



19



OFICINA ESPAÑOLA DE
PATENTES Y MARCAS

ESPAÑA

11 Número de publicación: **2 347 990**

51 Int. Cl.:

C12Q 1/68 (2006.01)

C12P 19/34 (2006.01)

C07H 21/04 (2006.01)

12

TRADUCCIÓN DE PATENTE EUROPEA

T3

96 Número de solicitud europea: **03746704 .0**

96 Fecha de presentación : **11.04.2003**

97 Número de publicación de la solicitud: **1527199**

97 Fecha de publicación de la solicitud: **04.05.2005**

54 Título: **Procedimientos de detección de ácido nucleico metilado anormalmente en muestras biológicas heterogéneas.**

30 Prioridad: **11.04.2002 US 123071**

45 Fecha de publicación de la mención BOPI:
26.11.2010

45 Fecha de la publicación del folleto de la patente:
26.11.2010

73 Titular/es: **GENZYME CORPORATION**
500 Kendall Street
Cambridge, Massachusetts 02142, US

72 Inventor/es: **Shuber, Anthony, P.**

74 Agente: **Sugrañes Moliné, Pedro**

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

Campo de la invención

[0001] La invención se refiere de manera general a métodos para detectar indicios de cáncer en muestras biológicas. En particular, la invención se refiere a métodos para detectar la presencia de ácidos nucleicos hipermetilados en muestras biológicas.

Antecedentes de la invención

[0002] En eucariotas de orden superior, el ADN puede encontrarse metilado en citosinas situadas 5' respecto a la guanosina en los dinucleótidos CpG. Esta modificación presenta efectos reguladores importantes sobre la expresión génica, especialmente en el caso de que implique áreas ricas en CpG, conocidas como islas CpG (típicamente un contenido de GC de por lo menos 50% en una secuencia de ácidos nucleicos de 200 pares de bases (pb) de longitud) y que con frecuencia se encuentran en las regiones promotoras de muchos genes. La metilación aberrante de islas CpG normalmente no metiladas se ha asociado a la inactivación transcripcional de genes supresores tumorales definidos en cánceres humanos, por ejemplo el cáncer colorrectal (CRC). Otros tipos de cambios de metilación, tales como la pérdida de impronta genética en determinados genes resultante de la hipometilación también se ha relacionado con un riesgo más alto de una diversidad de cánceres, incluyendo el CRC (ver Cui *et al.*, Science 299:1753-55, 14 de marzo de 2003). Por lo tanto, la detección de cambios en la metilación de los ácidos nucleicos puede indicar la aparición o un riesgo muy alto de diversas formas de cánceres.

[0003] Se han descrito diversos métodos para detectar cambios de metilación en loci específicos en el ADN genómico. Uno de estos métodos implica la modificación del ADN con bisulfito sódico o un agente comparable que convierte la totalidad de las citosinas no metiladas en uracilos sin convertir las citosinas metiladas, y la amplificación posterior con cebadores específicos para ADN metilado frente a no metilado. Sin embargo, éste y otros métodos de detección de hipermetilación requieren muestras homogéneas de ácidos nucleicos que presentan una cantidad suficiente del ácido nucleico diana. Para muchos tipos de cánceres, resultan necesarios procedimientos invasivos, tales como cirugía, para obtener dicha muestra homogénea.

[0004] Sin embargo, muchas muestras biológicas, tales como muestras de heces, son heterogéneas y pueden contener una pequeña cantidad de ácidos nucleicos mutantes mezclados con una gran cantidad de ácidos nucleicos de tipo salvaje. Por lo tanto, existe una necesidad en la técnica de métodos para detectar cantidades reducidas de hipermetilación en muestras biológicas heterogéneas.

El documento US 2002/025525 da a conocer métodos para detectar la contaminación en diagnósticos moleculares utilizando PCR.

El documento WO 00/26401 se refiere a un método para determinar el estado de metilación del ADN de sitios CpG en un locus dado.

Nagasaka *et al.*, Proceedings of the Annual Meeting of the American Association for Cancer Research, New York, NY, US, vol. 43, marzo de 2002, página 1129, da a conocer una micro-
matriz de islas CpG para analizar los perfiles de metilación de 6-metilguanina-ADN-
metiltransferasa en el cáncer de colon.

El documento WO 01/75172 da a conocer un ensayo diagnóstico o pronóstico para el adenocarcinoma gastrointestinal.

El documento WO 02/18649 da a conocer un método de detección del cáncer mediante la
reacción en cadena de la polimerasa anidada específica de metilación.

Bevilacqua *et al.*, International Journal of Cancer, NY, US, vol. 87, enero de 2000, páginas 200 a 203, da a conocer la metilación del promotor *hMLH1* pero no mutaciones de *hMLH1* en carcinomas gástricos esporádicos con elevada inestabilidad de microsatélites.

Moinova *et al.*, PNAS 99(7):4562-4567, 2 de abril de 2002, se refiere al silenciamiento génico
HLTF en el cáncer de colon humano.

Hiltunen *et al.*, International Journal of Cancer, NY, US, 70(6):644-648, 17 de marzo de 1997, se refiere a la hipermetilación de la región promotora del gen APC (poliposis coli adenomatosa) en el carcinoma colorrectal humano.

Descripción resumida de la invención

[0005] Los métodos de la invención hacen posible detectar una enfermedad en una muestra biológica sin utilizar procedimientos invasivos. Según la invención, mediante la realización de un ensayo para detectar los cambios de metilación en una muestra heterogénea de ácidos nucleicos, tal como una muestra obtenida de heces, pueden detectarse cantidades reducidas de ácidos nucleicos con metilación anormal que son indicativas de la presencia de una enfermedad, por ejemplo cáncer o precáncer, en un paciente. En un aspecto, los métodos de la invención implican detectar la presencia de cantidades reducidas de ácidos nucleicos hipermetilados en una muestra heterogénea que contiene cantidades elevadas de ácidos nucleicos no metilados, utilizando reacciones de amplificación de ácidos nucleicos altamente sensibles y específicas. En otro aspecto, los métodos de la invención implican detectar la presencia de cambios pequeños en la cantidad de ácido nucleico hipometilado en una muestra heterogénea que contiene ácidos nucleicos tanto metilados como no metilados, utilizando reacciones de amplificación de ácidos nucleicos altamente sensibles y específicas. En aspectos adicionales, los métodos de la invención pueden detectar la hipermetilación o la hipometilación en una combinación de dos o más marcadores o loci CpG diana para mejorar la fiabilidad de la detección de enfermedades.

[0006] En un aspecto, los métodos de la invención comprenden la utilización de cebadores

mejorados para detectar la hipermetilación o hipometilación en un ácido nucleico diana. En una realización preferente, los métodos de la invención comprenden llevar a cabo una amplificación de ácidos nucleicos utilizando uno o más (preferentemente dos) cebadores quiméricos. Un cebador quimérico, para los fines de la invención, es un cebador que presenta una parte 3' con una especificidad de secuencia sustancial para el molde diana que debe amplificarse (una parte específica de molde) y una parte 5' que se denomina en la presente memoria "parte no específica" que no se hibrida con el molde diana. La secuencia 5' no específica preferentemente incluye por lo menos 5, y preferentemente 30 ó menos nucleótidos. Además, la parte 5' no específica preferentemente presenta un contenido de G-C de por lo menos 50%. En una realización particularmente preferente, la parte 5' no específica de los cebadores tanto directo como inverso es la misma. Los cebadores pueden incluir ADN, ARN o un análogo de ácidos nucleicos, tal como APN. En una realización preferente, el ácido nucleico diana se aísla a partir de una muestra de heces.

[0007] En otro aspecto, los métodos de la invención comprenden la optimización de las condiciones de reacción para que la PCR detecte la metilación anormal en una subpoblación de ácidos nucleicos en una muestra biológica. En una realización preferente, los métodos de la invención comprenden determinar una primera temperatura de fusión para un cebador en una PCR que amplifica un ácido nucleico diana, y llevar a cabo una PCR a una segunda temperatura de fusión que es más alta que la primera temperatura de fusión, utilizando por lo menos un cebador quimérico. La temperatura de fusión, en ocasiones denominada temperatura de hibridación, tal como se denomina en la presente memoria, se refiere a la temperatura a la que las cadenas de un ácido nucleico híbrido se encuentran disociadas aproximadamente al 50%. La segunda temperatura de fusión preferentemente es aproximadamente 3°C más alta que la primera temperatura de fusión. En una realización altamente preferente, la segunda temperatura de fusión es aproximadamente 65°C.

[0008] En otro aspecto, la invención proporciona métodos para cribar una población para detectar pacientes que presentan indicios de cáncer. En realizaciones preferentes, se interroga una pluralidad de regiones que contienen CpG diana para la presencia de hipermetilación o hipometilación. Preferentemente, se someten a ensayo una o más regiones asociadas a los genes siguientes, en ácidos nucleicos procedentes del paciente aislados a partir de una muestra biológica heterogénea, tal como heces: regiones reguladoras de poliposis coli adenomatosa (*APC*), proteína 1 de hipermetilación en el cáncer (*HIC1*), proteína 14 (*p14*), proteína 16 (*p16*), O(6)-metilguanina-ADN-metiltransferasa (*MGMT*), factor de transcripción de tipo helicasa (*HLTF*), proteína diana nuclear 1 de interacción con *Msx2* (*MINT1*), proteína diana nuclear 2 de interacción con *Msx2* (*MINT2*), proteína diana nuclear 31 de interacción con *Msx2* (*MINT31*), homólogo 1 de *mut-L* humano (*hMLH1*), trombospondina 1 (*THBS1*), metaloproteínasa 3 (*TIMP3*) y factor II de crecimiento similar a insulina (*IGF2*). La presencia de metilación anormal

en por lo menos una de dichas regiones es indicativa de la presencia de un indicio de cáncer en el paciente. Específicamente, la hipometilación y la pérdida de impronta en el gen *IGF2* se ha demostrado que indica por lo menos un riesgo más alto de CRC. La hipermetilación de otros genes, incluyendo el resto de los genes anteriormente mencionados, también se ha implicado en la aparición de CRC. Según la invención, la hipermetilación es una cantidad de metilación que es superior a la observada en tejido normal o en células normales aisladas de un paciente sano. En contraste, la hipometilación es una cantidad de metilación inferior a la observada en tejido normal o en células normales de un paciente sano. Por consiguiente, los métodos preferentes de la invención incluyen un ensayo de control negativo utilizando ácidos nucleicos procedentes de células normales. En realizaciones más preferentes, los métodos de la invención también incluyen un ensayo de control positivo utilizando ácidos nucleicos hipermetilados o hipometilados.

[0009] En un aspecto adicional, los métodos de la invención también resultan útiles para detectar la metilación anormal en una muestra sustancialmente homogénea, tal como una muestra de biopsia.

[0010] Dichas ventajas y otras ventajas y aspectos de la invención serán entendidos tras considerar la descripción detallada de los mismos a continuación.

Breve descripción de los dibujos

[0011] La figura 1 muestra un diagrama esquemático de los cebadores quiméricos utilizados en la presente invención.

[0012] La figura 2 muestra una representación esquemática de la amplificación por PCR utilizando cebadores quiméricos.

Descripción detallada de la invención

[0013] La invención proporciona métodos para detectar ácidos nucleicos anormalmente metilados en una muestra biológica heterogénea. Los métodos de la invención implican amplificar una subpoblación de ácidos nucleicos anormalmente metilados, preferentemente ADN, utilizando cebadores de PCR de elevada especificidad. Según la invención, el ácido nucleico diana puede ser cualquier ácido nucleico de interés: ADN humano, ADN vírico, etc. El ácido nucleico diana puede ser un ADN de doble cadena, ADN de una cadena, ARN, un análogo de ácido nucleico, por ejemplo APN, o una combinación de cualesquiera de los anteriormente indicados.

[0014] En muestras heterogéneas de ácidos nucleicos (por ejemplo de heces), pueden encontrarse presentes ácidos nucleicos diana anormalmente metilados en una cantidad reducida respecto a los ácidos nucleicos diana normalmente metilados. Esto representa un obstáculo significativo para la detección de ácidos nucleicos anormalmente metilados contra el fondo de ácidos nucleicos normalmente metilados utilizando métodos típicos de amplificación de ácidos

nucleicos. Según la invención, pueden detectarse cantidades relativas pequeñas de ácidos nucleicos anormalmente metilados utilizando una eficiencia de amplificación más alta. Preferentemente, se conserva o se incrementa la sensibilidad de la reacción y se incrementa la especificidad de la reacción. Para la PCR utilizando cebadores convencionales, por ejemplo, la eficiencia de amplificación sigue siendo de aproximadamente 50% a 60% en cada ciclo térmico, incluso bajo condiciones óptimas. A medida que se incrementa el grado de heterogeneidad de la muestra, se reduce la tolerancia para el fondo (por ejemplo la señal generada por la presencia de ADN normal). Según la invención, resulta necesario conservar una relación de señal a ruido suficiente para distinguir las muestras clínicas positivas de las muestras negativas o de control en un ensayo y para conservar una confianza elevada en los resultados del ensayo. Por lo tanto, los métodos de la invención requieren una especificidad elevada en los ensayos de detección basados en la amplificación con el fin de detectar una cantidad reducida de ácidos nucleicos diana anormalmente metilados frente a un fondo de ácidos nucleicos normalmente metilados en muestras biológicas heterogéneas. En determinadas realizaciones en las que el indicio de enfermedad es la pérdida de impronta genética o la pérdida de metilación, los métodos de la invención pueden estar destinados a detectar un porcentaje anormalmente elevado de ácidos nucleicos en la muestra que se encuentran hipometilados en comparación con, por ejemplo, muestras de una población de control o con muestras obtenidas del mismo paciente en un punto temporal de referencia.

[0015] Con referencia a la fig. 1, según la invención, se proporciona un cebador quimérico que presenta una primera parte que no es homóloga o complementaria al molde diana ("parte no específica" o "región no específica"). El cebador quimérico también contiene una segunda parte específica de molde orientada 3' respecto a la primera parte. El cebador quimérico puede consistir de un ADN, ARN, análogo de ácido nucleico, por ejemplo APN, o de una combinación de cualesquiera de los anteriormente indicados.

[0016] La parte no específica del cebador quimérico puede ser cualquier secuencia, con independencia de la longitud, que no presente especificidad de secuencia sustancial (es decir, que no se hibride bajo condiciones de hibridación restrictivas) para cualquier secuencia molde en una muestra de analito. En una realización preferente, la parte no específica es el extremo 5' del cebador quimérico. Puede existir secuencia adicional orientada 5' respecto a la parte no específica. Para evitar adicionalmente la unión de fondo, en una realización particular, la parte no específica del cebador quimérico incluye un elevado contenido de G-C, de por lo menos 50%.

[0017] La parte específica de molde preferentemente es complementaria o específica de una secuencia que contiene CpG en el ácido nucleico molde diana. En primer lugar, las diferencias entre un molde mutante que es anormal en su estado de metilación y un molde de tipo salvaje se convierten en diferencias de secuencia a través de modificaciones químicas de los moldes,

tal como se comenta con mayor detalle en partes posteriores de la presente solicitud. A continuación, se utiliza por lo menos un cebador quimérico que presenta por lo menos una parte específica de molde para someter a ensayo si la muestra tratada químicamente comprende un molde mutante. En una realización para detectar la hipermetilación, se produce y se detecta un producto de amplificación en el caso de que el molde presente en la muestra comprenda una citosina no modificada en una posición predeterminada que se corresponde con la parte específica de molde del cebador. En otra realización para detectar hipometilación, se produce y se detecta un producto de amplificación en el caso de que el molde presente en la muestra comprenda una citosina modificada en una posición predeterminada que se corresponde con la parte específica de molde del cebador. En otras palabras, para la detección de la hipermetilación, la parte específica de molde del cebador es específica para una secuencia mutante que se encuentra hipermetilada. A la inversa, para la detección de la hipometilación, la parte específica de molde del cebador es específica para una secuencia mutante que se encuentra hipometilada. En una realización preferente, la parte específica de molde puede ser específica para una pluralidad de dinucleótidos CpG, algunos o la totalidad de los cuales puede encontrarse en un estado anormal de metilación, por ejemplo hipermetilado, mientras que el resto de los dinucleótidos CpG, metilados o no, se encuentra en su estado de metilación normal. La parte específica de molde del cebador quimérico comprende una secuencia que es complementaria a una secuencia (no modificada o modificada) presente en una cadena del molde diana. Una parte específica de molde de un cebador quimérico que se hibrida específicamente con una forma no modificada de una secuencia en el molde diana comprende una secuencia que es complementaria a una secuencia no modificada en el molde diana. Una parte específica de molde de un cebador quimérico que se hibrida específicamente con una forma modificada de la misma secuencia comprende una secuencia que es complementaria a una forma modificada de dicha secuencia en el molde diana. Preferentemente, la secuencia complementaria presenta una longitud de por lo menos 5 nucleótidos, más preferentemente de entre 5 y 15 nucleótidos, y todavía más preferentemente de entre 15 y 30 nucleótidos. En realizaciones adicionales, la secuencia puede presentar una longitud superior a 30 nucleótidos. Según la invención, el cebador quimérico también puede contener una parte que presenta una secuencia que es parcialmente complementaria a la secuencia molde de interés (por ejemplo complementaria en un grado de entre 80% y 100%), con la condición de que la parte parcialmente complementaria no interfiera con la especificidad del cebador quimérico. Tal como se describe en la presente memoria, un cebador quimérico específico de metilación incluye una o más Gs (o análogos de la misma) en posiciones predeterminadas complementarias a una o más Cs (en dinucleótidos CpG predeterminados) que se sospecha que se encuentran metilados (y en consecuencia no modificados) en la cadena molde diana que se está sometiendo a ensayo.

[0018] En realizaciones preferentes de la invención, la secuencia que contiene CpG que

resulta útil como molde diana es parte de una región promotora o reguladora de un gen asociado al cáncer, tal como un gen supresor tumoral. Una región promotora preferente contiene una pluralidad de dinucleótidos CpG (uno o más islas CpG) que se encuentran anormalmente metilados en las células cancerosas, es decir hipermetilados o hipometilados. Sin embargo, debido a que la aberración del estado de metilación a escala de genoma puede resultar indicativa de la metilación aberrante en genes directamente asociados a una enfermedad de interés, la parte específica de molde del cebador puede ser específica para una región en el genoma que no es parte de una isla CpG reguladora de un gen asociado a cáncer. En realizaciones más preferentes de la invención, se lleva a cabo una reacción de amplificación utilizando un cebador directo y un cebador quimérico inverso, cada uno de los cuales incluye una parte que es complementaria a una secuencia que contiene CpG diferente dentro de la región de ácidos nucleicos diana. Nuevamente, la región diana preferentemente, aunque no necesariamente, es parte de una isla CpG. En algunas realizaciones puede detectarse la metilación anormal en una reacción de amplificación que utiliza únicamente un cebador quimérico que incluye una parte complementaria a una secuencia que contiene CpG. En esta realización, puede llevarse a cabo la amplificación utilizando un segundo cebador que incluye una parte complementaria a una secuencia que no contiene CpG contigua a la región promotora o reguladora diana. Según la invención, también puede llevarse a cabo la amplificación utilizando un cebador quimérico y un cebador no quimérico, con la condición de que el cebador quimérico incluya una secuencia que sea complementaria a una secuencia que contiene CpG en el ácido nucleico diana.

[0019] El ácido nucleico molde diana puede seleccionarse para que sea parte de una isla CpG asociada a algunos genes marcadores que resultan útiles para diagnosticar una enfermedad de interés. Por ejemplo, para el diagnóstico del CRC, puede utilizarse cualquier número de los genes siguientes para el propósito de la invención: poliposis adenomatosa coli (APC), proteína 1 de hipermetilación en el cáncer (*HIC1*), proteína 14 (*p14*), proteína 16 (*p16*), O(6)-metilguanina-ADN-metiltransferasa (*MGMT*), factor de transcripción de tipo helicasa (*HLTF*), proteína diana nuclear 1 de interacción con *Msx2* (*MINT1*), proteína diana nuclear 2 de interacción con *Msx2* (*MINT2*), proteína diana nuclear 31 de interacción con *Msx2* (*MINT31*), homólogo 1 de *mut-L* humano (*hMLH1*), trombospondina 1 (*THBS1*), metaloproteinasas 3 (*TIMP3*) y factor II de crecimiento similar a insulina (*IGF2*).

[0020] En el caso de que se utilice un cebador quimérico tal como se ha indicado anteriormente en una PCR, se reduce la unión específica al molde debido a que el apareamiento entre la parte de cola específica de molde y un ácido nucleico diana debe ser más exacta para compensar el desapareamiento aparente con la parte no específica. En otras palabras, bajo las mismas condiciones, una secuencia específica de molde presenta una menor tolerancia para desapareamientos en el caso de que sea parte de un cebador quimérico que en el caso de que se encuentre sola. La especificidad es incluso más alta en el caso de que la temperatura de

fusión se encuentre elevada en una realización preferente de la invención.

[0021] La eficiencia de la PCR convencional típicamente no excede el 60% en cada ciclo térmico de extensión. En el caso de que se utilice un cebador quimérico según la presente invención, la eficiencia de la primera ronda de extensión en la PCR puede encontrarse adicionalmente comprometida (por ejemplo del 20%). Sin embargo, en ciclos posteriores de PCR en los que se utilice el cebador quimérico, la eficiencia de la extensión puede alcanzar hasta el 100%. Esto permite que los métodos de la presente invención sean más eficientes para amplificar un molde diana específico en múltiples ciclos de PCR (por ejemplo 20 ciclos). En consecuencia, el número de ciclos de PCR necesario para amplificar un suceso raro diana en una muestra heterogénea para la detección o el análisis adicional puede reducirse mediante la utilización de un cebador quimérico de la invención. Aunque no se entienden por completo los motivos para la eficiencia incrementada de extensión en los últimos ciclos de PCR durante la utilización de un cebador quimérico, se ha planteado que la eficiencia incrementada podría relacionarse con el hecho de que, tras la primera ronda de PCR que implica un cebador quimérico, la secuencia no específica resulta incorporada en los productos de PCR (amplicones) generados en la primera ronda de PCR (ver la fig. 2) y se convierte en parte de un molde potencial para la unión. La mejora global de la eficiencia de la PCR también se observa al elevar la temperatura de fusión.

[0022] De acuerdo con lo anteriormente expuesto, los métodos de la invención proporcionan una especificidad y eficiencia incrementadas en un método de cribado basado en la amplificación que busca ácidos nucleicos anormalmente metilados en una muestra heterogénea. Según realizaciones preferentes, un agente que modifica las citosinas no metiladas sin modificar las citosinas metiladas se añade a una muestra de ácidos nucleicos aislada a partir de una muestra biológica heterogénea. A continuación, se lleva a cabo una reacción de amplificación utilizando por lo menos un cebador quimérico que distingue entre un dinucleótido CpG modificado y uno no modificado. La detección de un producto de amplificación de dinucleótido CpG no modificado indica la presencia de dinucleótido CpG no modificado, que puede encontrarse hipermetilado en el caso de que la secuencia de tipo salvaje no se encuentre metilada o se encuentre menos intensamente metilada. A la inversa, la detección de un producto de amplificación de dinucleótido CpG modificado indica la presencia de dinucleótido CpG no metilado, que puede hipometilarse en el caso de que la secuencia de tipo salvaje se encuentre metilada o más intensamente metilada. Ambos resultados podrían servir como indicación de la presencia de células enfermas en la muestra.

[0023] Según la invención, se aísla una muestra heterogénea de ácidos nucleicos a partir de una muestra biológica heterogénea, por ejemplo de heces. Una muestra de heces contiene una población altamente heterogénea de ácidos nucleicos. No sólo los ácidos nucleicos humanos representan una parte pequeña de los ácidos nucleicos presentes en las heces, sino que los

ácidos nucleicos de células cancerosas, en caso de hallarse presentes, representan únicamente una parte reducida de los ácidos nucleicos humanos. Una muestra de heces puede contener indicios moleculares de cáncer, específica de cáncer colorrectal, que se presenta como una subpoblación pequeña (típicamente del orden de aproximadamente 1% en los estadios tempranos de cáncer o precáncer) de los ácidos nucleicos humanos totales en las heces. Entre otras muestras biológicas heterogéneas se incluyen orina, semen o líquido seminal, suero plasmático, líquido cerebroespinal, pus, aspirado (por ejemplo aspirado de pezón mamario), líquido pancreático, bilis, linfa, saliva, líquido vaginal, líquido amniótico, esputo, sangre y otros líquidos corporales, secreciones o tejidos que pueden encontrarse mezclados con otros materiales biológicos. Estas muestras pueden contener ácidos nucleicos que son indicativos de una diversidad de enfermedades, incluyendo cánceres, por ejemplo de próstata, mama, pulmón, timo, ovario y otros.

[0024] Según la invención, pueden aislarse ácidos nucleicos diana a partir de una muestra biológica heterogénea utilizando una etapa de captura de híbrido específica de secuencia. El molde diana puede capturarse utilizando una sonda de captura específica para el molde. Según la invención, esta etapa de captura de híbrido preferentemente se lleva a cabo previamente a la modificación de CpG, y puede resultar en una muestra heterogénea de ácidos nucleicos diana que contiene formas tanto metiladas como no metiladas del ácido nucleico diana.

[0025] En el tratamiento de modificación, la muestra de ácidos nucleicos se trata con un agente, tal como bisulfato sódico. Preferentemente, el agente modifica la citosina no metilada convirtiéndola en uracilo sin modificar las citosinas metiladas. El tratamiento de modificación con bisulfito se describe en la patente U.S. No. 6.017.704.

[0026] Tras el tratamiento de modificación, se lleva a cabo una reacción de amplificación con por lo menos un cebador quimérico. El cebador quimérico contiene una primera parte que no es específica para el molde diana, y una segunda parte orientada 3' respecto a la primera parte. En una realización, la segunda parte es específica para una secuencia que contiene por lo menos uno, dos, tres, cuatro, cinco o más dinucleótidos CpG no modificados o modificados. Aunque la parte específica de molde, es decir la segunda parte del cebador quimérico preferentemente es específica para más de un dinucleótido CpG, la segunda parte del cebador puede ser específica para únicamente un dinucleótido CpG con la condición de que el resultado del ensayo respecto al dinucleótido CpG sea indicativo de la enfermedad. El producto de amplificación puede ser cualquier parte del genoma, debido a que la aberración a escala de genoma del estado de metilación puede ser indicativa de la metilación aberrante en genes que causan una enfermedad. Preferentemente, el producto de amplificación es parte de una isla CpG.

[0027] En una realización preferente, los cebadores tanto directo como inverso son cebadores quiméricos con partes específicas de molde respectivas que se hibridan con CpG no modificados, por lo tanto con secuencias metiladas en el molde diana. Estos cebadores en lo suce-

sivo se denominan "cebadores específicos de metilación". La detección de un producto de amplificación indica la metilación en la secuencia de CpG, preferentemente la hipermetilación en el dinucleótido CpG. Estos resultados podrían indicar la aparición de una enfermedad particular, por ejemplo un cáncer particular.

5 **[0028]** En otra realización, la segunda parte del cebador quimérico es específica de por lo menos una secuencia de dinucleótido CpG modificada mediante el tratamiento con bisulfito, por lo tanto una secuencia no metilada. Estos cebadores en lo sucesivo se denominan "cebadores no específicos de metilación". Debido a que la citosina no metilada se modifica convirtiéndola en uracilo, se reconoce como una timina en la PCR, y el cebador puede construirse de acuerdo
10 con ello para que contenga una parte específica de molde que reconoce las secuencias modificadas. En una muestra heterogénea de ADN, este tipo de cebador quimérico puede utilizarse para amplificar un dinucleótido hipometilado, preferentemente en una secuencia relacionada con un gen indicador de enfermedad. Por ejemplo, puede aislarse ADN que porta el gen *IGF2* mediante captura de híbrido y someterse a ensayo utilizando un cebador no específico de
15 metilación para detectar la pérdida de impronta genética y la hipometilación en la región reguladora del gen *IGF2*. Los cebadores no específicos de metilación también pueden utilizarse como control positivo para la presencia de ADN en el ensayo de búsqueda de indicios de hipermetilación, debido a que su producto de amplificación indica que existe por lo menos una copia de ADN diana que no se encuentra hipermetilada. Según la invención, una secuencia de
20 cebador que es específica para un dinucleótido CpG metilado (un dinucleótido CpG que no se modifica mediante tratamiento con un agente de modificación) incluye una G en la posición que es complementaria a la C del dinucleótido CpG. Por el contrario, una secuencia de cebador que es específica para un dinucleótido CpG no metilado (un dinucleótido CpG que se modifica mediante tratamiento con un agente de modificación) incluye una A en la posición que es com-
25 plementaria a la C del dinucleótido CpG, debido a que la C se modifica convirtiéndola en una U mediante la reacción de modificación. A la inversa, para el otro cebador de la pareja, en el caso de que contenga cualquier dinucleótido CpG en su secuencia, la C debería modificarse para convertirla en T para un cebador no específico de metilación.

[0029] Tal como se describe en la presente memoria, los cebadores no específicos de metila-
30 ción presentan un contenido de A/T más alto que sus cebadores específicos de metilación que son parcialmente específicos para un molde que es igual excepto por la hipermetilación. Según la invención, con el fin de mantener una especificidad comparable a una temperatura de fusión/hibridación similar, pueden añadirse unos cuantos nucleótidos más a la parte específica de secuencia de los cebadores no específicos de metilación. Por ejemplo, pueden añadirse nu-
35 cleótidos adicionales, preferentemente específicos del molde, en orientación 5' respecto a la parte específica de molde existente del cebador no específico de metilación. Debido a otras restricciones en el diseño de cebadores, tales como cuestiones relacionadas con las estructu-

ras secundarias, las partes específicas de molde de los cebadores no específicos de metilación y los cebadores específicos de metilación para el mismo marcador genético pueden diseñarse para que sean específicas para diferentes regiones del molde.

[0030] En un ejemplo ilustrativo de un método de ensayo según la invención, en primer lugar se aísla una muestra heterogénea de ADN a partir de una muestra biológica (por ejemplo de sangre o heces) obtenidas de un paciente. Se amplifican separadamente mediante PCR tres alícuotas, A, B y C, de la muestra de ADN. La PCR para la alícuota A utiliza un cebador convencional específico de molde que se hibridará con una secuencia diana y sirve como control positivo (es decir, la detección del amplicón en la alícuota A indica la existencia de secuencia diana en la muestra). La PCR para la alícuota B utiliza un cebador quimérico que presenta una cola 5' de secuencia no específica unida al cebador específico de molde utilizado en la alícuota A. La temperatura de fusión para la PCR para la alícuota B puede elevarse a una temperatura 5°C por encima de la temperatura de fusión utilizada para las alícuotas A y C. La PCR para la alícuota C utiliza un cebador que incluye la secuencia no específica misma como control negativo (es decir, la detección de amplicón en la alícuota C indica que los resultados no deben considerarse debido a, por ejemplo, contaminación de la PCR anterior). El cebador utilizado para el control negativo puede contener bases, preferentemente una a nueve, además de la secuencia no específica, con la condición de que la secuencia añadida no se hibride con ningún molde diana en la muestra.

[0031] Los métodos de la presente invención resultan especialmente adecuados para aplicaciones tales como: ensayos clínicos que implican la detección de cáncer esporádico (por ejemplo el ensayo de ADN de heces para el cáncer colorrectal) y kits relacionados, y otros ensayos clínicos de "suceso raro" y kits relacionados. Los métodos de la invención también pueden utilizarse para diagnósticos de enfermedad infecciosa y kits relacionados, y diagnósticos de enfermedad heredada y kits relacionados.

[0032] Una aplicación de la invención es cribar una población de pacientes para una enfermedad, por ejemplo la CRC, mediante el método siguiente: aislar una pluralidad de ácidos nucleicos diana de molde procedentes de cada paciente, y después someter a ensayo cada uno de los moldes para la presencia de la hipermetilación o la hipometilación, tal como se ha descrito anteriormente. La presencia de enfermedad o de riesgo de enfermedad puede indicarse en el caso de que cualquiera de los moldes diana muestre un resultado positivo de hipermetilación o hipometilación respecto a la cantidad de hipermetilación o hipometilación, respectivamente, observada en una muestra de control que es conocido que contiene molde únicamente en su estado normal o de referencia de metilación. En una realización preferente, la presencia de una enfermedad o de un riesgo de enfermedad está indicado por la presencia de metilación alterada en una pluralidad de loci (por ejemplo dos o más). Preferentemente, se expone una pluralidad de moldes a condiciones de reacción de amplificación similares, por ejemplo

temperaturas de PCR similares utilizando cebadores quiméricos con temperaturas de fusión similares.

Ejemplo 1: aislamiento de ADN y captura de híbridos específica de secuencia

5 **[0033]** Se recogieron muestras de heces y se prepararon tal como se describe en la patente U.S. No. 5.741.650 y en las solicitudes copendientes No. de serie 08/876.638, presentada el 16 de junio de 1997.

Específicamente, se recogieron heces y se prepararon de manera que una muestra contuviese por lo menos una parte de sección transversal de heces evacuadas por un paciente. Alternati-
10 vamente puede utilizarse una deposición completa. Las muestras congeladas de heces en primer lugar se homogeneizaron en un tampón fisiológicamente compatible (por ejemplo que presentase una concentración final de: Tris 500 mM, EDTA 16 mM y NaCl 10 mM, pH 9,0), utilizando un agitador Exactor II durante 15 minutos. Se añadió una solución de SDS al 20% hasta una concentración final del 0,5%. También se añadió proteinasa K hasta una concentra-
15 ción final de 500 µg/ml y se incubó a 37°C.

[0034] Tras la homogeneización, se centrifugó cada muestra dos veces para eliminar materia particulada, y se incubó el sobrenadante con ARNasa libre de ADNasa. A continuación, se precipitó el ADN con acetato sódico 300 mM e isopropanol, se centrifugó y se resuspendió en un tampón de TE (Tris 10 mM, EDTA 1 mM, pH 7,4).

20 **[0035]** Tras la preparación de ácidos nucleicos totales, se capturó ADN que incluía una región diana de interés utilizando una sonda de captura específica de secuencia diana. Por ejemplo, se capturaron respectivamente moléculas de ADN que portaban uno de los tres marcadores genéticos humanos descritos en el Ejemplo 3 posterior, utilizando sondas oligonucleótidas de captura específicas para cada diana: p16, hMLH1 y MGMT. En la Tabla 1 se lista la sonda de
25 captura específica para cada uno de dichos marcadores diana. De manera similar, pueden utilizarse otras sondas de captura para capturar otras regiones diana de interés. En los procedimientos de captura, se combinaron 300 µl de cada preparación de muestra de ADN con un volumen igual de isotiocianato de guanidinio 6 M y 20 nmoles de cada sonda de captura oligonucleótida biotinilada específica de secuencia. A continuación, se calentó la mezcla a 95°C
30 durante 5 minutos, se enfrió sobre hielo y se incubó durante la noche a 25°C. Tras la incubación, las muestras hibridadas se diluyeron con 1 ml de H₂O estéril, se añadieron 100 µl (1 mg) de perlas paramagnéticas de poliestireno recubiertas de estreptavidina (Dynabeads® M-280 Streptavidin, Dynal ASA, Oslo, Noruega) y la suspensión de muestra-perlas se mezcló continuamente y se incubó durante una hora a temperatura ambiente. Tras la incubación, seguidamente se aislaron los complejos de oligonucleótido-biotina unido a perla-ADN utilizando un
35 separador magnético y se lavaron cuatro veces con tampón de unión y de lavado (tampón B&W; NaCl 1 M, Tris 10 mM (pH 7,2), EDTA 1 mM y Tween® 20 al 0,1%). A continuación, las

secuencias capturadas se eluyeron de los complejos de perlas mediante la adición de 40 µl de 0,1xTE (Tris 1 mM, EDTA 100 nM (pH 7,4)) y se calentaron a 85°C durante 4 minutos.

Tabla 1. Secuencias de sondas de captura

Sonda de captura P16	GGTGA CCAGC CAGCC CCTCC TCTTT CTTCC TCCGG TG	SEC ID nº 1
Sonda de captura MGMT	CGAGG CTGCC ACCGT CCCGA GGGAG AGCTC CGCAC TC	SEC ID nº 2
Sonda de captura hMLH1	TCGTT TTTAG GAGCT CGGGG AATAC GAAAT ATCCA GCCAA	SEC ID nº 3

Ejemplo 2: detección sensibilizada de la hipermetilación de promotor de APC humano

[0036] Se utilizaron los métodos de la invención para detectar la hipermetilación de islas CpG en la región promotora del gen APC humano. La hipermetilación es indicativa de anormalidad o deficiencia de la actividad supresora tumoral de la proteína APC. Se demostró que los métodos eran altamente sensibles para detectar cantidades reducidas de ADN hipermetilado en una muestra heterogénea.

[0037] En primer lugar se aisló ADN y se realizó una captura híbrida de las muestras de heces de pacientes tal como se describe en el Ejemplo 1, excepto en que la sonda de captura presentaba la secuencia siguiente: CCCCCG CCCAA CCGCA CAGCC TGCCT AGCCC TAGCC CC (SEC ID No. 4). A continuación, se sometió la muestra de ADN a modificación con bisulfito que convirtió las citosinas no metiladas en uracilos. Se sometieron a PCR separadas dos alícuotas de las muestras tratadas con bisulfito. Los cebadores utilizados en la primera alícuota eran cebadores quiméricos según la invención, que incluían una parte 3' específica para un molde diana metilado; los cebadores utilizados en la segunda alícuota eran cebadores quiméricos que incluían una parte 3' específica para un molde diana no metilado modificado de esta manera. Los resultados de amplificación de ambas alícuotas seguidamente se sometieron a electroforesis en gel, se tiñeron con bromuro de etilo y se visualizaron.

[0038] El amplicón detectado en la primera alícuota se purificó adicionalmente y se secuenció para confirmar el resultado positivo de hipermetilación. Se observó un grado elevado de especificidad al utilizar los métodos de la invención en los ensayos de detección.

[0039] Los materiales y métodos específicos para el presente ejemplo son los siguientes: el ADN se modificó con bisulfito sódico u otros agentes comparables, tal como se describe en la patente U.S. No. 5.786.146 de Herman *et al.* El tratamiento con bisulfito modificó la citosina no metilada convirtiéndola en uracilo, que se amplificaría en como timidina en el producto de amplificación. El tratamiento de bisulfito no afectó a la citosina metilada, permitiendo que la PCR posterior distinguiese entre el ADN metilado y el ADN no metilado en una población heterogénea.

[0040] Los cebadores quiméricos utilizados para amplificar la diana metilada fueron: 5'-GCGGT CCCAA AAGGG TCAGT TATTG CGGAG TGCGG GTC-3' para el cebador directo (SEC ID No. 5), y 5'-GCGGT CCCAA AAGGG TCAGT TCGAC GAACT CCCGA CGA-3' para el

cebador inverso (SEC ID No. 6). Los cebadores quiméricos utilizados para amplificar la diana no metilada, y por lo tanto que contienen T (o su complemento A) en lugar de C (o su complemento G), eran 5'-GCGGT CCCAA AAGGG TCAGT GTGTT TTATT GTGGA GTGTG GGTT-3' para el cebador directo (SEC ID No. 7) y 5'-GCGGT CCCAA AAGGG TCAGT CCAAT CAACA AACTC CCAAC AA-3' para el cebador inverso (SEC ID No. 8). Los cuatro cebadores presentan el mismo extremo 5' que es la parte no específica: 5'-GCGGTCCCAAAAGGGTCAGT-3' (SEC ID No. 9). Todos los oligonucleótidos utilizados en los ejemplos se purificaron mediante HPLC y se cuantificaron mediante espectrofotometría.

[0041] Se llevó a cabo una PCR en cada alícuota en una muestra de reacción de 50 µl con 10 µl de ADN tratado con bisulfito. Tras añadir la polimerasa Hot Start (Qiagen), se llevó a cabo una reacción de inicio en caliente de cada mezcla de reacción a 95°C durante 15 minutos. Las reacciones se llevaron a cabo en un ciclador térmico Perkin-Elmer 9600 (Perkin-Elmer, Norwal, CT) con los ajustes de temperatura siguientes: 39 ciclos de 94°C durante 30 segundos, 65°C durante 60 segundos y 72°C durante 60 segundos. La temperatura de fusión/hibridación de 65°C era 10°C más alta que la temperatura convencional de hibridación, utilizada en Esterller M. *et al.*, "Analysis of Adenomatous Polyposis Coli Promoter Hypermethylation in Human Cancer", Cancer Research 60:4366 (15 de agosto de 2000), incorporada como referencia en la presente memoria.

[0042] Para los análisis de producto de PCR, se cargaron 8 µl de las reacciones de amplificación directamente sobre un gel de agarosa teñida con bromuro de etidio al 4% y se sometieron a electroforesis a 200 V durante 90 minutos. Los productos de amplificación se visualizaron con un transiluminador de UV (Fotodyne, New Berlin, WI) y se fotografiaron con un sistema digital de obtención de imágenes Alpha Innotech IS-500 versión 1.97 (Sun Bioscience Inc., Branford, CT).

[0043] Los resultados positivos de hipermetilación, es decir el amplicón de la primer alícuota, se purificaron utilizando un sistema de purificación de ADN Wizard PCR Preps (Promega) y se secuenciaron para su confirmación.

Ejemplo 3: detección de la hipermetilación en múltiples loci

[0044] Se utilizaron los métodos de la invención para cribar para cáncer colorrectal mediante la detección de la hipermetilación de islas CpG en múltiples genes o loci genéticos utilizando muestras de heces. El ensayo de la hipermetilación en múltiples loci en una muestra heterogénea puede proporcionar un medio más fiable de detección de determinadas enfermedades.

[0045] Los marcadores de hipermetilación de tres genes humanos, p16, hMLH1 y MGMT se estudiaron utilizando métodos de la invención. Se recogieron muestras de tejido (mucosa colorrectal) y deposiciones individuales de cada uno de 12 pacientes en los que se había diagnosticado clínicamente cáncer colorrectal. Se recogieron deposiciones individuales de cada uno de

10 controles colonoscópicamente normales. Todas las deposiciones se recogieron previamente al lavado catártico para colonoscopia o cirugía y se almacenaron inmediatamente a -70°C.

[0046] Se aisló el ADN de los tejidos recogidos (mucosa colorrectal) utilizando técnicas convencionales (minikit de ADN de Qiagen). Se aisló el ADN de las deposiciones recogidas y se sometió a captura híbrida específica de secuencia tal como se describe en el Ejemplo 1, excepto en que el ADN de captura híbrida se eluyó de los complejos de perlas directamente hacia la solución alcalina para iniciar la modificación con bisulfito. La modificación con bisulfito de las muestras de ADN se llevó a cabo tal como se describe en el Ejemplo 2. A continuación, se sometieron a ensayo los marcadores hipermetilados mediante técnicas de PCR de la invención utilizando cebadores quiméricos parcialmente específicos para secuencia de CpG no modificada (por lo tanto metilada), tal como se indica en la Tabla 2, o parcialmente específica para secuencia de CpG modificada (por lo tanto no metilada), tal como se indica en la Tabla 3. Las muestras de ADN se analizaron a doble ciego.

Tabla 2. Secuencias de cebador específicas de metilación

Descripción del cebador	Secuencia	Tm para la PCR	SEC ID No.
cebador directo de PCR P16	GCGGT CCCAA AAGGG TCAGT GGCGG ATCGA GTGCG TTC	58°C	10
cebador inverso de PCR P16	GCGGT CCCAA AAGGG TCAGT ACTCC CCGCC GCCCG CTA	58°C	11
cebador directo de PCR hMLH1	GCGGT CCCAA AAGGG TCAGT ATTAA TAGGA AGAGC GGATA GC	58°C	12
cebador inverso de PCR hMLH1	GCGGT CCCAA AAGGG TCAGT TTCGT CCCTC CCTAA AACGA	58°C	13
cebador directo de PCR MGMT	GCGGT CCCAA AAGGG TCAGT CGTTT TGCCT TTCGA CGTTC	55°C	14
cebador inverso de PCR MGMT	GCGGT CCCAA AAGGG TCAGT CACTC TTCCG AAAAC GAAAC G	55°C	15

Tabla 3. Secuencias de cebador no específicas de metilación

Descripción del cebador	Secuencia	Tm para la PCR	SEC ID No.
cebador directo de PCR P16	GCGGT CCCAA AAGGG TCAGT GGGGT GGATT GAGTG TGTTT	58°C	16
cebador inverso de PCR P16	GCGGT CCCAA AAGGG TCAGT ATACT ACTCC CCACC ACCAA	58°C	17
cebador directo de PCR hMLH1	GCGGT CCCAA AAGGG TCAGT AATGA ATTAA TAGGA AGAGT GGATA GT	58°C	18
cebador inverso de PCR hMLH1	GCGGT CCCAA AAGGG TCAGT TCTCT TCATC CCTCC CTAAA ACA	58°C	19
cebador directo de PCR MGMT	GCGGT CCCAA AAGGG TCAGT TTTT AGAAT GTTT GTGT TTGAT	55°C	20
cebador inverso de PCR MGMT	GCGGT CCCAA AAGGG TCAGT ACCCA AACAC TCACC AAATC A	55°C	21

[0047] Para las muestras de tejido/mucosa, se encontró que por lo menos uno de los tres marcadores se encontraba hipermetilado en muestras de 9 de entre 12 pacientes de cáncer (75%). Individualmente, el marcador p16 era positivo en 7 pacientes de cáncer, hMLH1 en 3

pacientes de cáncer, y MGMT en 6 pacientes de cáncer. Se encontró que ninguno de los marcadores se encontraba metilado en ninguna muestra de tejido/mucosa procedente de los 10 pacientes de control.

[0048] Para las muestras de heces, se encontró que por lo menos uno de los tres marcadores se encontraba hipermetilado en muestras de 7 de entre 12 pacientes de cáncer (58%). De 9 personas identificadas como positivas mediante las muestras de tejido, 7 fueron identificadas como positivas utilizando los métodos de la invención. Individualmente, el marcador p16 era positivo en 4 pacientes de cáncer, MLH1 en 1 paciente de cáncer y MGMT en 4 pacientes de cáncer. El marcador p16 también era positivo en la muestra de heces de 1 paciente de control, y el marcador MGMT en 2 de las muestras de control. Estos resultados podrían constituir un indicio de enfermedad en pacientes considerados controles sanos. El marcador hMLH1 no era positivo en ninguno de los pacientes de control.

[0049] Por lo tanto, la invención proporciona métodos no invasivos para detectar indicios de cáncer en muestras heterogéneas de pacientes, tales como muestras de heces.

Ejemplo 4: marcadores alternativos para detectar la hipermetilación

[0050] También se proporcionan en la presente invención otros marcadores y secuencias que podrían resultar útiles en el cribado de cáncer colorrectal. De manera similar al Ejemplo 3, la detección de hipermetilación en cualquiera de los genes siguientes podría indicar un riesgo más alto de cáncer colorrectal: p14, HLTF, MINT31, MINT2, HIC1. Puede utilizarse cualquiera de dichos marcadores en combinación con cualquiera de los marcadores indicados en los ejemplos anteriores, incluyendo APC, p16, hMLH1 y MGMT.

[0051] Se proporcionan ejemplos de sondas de captura útiles en la Tabla 4, más abajo. Se proporcionan en la Tabla 5 posterior, ejemplos de cebadores quiméricos parcialmente específicos para secuencias de CpG no modificadas mediante el tratamiento de bisulfito (por lo tanto moldes metilados). La Tabla 6 lista ejemplos de cebadores quiméricos parcialmente específicos para secuencias de CpG modificadas mediante el tratamiento de bisulfito (por lo tanto moldes no metilados).

Tabla 4: Secuencias de sondas de captura

Sonda de captura P14	CCTTA ACTGC AGACT GGGAC CCACG CACCG CCGCC TG	SEC ID No. 22
Sonda de captura HLTF	GGTGC CTGCG GTGCC GGTGT TTTGT TTGAT TCCCT GC	SEC ID No. 23
Sonda de captura MINT31	ATGGG GGGGA GGGGA TGGGG GAAGT GGCAG AGTGG CT	SEC ID No. 24
Sonda de captura MINT2	ACTTG GGTGC TAGAG TTCGG CGGGA AGAAA AGGTG AC	SEC ID No. 25

Tabla 5. Secuencias de cebador específico de metilación

Descripción del cebador	Secuencia	SEC ID No.
Cebador directo de PCR P14	GCGGT CCCAA TAGGG TCAGT GTGTT AAAGG GCGGC GTAGC	26
Cebador inverso de PCR P14	GCGGT CCCAA AAGGG TCAGT AAAAC CCTCA CTCGC GACGA	27

Cebador directo de PCR HLTF	GCGGT CCCAA TAGGG TCAGT GTTTC GTGGT TTTT CGCGC	28
Cebador inverso de PCR HLTF	GCGGT CCCAA TAGGG TCATT CAAAA ACGAC GAAAA ATCCG	29
Cebador directo de PCR MINT31	GCGGT CCCAA TAGGG TCAGT TTTT TTTA TCGGT CGGGG C	30
Cebador inverso de PCR MINT31	GCGGT CCCAA TAGGG TCAGT CCTCC CGCCG CCGCA AAA	31
Cebador directo de PCR MINT2	GCGGT CCCAA TAGGG TCAGT TTTGT TAAAG GTTG AGTTC GTC	32
Cebador inverso de PCR MINT2	GCGGT CCCAA TAGGG TCAGT CGAAA TAATA ACGAC GATTC CG	33

Tabla 6. Secuencias de cebador no específicos de metilación

Descripción del cebador	Secuencia	SEC ID No.
Cebador directo de PCR P14	GCGGT CCCAA AAGGG TCAGT TTTT GGTGT TAAAG GGTGG TG TAG T	34
Cebador inverso de PCR P14	GCGGT CCCAA AAGGG TCAGT CACAA AAACC CTCAC TCACA ACAA	35
Cebador directo de PCR HLTF	GCGGT CCCAA TAGGG TCAGT GGGGT TTTGT GGT TT TTTTG TGT	36
Cebador inverso de PCR HLTF	GCGGT CCCAA TAGGG TCAGT AAAAA AACAA CTCCA CCCC CTA	37
Cebador directo de PCR MINT31	GCGGT CCCAA TAGGG TCAGT TTTT TTTT TTTAT TGGTT GGGGT	38
Cebador inverso de PCR MINT31	GCGGT CCCAA TAGGG TCAGT CACCC ACACA ACCCC CACA	39
Cebador directo de PCR MINT2	GCGGT CCCAA TAGGG TCAGT GTTGG TGGAT TTTGG ATTTT GTT	40
Cebador inverso de PCR MINT2	GCGGT CCCAA TAGGG TCAGT CAAA ATAAT AACAA CAATT CCATA	41

[0052] Son materiales y métodos ejemplares los siguientes: en primer lugar se recogieron muestras de tejido y muestras de heces. A continuación, se procesó la muestra de heces para extraer una muestra del ADN tal como se describe en el Ejemplo 1 hasta la etapa de aislar los complejos de biotina-oligonucleótido-ADN unidos a perla utilizando un separador magnético. Tras lavar las perlas separadas, se eluyó el ADN unido en 40 µl de un tampón de elución (NaOH 0,3 N y 0,5 µg de ADN de esperma de salmón) y se agitó con vórtex suavemente. Tras dejar reposar a temperatura ambiente durante 5 minutos, la muestra se agitó de nuevo con vórtex brevemente. Las perlas se separaron con el separador magnético y se transfirió el sobrenadante a un tubo de microcentrífuga de 1,5 ml. Tras incubar el sobrenadante a 37°C durante 10 minutos, se añadieron 30 µl de hidroquinona 10 mM recién preparada y 500 µl de bisulfito sódico 3 M recién preparado (pH 5,0) al sobrenadante y se agitó con vórtex. Tras añadir 200 µl de aceite mineral a la combinación, se centrifugó brevemente la muestra y se incubó a 50°C durante la noche.

[0053] Las moléculas de ADN extraídas de la muestra de tejido recogida se procesaron de la manera siguiente: se mezclaron 12 µl de NaOH 1 N y 0,5 µl de ADN de esperma de salmón (1,0 µg/µl) con 1 a 300 ng de ADN de tejido, llevando el volumen total a 40 µl para cada muestra. Tras incubar la muestra a 37°C durante 10 minutos, se añadieron 30 µl de hidroquinona 10 mM recién preparada y 500 µl de bisulfito sódico 3 M recién preparado (pH 5,0) a la muestra y se agitó con vórtex. Tras añadir 200 µl de aceite mineral a la combinación, se centrifugó brevemente la muestra y se incubó a 50°C durante la noche.

[0054] Tras el tratamiento de bisulfito, se purificaron las muestras tanto de ADN de las heces como de ADN de tejido utilizando columnas Wizard (Promega) y se utilizaron para la PCR utilizando uno o más de los cebadores listados en las Tablas 2, 3, 5 y 6. Para cada reacción de

PCR, una muestra ejemplar incluía 10 µl de ADN tratado con bisulfito y 40 µl de una mezcla maestra. La mezcla maestra consistía de 24,5 µl de agua estéril, 5 µl de tampón 10X Hot Start, 5 µl de dNTP 2 mM, 5 µl del cebador 5 µM y 0,5 µl de ADN polimerasa Taq Hot Start.

[0055] Las reacciones de PCR se llevaron a cabo en un ciclador Tetrad® (MJ Research Inc.) u otro equipo compatible. En general, en primer lugar se desnaturalizó una muestra de PCR a 95°C durante 14,5 minutos y después se sometió a 40 ciclos de lo siguiente: desnaturalización a 94°C durante 30 segundos, y un minuto de hibridación a diversas temperaturas dependiendo del cebador utilizado (ver la Tabla 7 para más detalles) y un minuto de alargamiento a 72°C. Tras los 40 ciclos, la muestra se sometió a 5 minutos adicionales de alargamiento a 72°C.

Tabla 7. Temperaturas de hibridación en PCR utilizando diversos cebadores

Marcador diana	Cebador específico de	Temperatura de hibridación (°C)
APC	Metilación	65
	No metilación	60
hMLH1	Metilación	58
	No metilación	58
p16	Metilación	58
	No metilación	58
MGMT	Metilación	55
	No metilación	55
HIC1	Metilación	60
	No metilación	60
p14	Metilación	60
	No metilación	60
HLTF	Metilación	60
	No metilación	60
MINT31	Metilación	60
	No metilación	60
MINT2	Metilación	62
	No metilación	55

[0056] Se visualizaron los productos de PCR mediante electroforesis en gel de agarosa (NuSieve al 4% en tampón TAE 1X). La cantidad de producto específico de metilación respecto a la cantidad de producto específico de no metilación puede compararse con la obtenida para una muestra de referencia conocida para determinar si la cantidad de metilación en la muestra de ensayo es superior a la normal.

REIVINDICACIONES

1. Método para determinar la presencia de un CpG metilado en un ácido nucleico, comprendiendo dicho método las etapas siguientes:

5

aislar una muestra heterogénea de ácidos nucleicos que comprende un ácido nucleico diana que contiene CpG a partir de una muestra biológica heterogénea;

poner en contacto dicha muestra de ácidos nucleicos con un agente que modifica las citosinas no metiladas;

10

llevar a cabo una reacción de amplificación en dicho ácido nucleico diana utilizando por lo menos un cebador quimérico que comprende una primera parte que no es específica de dicho ácido nucleico diana y una segunda parte situada 3' respecto a dicha primera parte, siendo dicha segunda parte específica para una citosina metilada en dicho ácido nucleico diana; y

15

detectar la presencia de un producto de amplificación para determinar la presencia de un CpG metilado en el ácido nucleico diana, y

en el que la reacción de amplificación es una reacción de PCR en la que la secuencia no específica de un cebador quimérico se incorpora en un producto de PCR tras una primera ronda de PCR.

20

2. Método según la reivindicación 1, en el que la etapa de aislamiento comprende la captura híbrida específica de una secuencia.

3. Método según la reivindicación 1, en el que dicha primera parte comprende por lo menos 5, aunque menos de aproximadamente 30 nucleótidos o aproximadamente 30 nucleótidos.

25

4. Método según la reivindicación 1, en el que dicha segunda parte comprende entre aproximadamente 10 y aproximadamente 30 nucleótidos.

30

5. Método según la reivindicación 1, en el que se utilizan por lo menos dos cebadores quiméricos, y en el que cada uno de dichos por lo menos dos cebadores presenta una primera parte idéntica.

35

6. Método según la reivindicación 1, en el que dicha primera parte presenta un contenido de G-C de por lo menos 50%.

7. Método según la reivindicación 1, en el que dicho ácido nucleico diana se selecciona de entre el grupo que consiste de ADN, ARN y un análogo de ácido nucleico.
8. Método según la reivindicación 1, en el que dicho ácido nucleico diana es de doble cadena.
9. Método según la reivindicación 1, en el que dicho ácido nucleico diana es por lo menos una parte de un gen seleccionado de entre el grupo que consiste del gen poliposis adenomatosis coli (APC), p16, hMLH1, MGMT, H1C1, p14, HLTF, MINT2 y MINT31.
10. Utilización del método según la reivindicación 1 para el cribado de una población de pacientes para un indicio de cáncer o precáncer colorrectal, comprendiendo el método las etapas siguientes:
- proporcionar una pluralidad de ácidos nucleicos molde diana aislado de cada paciente; y
- someter a ensayo cada uno de dichos moldes para la presencia de hipermetilación según el método según la reivindicación 1.
11. Método según cualquiera de las reivindicaciones anteriores, en el que la muestra biológica heterogénea es una muestra de heces.
12. Método según cualquiera de las reivindicaciones anteriores, en el que dicho ácido nucleico diana es por lo menos una parte de un gen de poliposis adenomatosa coli (APC) humana.
13. Método según una cualquiera de las reivindicaciones anteriores, en el que dicho ácido nucleico diana es por lo menos una parte de un gen HTLF.

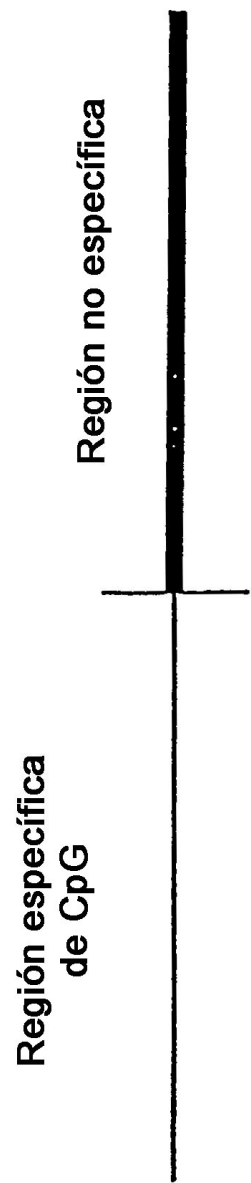


Fig. 1

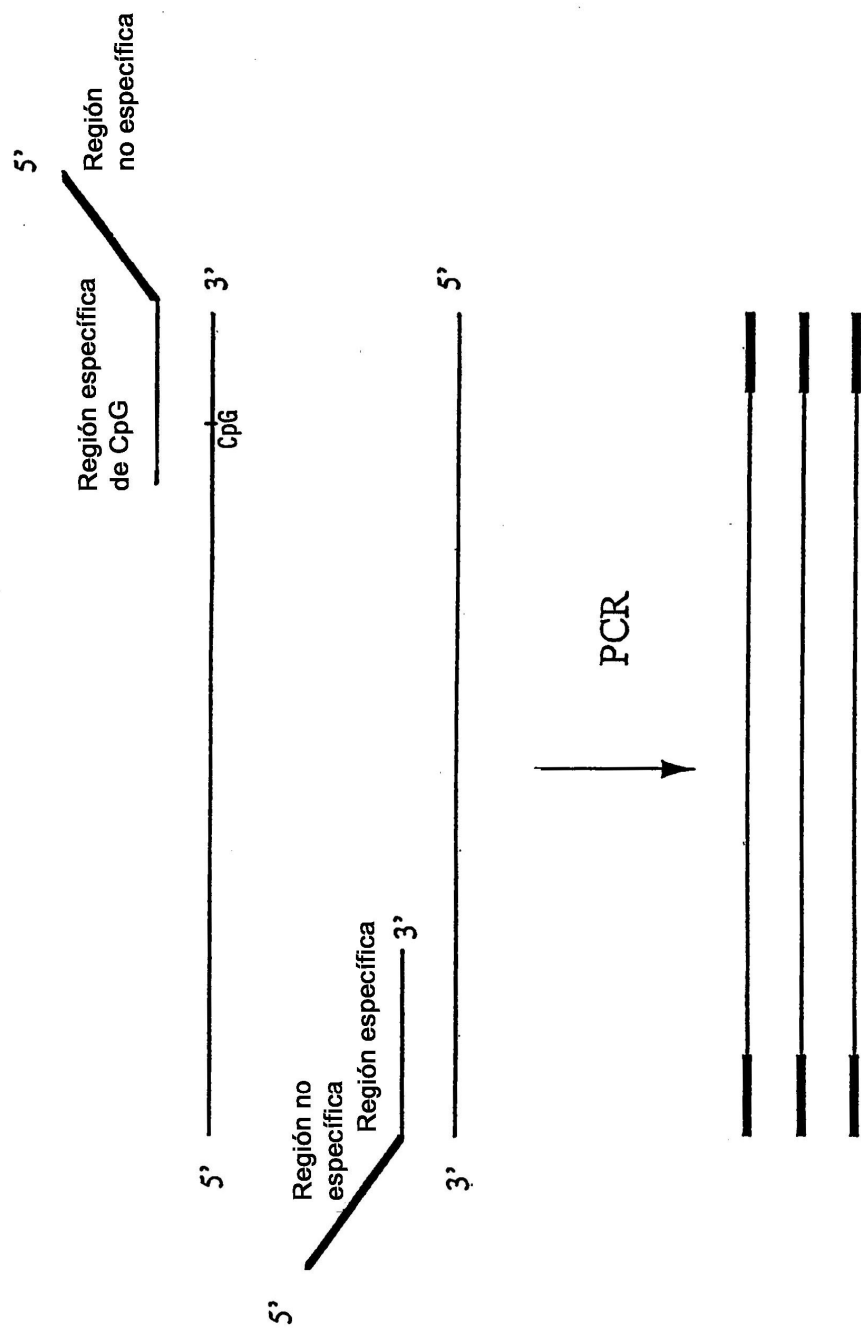


Fig. 2