



ФЕДЕРАЛЬНАЯ СЛУЖБА
ПО ИНТЕЛЛЕКТУАЛЬНОЙ СОБСТВЕННОСТИ,
ПАТЕНТАМ И ТОВАРНЫМ ЗНАКАМ

(12) **ЗАЯВКА НА ИЗОБРЕТЕНИЕ**

(21), (22) Заявка: 2003126575/13, 08.03.2002

(30) Приоритет: 09.03.2001 DE 10112515.1
19.11.2001 DE 10158283.8

(43) Дата публикации заявки: 20.02.2005 Бюл. № 5

(85) Дата перевода заявки РСТ на национальную фазу: 09.10.2003

(86) Заявка РСТ:
EP 02/02572 (08.03.2002)

(87) Публикация РСТ:
WO 02/07288 (19.09.2002)

Адрес для переписки:
121087, Москва, а/я 33, В.В.Курышеву

(71) Заявитель(и):
Эпигеномикс АГ (DE)

(72) Автор(ы):
ОЛЕК Александр (DE),
БЕРЛИН Курт (DE)

(74) Патентный поверенный:
Курышев Владимир Васильевич

(54) **ВЫСОКОЧУВСТВИТЕЛЬНЫЙ МЕТОД ОБНАРУЖЕНИЯ СТРУКТУР МЕТИЛИРОВАНИЯ ЦИТОЗИНА**

Формула изобретения

1. Метод обнаружения метилирования цитозина в образцах ДНК, отличающийся проведением следующих стадий:

образец геномной ДНК, включающий исследуемую ДНК и фоновую ДНК подвергают химической обработке таким образом, что все не метилированные основания цитозина преобразуют в урацил, при этом основания 5-метилцитозина остаются неизменными; химически обработанный образец ДНК амплифицируют применением по меньшей мере 2 олигонуклеотидов-праймеров, а также полимеразы, в результате чего исследуемая ДНК становится матричной по отношению к фоновой ДНК, и

амплифицированные продукты анализируют, и из наличия амплифицированного продукта и/или из анализа добавочных положений делают вывод о состоянии метилирования исследуемой ДНК.

2. Метод по п.1, отличающийся далее тем, что образец ДНК получают из сыворотки или других жидкостей тела человека.

3. Метод по п.1, отличающийся далее тем, что образцы ДНК получают из клеточных линий, крови, мокроты, стула, мочи, сыворотки, цереброспинальной жидкости, ткани, залитой парафином, например, ткани глаз, кишечника, почек, мозга, сердца, предстательной железы, легкого, молочной железы или печени, гистологических слайдов или других их возможных комбинаций.

4. Метод по одному из предшествующих пунктов, отличающийся далее тем, что химическую обработку проводят бисульфитам (=дисульфитом, кислым сульфитом).

5. Метод по п.4, отличающийся далее тем, что химическую обработку проводят после заливки ДНК в агарозу.

6. Метод по п.4, отличающийся далее тем, что в химической обработке присутствует реагент, денатурирующий дуплекс ДНК, и/или ловушка для радикалов.

7. Метод по любому из предшествующих пунктов, отличающийся далее тем, что амплификацию на второй стадии проводят в присутствии по меньшей мере одного добавочного олигонуклеотида или ПНК олигомера, который связывается с 5'-CG-3'-динуклеотидом или 5'-TG-3'-динуклеотидом или 5'-CA-3'-динуклеотидом, при этом другой олигонуклеотид или ПНК олигомер предпочтительно связывается с фоновой ДНК и тормозит ее амплификацию.

8. Метод по п.7, отличающийся далее тем, что этот связующий сайт добавочного олигонуклеотида или ПНК олигомера и связующие сайты праймеров на фоновой ДНК перекрываются, и добавочный олигонуклеотид замедляет связывание по меньшей мере одного праймера-олигонуклеотида с фоновой ДНК.

9. Метод по одному из п.7 или 8, отличающийся далее тем, что применяют по меньшей мере два других олигонуклеотида или ПНК олигомера, в результате чего их связующие сайты вновь перекрываются каждый раз со связующим сайтом праймера на фоновой ДНК, и добавочные олигонуклеотиды и/или ПНК олигомеры замедляют связывание обоих олигонуклеотидов-праймеров с фоновой ДНК.

10. Метод по п.9, отличающийся далее тем, что один из добавочных олигонуклеотидов и/или ПНК олигомеры тормозят связывание прямого праймера, в то время как другой тормозит связывание обратного праймера.

11. Метод по любому из пп.7-10, отличающийся далее тем, что концентрация добавочных олигонуклеотидов и/или ПНК олигомеров по меньшей мере в пять раз превышает концентрацию олигонуклеотидов-праймеров.

12. Метод по п.7, отличающийся далее тем, что добавочные олигонуклеотиды и/или ПНК олигомеры связываются с фоновой ДНК, и, таким образом, тормозят полную элонгацию олигонуклеотидов-праймеров в реакции полимеразы.

13. Метод по п.12, отличающийся далее тем, что применяемая полимеразы не обладает активностью 5'-3'-экзонуклеазы.

14. Метод по п.12, отличающийся далее тем, что присутствующие добавочные олигонуклеотиды модифицированы на 5' конце и не могут существенно разрываться полимеразой с 5'-3' активностью экзонуклеазы.

15. Метод по одному из пунктов 7-14, отличающийся далее тем, что олигонуклеотиды, применяемые в дополнение к праймерам, не имеют 3'-ОН функции.

16. Метод по любому из предшествующих пунктов, отличающийся далее тем, что химически обработанный образец ДНК амплифицируют на второй стадии с использованием по меньшей мере 2 олигонуклеотидов-праймеров и одного добавочного олигонуклеотида или ПНК олигомера, который гибридизируется с 5'-CG-3'-динуклеотидом или 5'-TG-3'-динуклеотидом или 5'-CA-3'-динуклеотидом, и по меньшей мере одного олигонуклеотида-репортера, который гибридизируется с 5'-CG-3'-динуклеотидом или 5'-TG-3'-динуклеотидом или 5'-CA-3'-динуклеотидом, а также полимеразой; в результате чего добавочный олигонуклеотид или ПНК олигомер связывается с фоновой ДНК и сдерживает ее амплификацию, и в результате чего олигонуклеотид-репортер связывается с исследуемой ДНК и указывает на ее амплификацию.

17. Метод по п.16, отличающийся далее тем, что кроме олигонуклеотида-репортера применяют другой олигомер, помеченный флуоресцентным красителем, который гибридизируется с участком, непосредственно прилегающим к олигонуклеотиду-репортеру, и эту гибридизацию можно обнаружить посредством передачи резонансной энергии флуоресценции.

18. Метод по любому из п.16 или 17, отличающийся далее тем, что анализ проводят по методике TaqMan.

19. Метод по любому из п.16 или 17, отличающийся далее тем, что анализ проводят по методике LightCycle.

20. Метод по любому из пп.16-19, отличающийся далее тем, что олигонуклеотид-репортер имеет по меньшей мере одну флуоресцентную метку.

21. Метод по любому из пп.16-20, отличающийся далее тем, что молекулы репортера указывают амплификацию либо усилением, либо ослаблением флуоресценции.

22. Метод по п.21, отличающийся далее тем, что усиление или ослабление флуоресценции также непосредственно используют для анализа, и состояние метилирования исследуемой ДНК определяют по флуоресцентному сигналу.

23. Метод по любому из предшествующих пунктов, отличающийся далее тем, что концентрация присутствующей фоновой ДНК в 100 раз превышает концентрацию исследуемой ДНК.

24. Метод по любому из предшествующих пунктов, отличающийся далее тем, что концентрация присутствующей фоновой ДНК в 1000 раз превышает концентрацию исследуемой ДНК.

25. Метод по любому из предшествующих пунктов, отличающийся далее тем, что анализ или, в случае метода по любому из пп.6-11, дополнительный анализ, проводят посредством гибридизации с олигомерными решетками, где олигомерами могут быть нуклеиновые кислоты или молекулы, такие как ПНК, схожие с ними по своим свойствам гибридизации.

26. Метод по п.25, отличающийся далее тем, что олигомеры гибридизируются с анализируемой ДНК посредством сегмента длиной в 12-22 основания и включают CG-, TG- или CA-динуклеотид.

27. Метод по одному из п.25 или 26, отличающийся далее тем, что состояние метилирования более 20 положений метилирования анализируемой ДНК выявляют в одном эксперименте.

28. Метод по одному из п.25 или 26, отличающийся далее тем, что состояние метилирования более 60 положений метилирования анализируемой ДНК выявляют в одном эксперименте.

29. Метод по одному из пп.1-24, отличающийся далее тем, что анализ или, в случае пп.16-19, дополнительные анализы, проводят измерением длины исследуемой амплифицированной ДНК, и методы измерения длины включают гель-электрофорез, капиллярный гель-электрофорез, хроматографию (например, ЖХВР), масс-спектрометрию и другие подходящие методы.

30. Метод по одному из пп.1-24, отличающийся далее тем, что анализ, или, в случае пп.16-19, дополнительные анализы, проводят секвенированием, и методы секвенирования включают метод Санджера, метод Максам-Гилберта и другие методы, такие как секвенирование гибридизацией (SBH).

31. Метод по п.30, отличающийся далее тем, что секвенирование для каждого CpG-положения или небольшой группы этих положений проводят каждый раз отдельным олигонуклеотидом-праймером и удлинение сегмента праймера включает только одно или несколько оснований, и по типу удлинения сегмента праймера делают вывод о состоянии метилирования соответствующих положений в ДНК, предназначенной для исследования.

32. Метод по одному из предшествующих пунктов, отличающийся далее тем, что о наличии заболевания или другого клинического состояния больного делают вывод из степени метилирования различных исследуемых CpG-положений.

33. Метод по одному из предшествующих пунктов, отличающийся далее тем, что сами амплифицированные продукты для их выявления снабжены обнаруживаемой меткой.

34. Метод по п.33, отличающийся далее тем, что метками являются флуоресцентные метки.

35. Метод по п.33, отличающийся далее тем, что метки представляют собой радионуклиды.

36. Метод по п.33, отличающийся далее тем, что метки представляют собой съемные метки массы, которые обнаруживаются масс-спектрометром.

37. Метод по одному из предшествующих пунктов, отличающийся далее тем, что в амплификации один из праймеров связан с твердой фазой.

38. Метод по одному из пп.1-33, отличающийся далее тем, что амплифицированные продукты обнаруживаются в целом в масс-спектрометре и, таким образом, четко характеризуются по массе.

39. Применение метода по одному из предшествующих пунктов для диагностики и/или прогнозирования неблагоприятных явлений для больных, если такие неблагоприятные явления входят по меньшей мере в одну из следующих категорий: нежелательная лекарственная интерференция; раковые заболевания; CNS дисфункции, нарушения или заболевания; симптома агрессии или поведенческие реакции; клинические, психологические или социальные последствия нарушения мозговой деятельности; психотические расстройства и изменения личности; старческое слабоумие и/или сопутствующие синдромы; сердечно-сосудистые заболевания, расстройства и нарушения; расстройства, нарушения и заболевания желудочно-кишечного тракта; расстройства, нарушения и заболевания дыхательной системы; повреждения, воспаление, инфекция, состояния иммунитета и/или выздоровления; дисфункции, нарушения или заболевания организма как отклонение в развитии; патология, повреждения или заболевания кожи, мышц, соединительной ткани или костей; нарушение, дисфункции или заболевания эндокринной системы и обменных процессов; головные боли или расстройства функции половой сферы.

40. Применение метода по одному из предшествующих пунктов для различения типов клеток или тканей или для исследования клеточной дифференциации.

41. Комплект, включающий реагент, содержащий бисульфит, праймеры и другие олигонуклеотиды без 3'-ОН функции для получения амплифицированных продуктов, а также инструкцию для проведения анализа по изобретению в соответствии с одним из пп.1-38.

RU 2 0 0 3 1 2 6 5 7 5 A

RU 2 0 0 3 1 2 6 5 7 5 A