos para identificar múltiples marcadores de alteración del ADN en un gran fondo de ADN de tipo silvestre.

D3 (US 2010/0144867 A1) se refiere al uso de la metilación del promotor del gen de la lecitina:retinol acil transferasa para evaluar el estado del cáncer de un sujeto.

Divulgación

Problema técnico

Es un objetivo de la presente divulgación proporcionar un método para detectar ADN metilado de manera múltiplex usando un cebador universal.

Solución técnica

Para conseguir el objetivo anterior, la presente divulgación proporciona un método para detectar ADN metilado usando qMSP (PCR específica de metilación cuantitativa), que comprende: (a) tratar una muestra que contiene ADN diana con al menos un reactivo que modifica un sitio de ADN no metilado para distinguirlo de un sitio de ADN metilado; (b) construir un cebador inverso, que comprende una secuencia específica de diana diseñada para poder unirse de forma complementaria al ADN diana tratado con el reactivo y un cebador universal que no se une de forma complementaria al ADN diana y el cebador universal está unido al extremo 5' de la secuencia específica de diana; (c) realizar una amplificación lineal asimétrica en una dirección para el ADN metilado mediante PCR unidireccional usando, como un molde, el ADN diana tratado con el reactivo en la etapa (a) y usando, como un cebador, el oligonucleótido construido en la etapa (b); (d) amplificar el ADN diana usando un oligonucleótido, que es capaz de unirse de manera complementaria al ADN amplificado linealmente en la etapa (c) y un cebador universal que no se une de manera complementaria al ADN diana amplificado linealmente; y (e) detectar la metilación del ADN diana mediante una sonda capaz de hibridarse de forma complementaria con la secuencia de ADN diana amplificada en la etapa (d).

Breve descripción de los dibujos

La FIGURA 1 es una vista conceptual que muestra esquemáticamente un método para la detección múltiplex de ADN diana metilado.

La FIGURA 2 muestra los resultados de comparar la sensibilidad de detección de ADN metilado entre un método de la presente descripción y un método convencional.

La FIGURA 3 muestra esquemáticamente un proceso de diseño de cebadores y una sonda para el ADN diana, que se usan en un método de la presente divulgación.

Las FIGURAS 4a y 4b muestran los resultados de comparar la sensibilidad de detección de ADN metilado entre un método de la presente divulgación, que se realiza usando cebadores y una sonda para el ADN diana, y un método convencional.

5 **Mejor modo**

A menos que se defina de otra manera, todos los términos técnicos y científicos usados en el presente documento tienen el mismo significado que el que entiende generalmente un experto en la materia a la que pertenece la divulgación. Generalmente, la nomenclatura usada en el presente documento y los métodos experimentales, que se describirán a continuación, son los bien conocidos y comúnmente empleados en la técnica.

En un aspecto, la presente divulgación se dirige a un método para detectar ADN metilado usando qMSP (PCR específica de metilación cuantitativa), que comprende las etapas de:

- 15 (a) tratar una muestra que contiene ADN diana con al menos un reactivo que modifica un sitio de ADN no metilado para distinguirlo de un sitio de ADN metilado;
- (b) construir un cebador inverso, que comprende una secuencia específica de diana diseñada para poder unirse de forma complementaria al ADN diana tratado con el reactivo y un cebador universal que no se une de forma complementaria al ADN diana y el cebador universal está unido al extremo 5' de la secuencia específica de diana;
- 20 (c) realizar una amplificación lineal asimétrica en una dirección para el ADN metilado mediante PCR unidireccional usando, como un molde, el ADN diana tratado con el reactivo en la etapa (a) y usando, como un cebador, el oligonucleótido construido en la etapa (b);
- (d) amplificar el ADN diana usando un oligonucleótido, que es capaz de unirse de manera complementaria al ADN amplificado linealmente en la etapa (c) y un cebador universal que no se une de manera complementaria al ADN
- 25 diana amplificado linealmente; y
- (e) detectar la metilación del ADN diana mediante una sonda capaz de hibridarse de forma complementaria con la secuencia de ADN diana amplificada en la etapa (d).

En la presente divulgación, se desarrolló un método capaz de diagnosticar enfermedades tempranamente mediante la detección de ADN metilado con alta sensibilidad y se examinó el rendimiento del método. En un ejemplo de la presente divulgación, un gen de control interno y un ADN diana primero se amplificaron linealmente usando una secuencia específica de diana capaz de unirse de manera complementaria al ADN diana y un cebador universal que no se une de manera complementaria al ADN diana unido a la secuencia específica de diana, y después el ADN metilado se analizó mediante un método de detección que usa un oligonucleótido capaz de unirse de manera complementaria a una secuencia complementaria al ADN diana, una sonda capaz de hibridarse de forma complementaria con la secuencia de ADN diana, y el cebador universal que no se une de forma complementaria al ADN diana amplificado linealmente. Como resultado, se confirmó que el método de la presente descripción podría detectar ADN metilado con mayor sensibilidad y precisión que un método convencional.

40 Específicamente, el ADN fecal derivado de una persona normal y el ADN fecal derivado de pacientes con cáncer colorrectal en cada fase, se trataron con bisulfito y las citosinas no metiladas se convirtieron en uracilo, y después los ADN se amplificaron linealmente usando un oligonucleótido que es capaz de unirse específicamente a SDC2 metilado (ADN diana) y COL2A1 (control interno) y capaz de unirse de manera complementaria al ADN diana fusionado con un cebador universal, después de lo cual se realizó PCR en tiempo real usando una sonda específica capaz de hibridarse con cada sonda diana, un oligonucleótido capaz de unirse de forma complementaria a una secuencia complementaria al ADN diana y el cebador universal (FIGURA 1). Como resultado, pudo confirmarse que el método de la presente divulgación podría detectar ADN metilado con mayor sensibilidad y precisión que una qMSP (PCR específica de metilación cuantitativa) convencional realizada usando un cebador que no comprende el cebador universal (FIGURAS 2 y 4).

En la presente divulgación, la etapa (a) es una etapa de tratar una muestra que contiene ADN diana con al menos un reactivo que modifica un sitio de ADN no metilado para distinguirlo de un sitio de ADN metilado.

"Metilación" como se usa en la presente divulgación significa que un grupo metilo se une al 5° átomo de carbono del anillo base de citosina para formar 5-metilcitosina (5-mC). La 5-metilcitosina (5-mC) siempre está fijada solo a la C de un dinucleótido CG (5'-mCG-3'), que se marca frecuentemente como CpG. La C de CpG está metilada principalmente por unión con un grupo metilo. La metilación de esta CpG inhibe una secuencia repetitiva en los genomas, tales como Alu o transposón, de expresarse. Además, este CpG es un sitio donde aparece con mayor frecuencia un cambio epigenético en células de mamíferos. Los 5 mC de este CpG se desaminan de forma natural a T y, por lo tanto, el CpG en genomas de mamíferos muestra solo el 1 % de frecuencia, que es mucho más bajo que una frecuencia normal ($1/4 \times 1/4 = 6,25 \%$).

Las regiones en las cuales los CpG están excepcionalmente integrados se conocen como islas CpG. La expresión "islas CpG" hace referencia a sitios que tienen una longitud de 0,2 a 3 kb y tienen un contenido de C+G de más del 50 % y una proporción de CpG de más del 3,75 %. Hay aproximadamente 45.000 islas CpG en el genoma humano y se encuentran principalmente en regiones promotoras que regulan la expresión de genes. Realmente, las islas CpG

se encuentran en los promotores de los genes constitutivos y representan aproximadamente el 50 % de los genes humanos.

5 La presencia de metilación de CpG en el ADN diana puede ser un indicador de enfermedad. Por ejemplo, puede medirse la metilación de CpG de cualquiera del promotor, la región 5' no traducida y el intrón del ADN diana.

10 Un gen que contiene CpG es generalmente ADN. Sin embargo, el método de la presente divulgación puede aplicarse a una muestra que contiene ADN o una muestra que contiene ADN y ARN, incluyendo ARNm, en donde el ADN o el ARN pueden ser monocatenarios o bicatenarios. Alternativamente, la muestra también puede ser una muestra que contenga un híbrido de ADN-ARN.

15 También puede usarse una mezcla de ácidos nucleicos. Como se usa en el presente documento, el término "múltiplex" incluye tanto el caso en el que hay una pluralidad de regiones de secuencias nucleicas específicas a detectar en un tipo de gen como el caso en el que un único tubo (reactor único) incluye una pluralidad de ADN diana. La secuencia de ácido nucleico específica a detectar puede ser una fracción molecular grande y la secuencia específica puede estar presente desde el principio en forma de una molécula aislada que constituye la secuencia de ácido nucleico completa. La secuencia de ácido nucleico no necesita ser un ácido nucleico presente en forma pura, y el ácido nucleico puede ser una pequeña fracción en una mezcla compleja tal como una que contiene el ADN humano completo.

20 Específicamente, la presente divulgación se dirige a un método para detectar una pluralidad de metilaciones de ADN diana en muestras en un solo reactor, en donde la muestra puede contener una pluralidad de múltiples ADN diana. El ADN diana puede usarse sin limitación siempre que no sea solo un gen control, sino también cualquier gen que afecte al desarrollo o la progresión del cáncer cuando su expresión se inhibe por una metilación anormal.

25 La muestra puede derivar del cuerpo humano. Por ejemplo, la muestra puede proceder de pacientes con cáncer de hígado, glioblastoma, cáncer ovárico, cáncer de colon, cáncer de cabeza y cuello, cáncer de vejiga, cáncer de células renales, cáncer gástrico, cáncer de mama, cáncer metastásico, cáncer de próstata, cáncer de páncreas o cáncer de pulmón. En la presente divulgación, la muestra puede ser cualquiera seleccionada de entre tejido sólido o líquido, células, heces, orina, sangre, suero y plasma.

30 Puede usarse sin limitación al menos un reactivo que modifica un sitio de ADN no metilado para distinguirlo de un sitio de ADN metilado siempre que pueda distinguir entre una base de citosina no metilada y una base de citosina metilada. Por ejemplo, el reactivo puede ser uno o más seleccionados de entre bisulfito, sulfito de hidrógeno, disulfito y combinaciones de los mismos, pero no se limita a los mismos. Específicamente, una base de citosina metilada por el reactivo no se convierte, pero una base de citosina no metilada por el reactivo puede convertirse en uracilo o en otra base distinta de citosina.

40 En la presente divulgación, la etapa (b) es una etapa de construcción de un oligonucleótido, que comprende una secuencia específica de diana diseñada para ser capaz de unirse de manera complementaria al ADN diana tratado con el reactivo y un cebador universal que no se une de manera complementaria al ADN diana.

45 Para PCR múltiplex común, los pares de cebadores directos e inversos, que corresponden al número de dianas, debe construirse y usarse simultáneamente. Sin embargo, en el método de la presente divulgación, solo puede usarse una secuencia específica de la diana (cebador inverso) capaz de unirse de manera complementaria a una secuencia de ADN diana mediante un cebador universal en un proceso de PCR en tiempo real para detectar simultáneamente varios ADN metilados múltiples y solo puede usarse un oligonucleótido (cebador directo) capaz de unirse de forma complementaria al ADN amplificado linealmente en el mismo número que las dianas a detectar. En consecuencia, solo puede usarse una pequeña cantidad de cebadores para la detección simultánea de la metilación de varias dianas y, por lo tanto, se reducen la complejidad de la PCR y la variación de la eficiencia de la PCR.

50 La secuencia específica de diana es una secuencia capaz de unirse de forma complementaria a un ADN diana y, como la secuencia específica de diana, una secuencia capaz de unirse de forma complementaria a un sitio metilado del ADN diana, así como una secuencia capaz de unirse de manera complementaria a un sitio no metilado del ADN diana también puede usarse selectivamente.

55 La secuencia específica de diana puede comprender, por ejemplo, uno o más dinucleótidos CpG. Específicamente, la secuencia específica de la diana puede comprender una secuencia que tiene una identidad de al menos el 50 %, específicamente, al menos el 55 %, el 60 %, el 70 %, el 80 % o el 90 %, con una o más secuencias seleccionadas del grupo que consiste en secuencias representadas por SEQ ID NO: 2, 5, 9, 14, 17, 21 y 26.

60 El cebador universal que puede usarse en la presente divulgación puede unirse a cualquiera de una secuencia específica de diana (cebador inverso) capaz de unirse de forma complementaria a una secuencia de ADN diana y un oligonucleótido (cebador directo) capaz de unirse de forma complementaria a la secuencia de ADN linealmente amplificado o tanto el cebador inverso como el cebador directo.

65 El cebador universal puede usarse sin limitación siempre que comprenda una secuencia de nucleótidos que no se una

de forma complementaria a un ADN diana amplificable independientemente del ADN diana, pero, por ejemplo, puede comprender una secuencia de nucleótidos que no está presente en el genoma humano. Específicamente, el cebador universal puede comprender una secuencia que tiene una identidad de al menos el 50 %, específicamente, al menos el 55 %, el 60 %, el 70 %, el 80 % o el 90 %, con una secuencia de nucleótidos representada por SEQ ID NO: 7.

5 Además, el cebador universal puede comprender una secuencia tal como T7, SP6, M13 o similares, pero no se limita a los mismos.

Además, el cebador universal puede ser una o más secuencias seleccionadas del grupo que consiste en secuencias representadas por SEQ ID NO: 35 a 41. El cebador universal puede ser, por ejemplo, una secuencia T7 de 5'-TAATACGACTCACTATAGG-3' (SEQ ID NO: 35), una secuencia SP6 de 5'-TATTTAGGTGACACTATAG-3' (SEQ ID NO: 36) o una secuencia M13 de 5'-GTAAAACGACGGCCAG-3 (SEQ ID NO: 37: -20F), 5'-GTTTTCCAGTCACGAC-3' (SEQ ID NO: 38: -40F), 5'-CGCCAGGGTTTTCCAGTCACGAC-3' (SEQ ID NO: 39: - 47F), 5'-GAAACAGCTATGACCATG-3' (SEQ ID NO: 40: R) o 5'-AGCGGATAACAATTTACACAGG-3' (SEQ ID NO: 41: -48R).

15 El método de la presente divulgación comprende una etapa (c) de realizar una amplificación lineal asimétrica usando, como un molde, el ADN diana tratado con el reactivo en la etapa (a) y usando, como un cebador, el oligonucleótido construido en la etapa (b).

20 Un ADN tratado con bisulfito en un proceso de PCR en tiempo real a través de la etapa (c) no se usó de inmediato, sino que se usó un ADN amplificado linealmente y, por lo tanto, la tasa de detección y la sensibilidad de detección son excelentes (FIGURAS 2 y 4).

25 En la presente divulgación, solo un ADN diana se amplifica asimétricamente de forma lineal en una dirección y, por lo tanto, esto conduce al enriquecimiento del ADN diana. En una realización, la amplificación lineal para enriquecer un ADN diana metilado puede realizarse mediante PCR unidireccional usando como cebador un oligonucleótido que comprende un cebador universal, que no se une de manera complementaria al ADN diana, unido al extremo 5' de una secuencia específica de diana.

30 La amplificación lineal significa que un producto de amplificación se produce linealmente con respecto al número de ciclos de amplificación, incluyendo la desnaturalización bicatenaria, la hibridación de cebadores y la síntesis de ácidos nucleicos. La amplificación lineal se distingue de una reacción en cadena de la polimerasa (PCR) que produce un producto de amplificación exponencialmente con respecto al número de ciclos de amplificación.

35 A continuación, el método de la presente divulgación comprende una etapa (d) de amplificación del ADN diana usando un oligonucleótido, que es capaz de unirse de forma complementaria al ADN linealmente amplificado en la etapa (c) y al cebador universal.

40 En algunos casos, la etapa (d) puede comprender además una etapa de detección de la metilación del ADN diana mediante el uso de un cebador de autoinforme o marcado de transferencia de energía.

45 Como se usa en el presente documento, el término "autoinforme" también se denomina "marcado con transferencia de energía" y puede usarse indistintamente con "marcado de transferencia de energía". Como se usa en el presente documento, "cebador universal de autoinforme" puede usarse indistintamente con la expresión "cebador marcado de transferencia de energía".

50 "Autoinforme" o "marcado de transferencia de energía" significa que el cebador es capaz de autoinactivarse o autosondarse de tal manera que cuando no se produce la amplificación, no se emite fluorescencia debido a la autoinactivación, pero cuando se produce la amplificación, se libera la inactivación y se emite fluorescencia. Las sustancias autoinformadas o etiquetadas de transferencia de energía incluyen, pero no se limita a, sondas TaqMan, fluoróforos y balizas moleculares.

55 En un ejemplo, el oligonucleótido (cebador directo) capaz de unirse de manera complementaria al ADN amplificado linealmente puede comprender una secuencia capaz de unirse de manera complementaria al ADN diana construido en la etapa (d) y amplificar el ADN diana, por ejemplo, uno o más dinucleótidos CpG.

Específicamente, el oligonucleótido puede comprender una secuencia que tiene una identidad de al menos el 50 %, específicamente, al menos el 55 %, el 60 %, el 70 %, el 80 % o el 90 %, con una o más secuencias seleccionadas del grupo que consiste en secuencias representadas por SEQ ID NO: 1, 4, 8, 10 a 13, 15, 16, 18 a 20, 22 a 25, 27 y 28.

60 La descripción del cebador universal se aplica de la misma manera que en la etapa (b) como se mencionó anteriormente.

65 El método de la presente divulgación comprende una etapa (e) de detección de la metilación del ADN diana mediante una sonda capaz de hibridarse de forma complementaria con la secuencia de ADN diana amplificada en la etapa (d).

En un ejemplo, la detección de la metilación puede realizarse por cualquier método seleccionado del grupo que

consiste en PCR, PCR específica de metilación, PCR específica de metilación en tiempo real, PCR que usa proteína de unión específica de ADN metilado, PCR que usa anticuerpo de unión específica de ADN metilado, PCR cuantitativa, ensayo de chip de ADN, secuenciación, Secuenciación por síntesis y Secuenciación por ligación.

5 Método para la detección de la metilación

(1) PCR específica de metilación:

10 Cuando el ADN genómico se trata con bisulfito para detectar la metilación mediante la PCR específica de metilación, la citosina en la región 5'-CpG-3' permanece intacta, si estuviera metilada, pero la citosina cambia a uracilo, si no estuviera metilada. En consecuencia, basándose en la secuencia de bases transformada después del tratamiento con bisulfito, se construyen conjuntos de cebadores de PCR correspondientes a una región que tiene la secuencia de bases 5'-CpG-3'. Cuando el ADN genómico se amplifica por PCR, el producto de PCR se detecta en la mezcla de PCR empleando los cebadores correspondientes a la secuencia de bases metiladas, si el ADN genómico estaba metilado, 15 y esta metilación puede analizarse cuantitativamente mediante electroforesis en gel de agarosa. En el presente documento, la sonda para la detección de metilación puede ser una sonda TaqMan, una sonda de baliza molecular o una sonda de autoinforme o marcada de transferencia de energía, pero no se limita a los mismos.

20 (2) PCR específica de metilación en tiempo real

La PCR específica de metilación en tiempo real es un método de medición en tiempo real modificado del método de PCR específica de metilación y comprende el tratamiento de ADN genómico con bisulfito, el diseño de cebadores de PCR correspondientes a la secuencia de bases metilada y realizar PCR en tiempo real usando los cebadores. Los métodos para detectar la metilación del ADN genómico incluyen dos métodos: un método de detección usando una sonda TaqMan complementaria a la secuencia de bases amplificada; y un método de detección usando Sybergreen. Por lo tanto, la PCR específica a la metilación en tiempo real permite realizar un análisis cuantitativo selectivo del ADN metilado. En el presente documento, se representa una curva patrón usando una muestra de ADN metilado *in vitro* y un gen que no contiene la secuencia '-CpG-3'' en la secuencia de bases también se amplifica como un grupo de control negativo para la normalización para analizar cuantitativamente el grado de metilación. 25

30 (3) PCR que usa proteína de unión específica de ADN metilado, PCR cuantitativa, y ensayo de chip de ADN

35 Cuando una proteína que se une específicamente a ADN metilado se mezcla con ADN, la proteína se une específicamente solo al ADN metilado. Por lo tanto, la PCR que usa una proteína de unión específica de metilación o un ensayo de chip de ADN permiten el aislamiento selectivo de solo ADN metilado.

Además, la metilación del ADN también puede medirse mediante un método de PCR cuantitativa y el ADN metilado aislado con una proteína de unión específica de ADN metilado puede marcarse con una sonda fluorescente e hibridarse con un chip de ADN que contiene sondas complementarias, midiendo de esta manera la metilación del ADN. 40

(4) Detección de metilación diferencial - método de secuenciación con bisulfato

45 Otro método para detectar un ácido nucleico que contiene CpG metilado comprende las etapas de: poner en contacto una muestra que contiene ácido nucleico con un agente que modifica citosina no metilada; y amplificar el ácido nucleico que contiene CpG en la muestra usando cebadores oligonucleotídicos específicos de CpG, en donde los cebadores oligonucleotídicos discriminan entre ácido nucleico metilado modificado y ácido nucleico no metilado y detectan el ácido nucleico metilado. La etapa de amplificación es opcional y deseable, pero no esencial. El método se basa en la reacción de la PCR para diferenciar entre ADN metilado modificado (por ejemplo, modificado químicamente) y ADN no metilado. 50

(5) Método de secuenciación con bisulfito

55 Otro método para detectar un ácido nucleico que contiene CpG metilado comprende las etapas de: poner en contacto una muestra que contiene ácido nucleico con un agente que modifica una citosina no metilada; y amplificar el ácido nucleico que contiene CpG en la muestra por medio de cebadores de oligonucleótidos independientes de la metilación. En el presente documento, los cebadores oligonucleotídicos pueden amplificar el ácido nucleico sin distinguir entre ácidos nucleicos metilados y no metilados modificados. El producto amplificado puede secuenciarse mediante el método de Sanger usando un cebador de secuenciación o mediante un método de secuenciación de última generación ligado a la secuenciación con bisulfito para la detección de ácido nucleico metilado. 60

65 (6) En el presente documento, el método de secuenciación de última generación puede realizarse mediante secuenciación por síntesis y secuenciación por ligación. Este método se caracteriza por que un solo fragmento de ADN se separa espacialmente en lugar de hacer un clon bacteriano y se amplifica *in situ* (amplificación clonal) y se secuencia. En el presente documento, analiza cientos de miles de fragmentos al mismo tiempo y, por lo tanto, se denomina "secuenciación masivamente paralela".

Se basa en la secuenciación por síntesis y se confía en un método para obtener una señal mientras se unen secuencialmente mono o dinucleótidos. Incluye pirosecuenciación, torrente de iones y métodos Solexa.

5 Los sistemas NGS basados en secuenciación por síntesis incluyen una plataforma Roche 454, una plataforma Illumina HiSeq, una plataforma Ion PGM (Life Technology) y una plataforma PacBio (Pacific BioSciences). Las plataformas 454 e Ion PGM usan PCR de emersión que es un método de amplificación clonal, y la plataforma HiSeq usa amplificación Bridge. El método de secuenciación por síntesis analiza una secuencia detectando el fosfato que se genera al sintetizar un ADN mientras se unen secuencialmente nucleótidos individuales, iones de hidrógeno, o un colorante de fluorescencia premarcado. Para detectar una secuencia, la plataforma 454 usa un método de pirosecuenciación que emplea fosfato y la plataforma Ion PGM usa detección de iones de hidrógeno. Las plataformas HiSeq y PacBio analizan una secuencia mediante la detección de fluorescencia.

15 La secuenciación por ligación es una técnica de secuenciación que emplea ADN ligasa y se realiza mediante la identificación de nucleótidos en posiciones específicas en una secuencia de nucleótidos de ADN. A diferencia de la mayoría de las técnicas de secuenciación que emplean polimerasa, la secuenciación por ligación no usa una polimerasa y usa la característica de que la ADN ligasa no liga una secuencia que no coincide. Incluye un sistema SOLiD. En esta técnica, se leen dos bases en cada etapa y las etapas de lectura se repiten de forma independiente cinco veces a través del proceso de reinicio del cebador. Por lo tanto, cada base se lee dos veces para aumentar la precisión.

25 En el caso de la secuenciación por ligación, entre conjuntos de cebadores de dinucleótidos hechos de 16 combinaciones, los cebadores de dinucleótidos correspondientes a la secuencia de nucleótidos de interés se ligan secuencialmente y se analiza una combinación de las ligaciones, determinando de esta manera la secuencia de nucleótidos del ADN de interés.

30 Con respecto a los cebadores que se usan en la presente divulgación, cuando el ADN diana se trata con el reactivo (por ejemplo, bisulfito) en la etapa (a), la citosina en la región 5'-CpG-3' permanece intacta, si estuviera metilada, pero la citosina cambia a uracilo, si no estuviera metilada. En consecuencia, basándose en la secuencia de bases transformada después del tratamiento con reactivo (por ejemplo, bisulfito), pueden construirse cebadores de PCR correspondientes a una región que tenga la secuencia de bases 5'-CpG-3'.

35 Los cebadores pueden diseñarse para que sean "sustancialmente" complementarios de cada cadena del locus a amplificar de un ADN diana. Esto significa que los cebadores deben ser suficientemente complementarios para hibridarse con sus respectivas cadenas en las condiciones de la reacción de polimerización.

40 La metilación del producto amplificado por un oligonucleótido, que es capaz de unirse de manera complementaria al ADN amplificado linealmente, y el cebador universal en la etapa (d) se detecta por una sonda capaz de hibridarse con el ADN diana y la sonda puede usarse sin limitación siempre que pueda hibridarse con el ADN diana para detectar la metilación, pero puede comprender, por ejemplo, uno o más dinucleótidos CpG. Además, existe un método en el que la detección se realiza usando una sustancia fluorescente de autoinforme o un cebador marcado de transferencia de energía, además del oligonucleótido o cebador universal descrito anteriormente.

45 Específicamente, la sonda puede comprender una secuencia que tiene una identidad de al menos el 50 %, específicamente, al menos el 55 %, el 60 %, el 70 %, el 80 % o el 90 %, con una o más secuencias seleccionadas del grupo que consiste en secuencias representadas por SEQ ID NO: 3, 6, 29, 30 y 31 a 34.

50 En algunos ejemplos, la sonda puede tener un indicador o un inactivador fijado en ambos extremos. El indicador puede ser uno o más seleccionados del grupo que consiste en FAM (6-carboxifluoresceína), rojo Texas, HEX (2',4',5',7'-tetracloro-6-carboxi-4,7-diclorofluoresceína), JOE, Cy3 y Cy5. El inhibidor de fluorescencia puede ser uno o más seleccionados del grupo que consiste en TAMRA (6-carboxitetrametil-rodamina), BHQ1, BHQ2 y Dabcyl. El inhibidor de fluorescencia puede ser uno o más seleccionados del grupo que consiste en TAMRA (6-carboxitetrametil-rodamina), BHQ1, BHQ2 y Dabcyl.

55 En otro aspecto, se desvela en el presente documento pero no forma parte de la invención reivindicada, una composición para la detección de ADN metilado, que comprende:

60 al menos un reactivo tratado con una muestra que contiene ADN diana, que modifican un ADN no metilado para distinguirlo de un ADN metilado;
un oligonucleótido, que comprende una secuencia específica de diana capaz de unirse de manera complementaria a una secuencia de ADN diana tratado con el reactivo y un cebador universal que no se une de manera complementaria al ADN diana;
un oligonucleótido, que son capaces de unirse de manera complementaria a un ADN diana amplificado linealmente y un cebador universal que no se une de manera complementaria al ADN diana amplificado linealmente; y
65 una sonda capaz de hibridarse de forma complementaria con la secuencia de ADN diana amplificada linealmente.

La composición desvelada en el presente documento se superpone con las constituciones descritas anteriormente, incluyendo realizar un tratamiento con al menos un reactivo que modifique el ADN metilado y el ADN no metilado para que se distingan entre sí, realizar amplificación lineal usando un oligonucleótido que amplifica el ADN diana tratado con el reactivo y comprende una secuencia específica de diana capaz de unirse de forma complementaria a una secuencia de ADN diana y una secuencia universal que no se hibrida con el ADN diana, y detectar ADN metilado usando un oligonucleótido, que es capaz de unirse de manera complementaria al ADN amplificado linealmente, un cebador universal y una sonda, por lo que se omite su descripción detallada.

En aún en otro aspecto, se desvela en el presente documento pero no forma parte de la presente invención, un kit para detectar la metilación de un ADN diana, que comprende la composición.

En un ejemplo, el kit puede comprender un medio de transporte compartimentado para recibir una muestra en el mismo, un recipiente que recibe un reactivo en su interior, un recipiente que contiene cebadores de PCR para la amplificación de una secuencia de bases 5'-CpG-3' de un ADN diana y un recipiente que contiene una sonda para detectar un producto de PCR amplificado.

Los medios vehículo son adecuados para contener uno o más recipientes tales como viales, tubos y similares, comprendiendo cada uno de los recipientes uno de los elementos separados que se usarán en el método. En vista de la descripción proporcionada en el presente documento del método desvelado, los expertos en la materia pueden determinar fácilmente la distribución de los reactivos necesarios entre los recipientes.

Ejemplos

En lo sucesivo en el presente documento, la presente divulgación se describirá con más detalle con referencia a los ejemplos. Será obvio para un experto habitual en la materia que estos ejemplos solo tienen fines ilustrativos y no han de interpretarse limitantes del alcance de la presente divulgación.

Ejemplo 1: Determinación del límite de detección usando ADN metilado derivado de líneas celulares

Las líneas celulares HCT116, SW480 y HT-29, que son líneas celulares de cáncer colorrectal humano, se adquirieron del Korean Cell Line Bank (Seúl, Corea) y se cultivaron en medio RPMI (JBI, Seúl, Corea del Sur) que contiene un 10 % de suero bovino fetal (JBI, Seúl, Corea del Sur), penicilina y estreptomina en una incubadora a 37 °C en dióxido de carbono al 5 %.

El ADN genómico se extrajo con un kit QiaAmp DNA Mini (Qiagen, Hilden, Alemania) y se trató con bisulfito de sodio por medio de un kit EZ DNA Methylation-Gold (ZYMO Research, Irvine, EE.UU.). En resumen, el ADN genómico se trató con bisulfito a 65 °C durante 2,5 horas y después se desulfonó dejándolo a temperatura ambiente durante 20 minutos. A continuación, se unió a una columna Zymo-Spin IC (Zymo Research, Irvine, EE.UU.) y después se extrajo con 10 µl de agua destilada y se almacenó a 20 °C.

Para determinar el límite de detección del método de la presente divulgación compárese con un meSDC2-qMSP que no comprende el proceso LTE, el ADN metilado derivado de la línea celular HCT116 se distribuyó a una concentración de 100 a 10 pg y después se mezcló con 20 ng de ADN genómico de leucocitos humanos (BioChain Institute Inc., Hayward, CA) amplificado usando un kit de amplificación de ADN Illustra GenomiPhi V2 (GE Healthcare, Cleveland, EE.UU.), seguido de dilución en serie.

A continuación, el ADN se amplificó linealmente usando un oligonucleótido, que comprende el cebador universal de SEQ ID NO: 7 unido a la secuencia específica de SDC2 de SEQ ID NO: 2 y un oligonucleótido que comprende el cebador universal de SEQ ID NO: 7 unido a la secuencia específica de COL2A1 de SEQ ID NO: 5, en las siguientes condiciones: 95 °C durante 5 min y después 35 ciclos, consistiendo cada uno en 95 °C durante 15 s y 60 °C durante 1 min. A continuación, la PCR en tiempo real se realizó usando la sonda de SEQ ID NO: 3, el oligonucleótido de SEQ ID NO: 1 que puede unirse de manera complementaria al ADN linealmente amplificado, la sonda de SEQ ID NO: 6, el oligonucleótido de SEQ ID NO: 4 que puede unirse de forma complementaria al ADN amplificado linealmente y el cebador universal de SEQ ID NO: 7, en las siguientes condiciones: 95 °C durante 5 min y después 40 ciclos, consistiendo cada uno en 95 °C durante 15 s y 60 °C durante 1 min. El experimento se repitió 24 veces (Tabla 1 y FIGURA 1). Después, el valor de Ct (umbral de ciclo) se analizó usando el software Rotor Gene Q.

[Tabla 1] Secuencias de cebadores y sondas

| SEQ ID NO: | Descripción | Secuencias |
|--------------|--|---------------------------------|
| SEQ ID NO: 1 | Oligonucleótido capaz de unirse de forma complementaria a SDC2 | 5' -GTAGAAATTAATAAGTGAGAGGGC-3' |

(continuación)

| SEQ ID NO: | Descripción | Secuencias |
|--------------|--|--|
| SEQ ID NO: 2 | Secuencia específica de SDC2 | 5' - <u>AAAGATTCGGCGACCACCGA</u> AC <u>GA</u> CTCAA <u>ACTCG</u> AAAACT <u>CG</u> -3' |
| SEQ ID NO: 3 | sonda SDC2 | 5' - FAM-TTCGGGGCGTAGTTGCGGGCGG- 3' |
| SEQ ID NO: 4 | Oligonucleótido capaz de unirse de forma complementaria a COL2A1 | 5' -GTAATGTTAGGAGTATTTTGTGGITA- 3' |
| SEQ ID NO: 5 | secuencia específica de COL2A1 | 5' - <u>AAAGATTCGGCGACCACCGA</u> CTAICCCAAAAAAC CCAATCCTA-3' |
| SEQ ID NO: 6 | sonda COL2A1 | 5' -Cy5- AGAAGAAGGGAGGGGTGTTAGGAGAGG-3' |
| SEQ ID NO: 7 | Cebador universal | 5' - <u>AAAGATTCGGCGACCACCGA</u> -3' |

Subrayado: dinucleótido CpG; en cursiva: cebador universal;
I: nucleótido inosina
* las secuencias de SEQ ID NO: 2 y SEQ ID NO: 5 son secuencias específicas de diana SDC2 y COL2A1, respectivamente, y corresponden a secuencias distintas de la secuencia del cebador universal de SEQ ID NO: 7, y se usó como cebador un oligonucleótido que comprende una secuencia específica de diana y un cebador universal que no se hibrida con el ADN diana.

5 Como resultado, se confirmó que el método convencional mostró una tasa de detección del 100 % en 200 pg de ADN, pero mostró una tasa de detección del 37,5 % en 20 pg y una tasa de detección del 0 % en 10 pg, mientras que el método de la presente divulgación mostró una detección del 100 % en 200 pg a 20 pg y mostró una tasa de detección del 33,3 % incluso en 10 pg (FIGURA 2 y Tabla 2).

[Tabla 2] Comparación de la tasa de detección entre el método convencional (qMSP) y el método de la presente divulgación (LTE-qMSP)

| Concentración de ADN (pg) | Número de detecciones de ADN metilado por LTE-qMSP | Tasa de detección | Número de detecciones de ADN metilado por qMSP | Tasa de detección |
|---------------------------|--|-------------------|--|-------------------|
| 10 | 8 de 24 | 33,3 | 0 de 24 | N.D |
| 20 | 24 de 24 | 100 | 9 de 24 | 37,5 |
| 50 | 24 de 24 | 100 | 19 de 24 | 79,2 |
| 100 | 24 de 24 | 100 | 23 de 24 | 95,8 |
| 200 | 24 de 24 | 100 | 24 de 24 | 100 |
| Control negativo | 0 de 24 | N.D | 0 de 24 | N.D |

10

Ejemplo 2: Comparación entre LTE-qMSP y qMSP

15 Para evaluar la capacidad del gen SDC2 de diagnosticar el cáncer colorrectal, se diseñaron 18 conjuntos de cebadores y sondas de detección específicos de metilación que pueden representar todas las islas CpG del gen SDC2 (Tabla 3) y se realizó LTE-qMSP. Para este fin, se aisló ADN genómico (kit QIAamp DNA Stool Mini, Qiagen) de las heces de cada una de 25 personas normales y 25 pacientes con cáncer colorrectal y se trataron con bisulfito mediante un kit EZ DNA methylation-Gold. Después, el ADN se extrajo con 10 µl de agua destilada estéril y se usó en LTE-qMSP (PCR en tiempo real específica de metilación de enriquecimiento de diana lineal). Usando el ADN genómico tratado con bisulfito como un molde, el enriquecimiento lineal de diana (LTE) se realizó usando la secuencia específica de diana diseñada (R) que se muestra en la Tabla 3 a continuación (FIGURA 3). La reacción de LTE se realizó usando un sistema de PCR Rotor-Gene Q (Qiagen) y un total de 20 µl de una solución de reacción de PCR (ADN molde, 10 µl; 5X AptaTaq DNA Master (Roche Diagnostics), 4 µl; secuencia específica de diana COL2A1, 1 µl (1 pmol); secuencia

20

ES 2 936 408 T3

específica de diana *SDC2*, 1 µl (1 pmol); D.W. 4 µl) en las siguientes condiciones de PCR: tratamiento a 95 °C durante 5 min y después 35 ciclos, consistiendo cada uno en 95 °C durante 15 s y 60 °C durante 1 min.

5 qMSP se realizó usando un sistema de PCR Rotor-Gene Q (Qiagen). Se realizó usando un total de 40 µl de una solución de reacción de PCR (20 µl de un producto LTE primario; 8 µl de 5X AptaTaq DNA Master (Roche Diagnostics); 1 µl (10 pmol) de un cebador de PCR capaz de unirse de manera complementaria al ADN; 1 µl (10 pmol) de un oligonucleótido capaz de unirse complementariamente a *SDC2*; ADN; 1 µl (5 pmol) de un oligonucleótido capaz de unirse complementariamente a *COL2A1*; 1 µl (10 pmol) de un cebador universal (SEQ ID NO: 7); 1 µl (5 pmol) de una sonda TaqMan *SDC2*; 1 µl (2,5 pmol) de una sonda TaqMan *COL2A1*; 6 µl de D.W.) en las siguientes condiciones de
10 PCR: tratamiento a 95 °C durante 5 min y después 40 ciclos, consistiendo cada uno en 95 °C durante 15 s y una temperatura de hibridación adecuada (58 °C a 61 °C) durante 1 min. Se determinó si el producto de la PCR se amplificaría midiendo el valor del umbral del ciclo (Ct). Los ADN de control metilados y no metilados se analizaron junto con las muestras de ADN usando un conjunto de ADN control EpiTect PCR (Qiagen, N.º de catálogo 59695). Como un gen de control interno, se usó el gen *COL2A1* (Kristensen *et al.*, 2008).

15

[Tabla 3] Secuencias de cebadores y sondas para LTE-qMSP del gen *SDC2*

| Conjunto | Cebadores | Secuencias (5'-->3') | Tamaño del producto de amplificación (pb) | SEQ ID NO: |
|----------|-----------|--|---|------------|
| 1 | F1 | AAGAAAAGGATTGAGAAAAC | 155 | 8 |
| | R1 | <u>AAAGATTCGGCGACCACCGACGAAAAA</u> AATTCCTACAAAATTACACG | | 9 |
| | Sonda 1 | CGTGTAATTTTGTAGGAATTTTTTTTCG | | 29 |
| 2 | F2 | GGTTTGTTCGGTGAGTAGAGTCGGC | 124 | 10 |
| | R1 | <u>AAAGATTCGGCGACCACCGACGAAAAA</u> AATTCCTACAAAATTACACG | | 9 |
| | Sonda 1 | CGTGTAATTTTGTAGGAATTTTTTTTCG | | 29 |
| 3 | F3 | GTTATAGCGCGGAGTCGCGGC | 97 | 11 |
| | R1 | <u>AAAGATTCGGCGACCACCGACGAAAAA</u> AATTCCTACAAAATTACACG | | 9 |
| | Sonda 1 | CGTGTAATTTTGTAGGAATTTTTTTTCG | | 29 |
| 4 | F4 | GGTTTTTCGGAGTTGTTAATC | 69 | 12 |
| | R1 | <u>AAAGATTCGGCGACCACCGACGAAAAA</u> AATTCCTACAAAATTACACG | | 9 |
| | Sonda 1 | CGTGTAATTTTGTAGGAATTTTTTTTCG | | 29 |

ES 2 936 408 T3

(continuación)

| Conjunto | Cebadores | Secuencias (5'-->3') | Tamaño del producto de amplificación (pb) | SEQ ID NO: |
|----------|-----------|---|---|------------|
| 5 | F5 | TTATTTGGGAGTTATATTGTC | 156 | 13 |
| | R2 | <u>AAAGATTCGGCGACCACCGACGCGCCG</u> CGCCTCCCTCCCCG | | 14 |
| | Sonda 2 | CGGGGAGGGAGGCGGGCGCG | | 30 |
| 6 | F6 | TTTTAGTCGTTTAGGGGAGTTC | 126 | 15 |
| | R2 | <u>AAAGATTCGGCGACCACCGACGCGCCG</u> CGCCTCCCTCCCCG | | 14 |
| | Probe2 | CGGGGAGGGAGGCGGGCGCG | | 30 |
| 7 | F7 | CGTAGTCGCGGAGTTAGTGGTTTC | 152 | 16 |
| | R3 | <u>AAAGATTCGGCGACCACCGACGCTAAC</u> TTAAAAAAAAAACTACG | | 17 |
| | Sonda 3 | CGTAGTTTTTTTTTTAAGTTAGCG | | 31 |
| 8 | F8 | CGCGTTGTTTTTTAGATATTTTC | 121 | 18 |
| | R3 | <u>AAAGATTCGGCGACCACCGACGCTAAC</u> TTAAAAAAAAAACTACG | | 17 |
| | Sonda 3 | CGTAGTTTTTTTTTTAAGTTAGCG | | 31 |
| 9 | F9 | CGCGCGGATCGCGGTTTTTCGTC | 87 | 19 |
| | R3 | <u>AAAGATTCGGCGACCACCGACGCTAAC</u> TTAAAAAAAAAACTACG | | 17 |
| | Sonda 3 | CGTAGTTTTTTTTTTAAGTTAGCG | | 31 |
| 10 | F10 | CGGTACGGGAAAGGAGTTCGCG | 113 | 20 |
| | R4 | <u>AAAGATTCGGCGACCACCGACGACACG</u> AAATTAATACTCCG | | 21 |
| | Sonda 4 | CGGAGTATTAATTTTCGTGTCG | | 32 |

ES 2 936 408 T3

(continuación)

| Conjunto | Cebadores | Secuencias (5'-->3') | Tamaño del producto de amplificación (pb) | SEQ ID NO: |
|----------|-----------|---|---|------------|
| 11 | F11 | GTAGAAATTAATAAGTGAGAGGGC | 144 | 1 |
| | R5 | <u>AAAGATTCGGCGACCACCGAACGACTC</u> AAACTCGAAAACCTCG | | 2 |
| | Sonda 5 | CGAGTTTTTCGAGTTTGAGTCGT | | 33 |
| 12 | F11 | GTAGAAATTAATAAGTGAGAGGGC | 144 | 1 |
| | R5 | <u>AAAGATTCGGCGACCACCGAACGACTC</u> AAACTCGAAAACCTCG | | 2 |
| | Sonda 5-1 | TTCGGGGCGTAGTTGCGGGCGG | | 3 |
| 13 | F12 | TCGCGTTTTTCGGGGCGTAGTTGC | 119 | 22 |
| | R5 | <u>AAAGATTCGGCGACCACCGAACGACTC</u> AAACTCGAAAACCTCG | | 2 |
| | Probe5 | CGAGTTTTTCGAGTTTGAGTCGT | | 33 |
| 14 | F13 | CGGCGGGAGTAGGCGTAGGAGGAGGAA GC | 93 | 23 |
| | R5 | <u>AAAGATTCGGCGACCACCGAACGACTC</u> AAACTCGAAAACCTCG | | 2 |
| | Sonda 5 | CGAGTTTTTCGAGTTTGAGTCGT | | 33 |
| 15 | F14 | AGGAAGCGAGCGTTTTTCGAGTTTC | 71 | 24 |
| | R5 | <u>AAAGATTCGGCGACCACCGAACGACTC</u> AAACTCGAAAACCTCG | | 2 |
| | Sonda 5 | CGAGTTTTTCGAGTTTGAGTCGT | | 33 |
| 16 | F15 | AATCGTTGCGGTATTTTGTTTC | 133 | 25 |
| | R6 | <u>AAAGATTCGGCGACCACCGACCAAAAA</u> CCGACTACTCCCAACCG | | 26 |
| | Sonda 6 | CGGTTGGGAGTAGTCGGTTTTTTGG | | 34 |

(continuación)

| Conjunto | Cebadores | Secuencias (5'-->3') | Tamaño del producto de amplificación (pb) | SEQ ID NO: |
|----------|-----------|---|---|------------|
| 17 | F16 | GATTCGTGTGCGCGGGTTGC | 110 | 27 |
| | R6 | <u>AAAGATTGCGCGACCACCGACCAAAAA</u> CCGACTACTCCCAACCG | | 26 |
| | Sonda 6 | CGGTTGGGAGTAGTCGGTTTTTGG | | 34 |
| 18 | F17 | CGAGCGTTGGGTAGGAGGTTTC | 88 | 28 |
| | R6 | <u>AAAGATTGCGCGACCACCGACCAAAAA</u> CCGACTACTCCCAACCG | | 26 |
| | Sonda 6 | CGGTTGGGAGTAGTCGGTTTTTGG | | 34 |

* En cursiva: secuencia universal (SEQ ID NO: 7)
 * Las secuencias de R1 a R6 son secuencias específicas de diana que corresponden a secuencias distintas de la secuencia universal de SEQ ID NO: 7.
 * F1 a F17 corresponden a oligonucleótidos capaces de unirse de forma complementaria al ADN diana amplificado linealmente.

A. Resultados de la comparación entre LTE-qMSP y qMSP para el conjunto 6

- 5 De acuerdo con el método descrito en el Ejemplo 1, la sensibilidad de detección por el conjunto 6 se comparó entre el método LTE-qMSP y el método qMSP. Como resultado, se confirmó que el método convencional mostró una tasa de detección del 100 % en 200 pg de ADN, pero mostró una tasa de detección del 37,5 % en 20 pg y una tasa de detección del 0 % en 10 pg, mientras que el método de la presente divulgación mostró una tasa de detección del 100 % en 200 pg a 20 pg y una tasa de detección del 33,3 % incluso en 10 pg (FIGURA 4a y Tabla 4).

- 10 [Tabla 4] Comparación de la tasa de detección entre el método convencional (qMSP) y el método de la presente divulgación (LTE-qMSP)

| Concentración de ADN (pg) | Número de detecciones de ADN metilado por LTE-qMSP | Tasa de detección | Número de detecciones de ADN metilado por qMSP | Tasa de detección |
|---------------------------|--|-------------------|--|-------------------|
| 10 | 8 de 24 | 33,3 | 0 de 24 | N.D |
| 20 | 24 de 24 | 100 | 9 de 24 | 37,5 |
| 50 | 24 de 24 | 100 | 19 de 24 | 79,2 |
| 100 | 24 de 24 | 100 | 23 de 24 | 95,8 |
| 200 | 24 de 24 | 100 | 24 de 24 | 100 |
| Control negativo | 0 de 24 | N.D | 0 de 24 | N.D |

B. Resultados de la comparación entre LTE-qMSP y qMSP para el conjunto 17

- 15 De acuerdo con el método descrito en el Ejemplo 1, la sensibilidad de detección por el conjunto 17 se comparó entre el método LTE-qMSP y el método qMSP. Como resultado, se confirmó que el método qMSP mostró una tasa de detección del 100 % en 200 pg de ADN, pero mostró una tasa de detección del 45,0 % en 20 pg y una tasa de detección del 0 % en 10 pg, mientras que el método de la presente divulgación mostró una tasa de detección del 100 % en 200 pg a 20 pg y una tasa de detección del 91,7 % en 20 pg y una tasa de detección del 29,2 % incluso en 10 pg (FIGURA 4b y Tabla 5).
- 20

[Tabla 5] Comparación de la tasa de detección entre el método convencional (qMSP) y el método de la presente divulgación (LTE-qMSP)

| Concentración de ADN (pg) | Número de detecciones de ADN metilado por LTE-qMSP | Tasa de detección | Número de detecciones de ADN metilado por qMSP | Tasa de detección |
|---------------------------|--|-------------------|--|-------------------|
| 10 | 7 de 24 | 29,2 | 0 de 24 | N.D |
| 20 | 22 de 24 | 91,7 | 11 de 24 | 45,0 |
| 50 | 23 de 24 | 95,8 | 18 de 24 | 75,0 |
| 100 | 24 de 24 | 100 | 23 de 24 | 95,8 |
| 200 | 24 de 24 | 100 | 24 de 24 | 100 |
| Control negativo | 0 de 24 | N.D | 0 de 24 | N.D |

Ejemplo 3: Evaluación de la capacidad del gen *SDC2* para diagnosticar cáncer colorrectal en heces por LTE-qMSP

5

El grado de metilación en cada una de las muestras que se muestran en la Tabla 3 del Ejemplo 2 se midió mediante el valor Ct y la sensibilidad y especificidad de cada conjunto de cebador y sonda se calcularon mediante análisis de curvas ROC (programa MedCalc, Bélgica) (Tabla 6).

10 La metilación del gen *SDC2* se analizó usando ADN fecal derivado de personas normales y pacientes con cáncer colorrectal. Como resultado, se confirmó que la sensibilidad para el diagnóstico de cáncer colorrectal fue del 76 % (19/25) al 88,0 % (22/25) y la especificidad fue del 88,0 % (3/25) al 100 % (0/25). Esto sugiere que el uso de la metilación del gen *SDC2* es muy útil para el diagnóstico del cáncer colorrectal.

15

[Tabla 6] Evaluación de la capacidad del gen *SDC2* para diagnosticar cáncer colorrectal

| Conjunto de cebador y sonda | Corte (Ct) | Valor de P | Sensibilidad (%), n = 25 | Especificidad (%), n = 25 |
|-----------------------------|------------|------------|--------------------------|---------------------------|
| 1 | <32,1 | <0,001 | 76,0 | 92,0 |
| 2 | <32,0 | <0,001 | 80,0 | 96,0 |
| 3 | <32,3 | <0,001 | 76,0 | 88,0 |
| 4 | <32,1 | <0,001 | 80,0 | 92,0 |
| 5 | <32,0 | <0,001 | 84,0 | 96,0 |
| 6 | <32,5 | <0,001 | 88,0 | 92,0 |
| 7 | <32,5 | <0,001 | 76,0 | 96,0 |
| 8 | <32,2 | <0,001 | 80,0 | 88,0 |
| 9 | <32,3 | <0,001 | 88,0 | 100 |
| 10 | <32,5 | <0,001 | 76,0 | 92,0 |
| 11 | <32,0 | <0,001 | 80,0 | 100 |
| 12 | <32,0 | <0,001 | 88,0 | 92,0 |
| 13 | <32,1 | <0,001 | 88,0 | 88,0 |
| 14 | <32,0 | <0,001 | 84,0 | 92,0 |
| 15 | <32,2 | <0,001 | 80,0 | 96,0 |
| 16 | <32,3 | <0,001 | 76,0 | 100 |
| 17 | <32,5 | <0,001 | 84,0 | 100 |
| 18 | <32,0 | <0,001 | 88,0 | 96,0 |

Con el fin de evaluar aún más la capacidad del método LTE-qMSP para la detección múltiple de metilación, se evaluó la capacidad de una combinación del conjunto 1 y el conjunto 2 para diagnosticar el cáncer colorrectal usando ADN fecal en un solo tubo.

20

[Tabla 7] Evaluación de la capacidad de la combinación del conjunto 1 y el conjunto 12 para diagnosticar el cáncer colorrectal

| Conjunto de cebador y sonda | Corte (Ct) | Valor de P | Sensibilidad (%), n = 25 | Especificidad (%), n = 25 |
|-----------------------------|------------|------------|--------------------------|---------------------------|
| 1 + 12 | <32,2 | <0,001 | 88,0 | 92,0 |

25 Se realizó la verificación clínica de una combinación del conjunto 1 y el conjunto 12 y, como resultado, se confirmó que la sensibilidad y la especificidad eran tan extremadamente altas como el 88 % y el 92 %, respectivamente. Por lo tanto, se confirmó nuevamente que es posible detectar la metilación usando el método LTE-qMSP en el cual varias

dianas metiladas se amplifican simultáneamente en un solo tubo.

Aplicabilidad industrial

- 5 Como se ha descrito anteriormente, el método para detectar ADN metilado de acuerdo con la presente divulgación usa un cebador universal y, por lo tanto, puede amplificar eficazmente múltiples ADN diana incluso cuando se usa solo un cebador adicional, incluso si una muestra contiene varias clases de genes. Adicionalmente, la complejidad de la PCR (PCR en tiempo real) que se usa para detectar la metilación mediante amplificación lineal puede disminuir y la variación en la eficiencia de la PCR puede disminuir, indicando que la sensibilidad de detección es significativamente
- 10 alta y el método es útil. Además, el método tiene la ventaja de que puede enriquecer el ADN diana metilado con mayor especificidad en la etapa de amplificación lineal del ADN diana (etapa LTE).

REIVINDICACIONES

1. Un método para detectar ADN metilado usando qMSP (PCR específica de metilación cuantitativa), que comprende:

- 5 (a) tratar una muestra que contiene ADN diana con al menos un reactivo que modifica un sitio de ADN no metilado para distinguirlo de un sitio de ADN metilado;
- (b) construir un cebador inverso, que comprende una secuencia específica de diana diseñada para poder unirse de forma complementaria al ADN diana tratado con el reactivo y un cebador universal que no se une de forma complementaria al ADN diana y el cebador universal está unido al extremo 5' de la secuencia específica de diana;
- 10 (c) realizar una amplificación lineal asimétrica en una dirección para el ADN metilado mediante PCR unidireccional usando, como un molde, el ADN diana tratado con el reactivo en la etapa (a) y usando, como un cebador, el cebador inverso construido en la etapa (b);
- (d) amplificar el ADN diana usando un cebador directo, que es capaz de unirse de manera complementaria al ADN amplificado linealmente en la etapa (c) y un cebador universal que no se une de manera complementaria al ADN
- 15 diana amplificado linealmente; y
- (e) detectar la metilación del ADN diana mediante una sonda capaz de hibridarse de forma complementaria con la secuencia de ADN diana amplificada en la etapa (d).

20 2. El método de la reivindicación 1, en donde se detecta una pluralidad de metilaciones de ADN diana en muestras en un solo reactor.

3. El método de la reivindicación 1, en donde el cebador universal de las etapas (b) o (d) comprende una o más secuencias seleccionadas del grupo que consiste en secuencias de nucleótidos representadas por SEQ ID NO: 7 y 35 a 41.

25 4. El método de la reivindicación 1, en donde la secuencia específica de diana de la etapa (b) se une de forma complementaria a un sitio metilado y/o a un sitio no metilado del ADN diana.

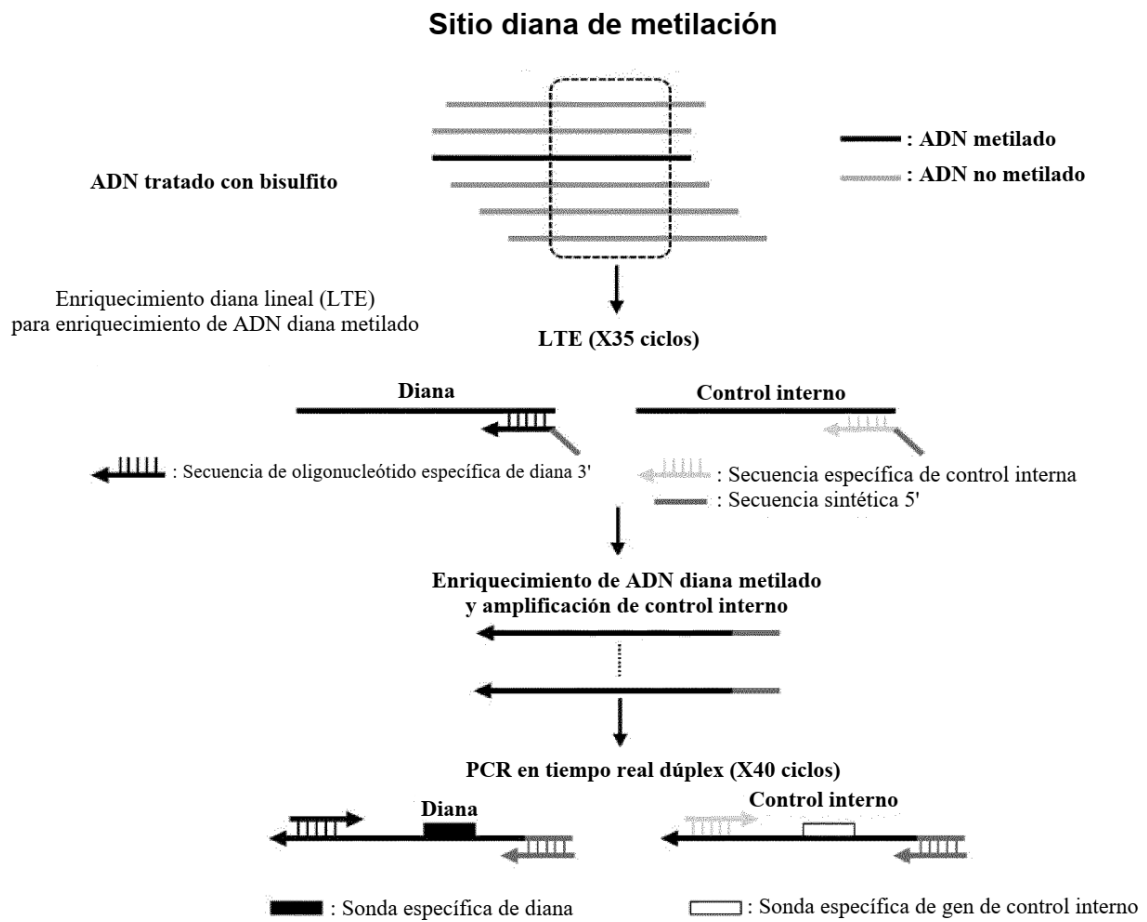
30 5. El método de la reivindicación 1,
 en donde la secuencia específica de la diana de la etapa (b) comprende uno o más dinucleótidos CpG; o
 en donde la secuencia específica de la diana de la etapa (b) comprende una o más secuencias seleccionadas del grupo que consiste en las secuencias representadas por SEQ ID NO: 2, 5, 9, 14, 17, 21 y 26.

35 6. El método de la reivindicación 1,
 en donde el cebador directo de la etapa (d) comprende uno o más dinucleótidos CpG; o
 en donde el cebador directo de la etapa (d) comprende una o más secuencias seleccionadas del grupo que consiste en las secuencias representadas por SEQ ID NO: 1, 4, 8, 10 a 13, 15, 16, 18 a 20, 22 a 25, 27 y 28.

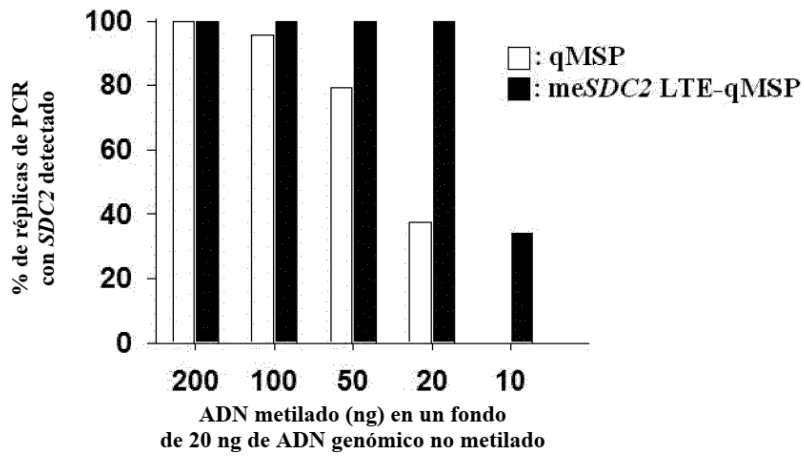
40 7. El método de la reivindicación 1,
 en donde la sonda de la etapa (e) comprende uno o más dinucleótidos CpG; o
 en donde la sonda de la etapa (e) comprende una o más secuencias seleccionadas del grupo que consiste en las

45 secuencias representadas por SEQ ID NO: 3, 6, 29, 30 y 31 a 34.

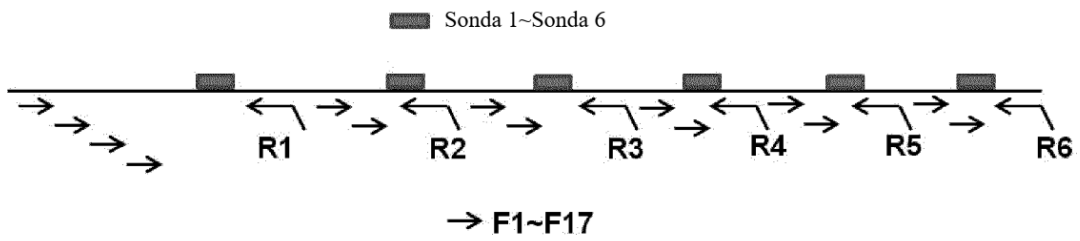
【Fig. 1】



【Fig. 2】

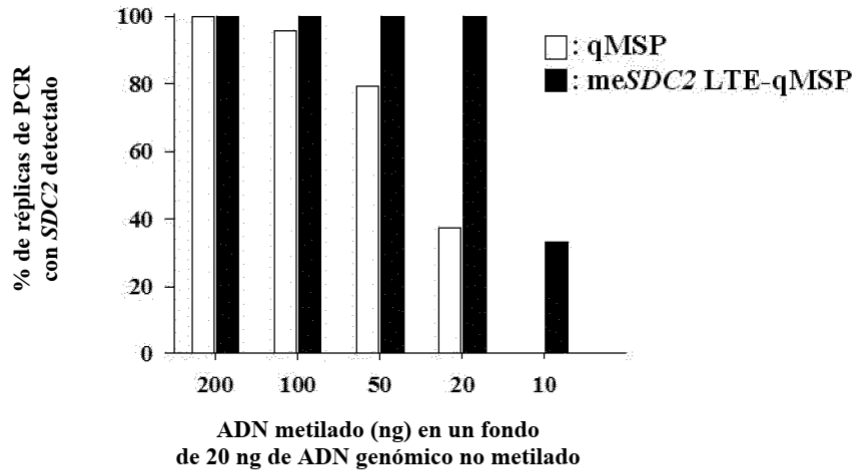


【Fig. 3】



【Fig. 4a】

A



【Fig. 4b】

B

