



(19)



OFICINA ESPAÑOLA DE
PATENTES Y MARCAS

ESPAÑA

(11) Número de publicación: **2 299 520**

(51) Int. Cl.:
C12Q 1/68 (2006.01)

(12)

TRADUCCIÓN DE PATENTE EUROPEA

T3

(86) Número de solicitud europea: **01980315 .4**

(86) Fecha de presentación : **01.09.2001**

(87) Número de publicación de la solicitud: **1423528**

(87) Fecha de publicación de la solicitud: **02.06.2004**

(54) Título: **Procedimiento para la determinación del grado de metilación de determinadas citosinas en DNA genómico en el contexto secuencial 5'-CpG-3'.**

(30) Prioridad: **01.09.2000 DE 100 43 826**
05.09.2000 DE 100 44 543

(45) Fecha de publicación de la mención BOPI:
01.06.2008

(45) Fecha de la publicación del folleto de la patente:
01.06.2008

(73) Titular/es: **Epigenomics AG.**
Kleine Präsidentenstrasse 1
10178 Berlin, DE

(72) Inventor/es: **Olek, Alexander;**
Piepenbrock, Christian;
Berlin, Kurt y
Gütig, David

(74) Agente: **Lehmann Novo, María Isabel**

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

Procedimiento para la determinación del grado de metilación de determinadas citosinas en DNA genómico en el contexto secuencial 5'-CpG-3'.

La invención se refiere a un procedimiento para la detección del grado de metilación de una citosina determinada en el contexto secuencial 5'-CpG-3' en una muestra de DNA genómico.

Los niveles de observación bien estudiados después de los desarrollos metodológicos de los últimos años en la biología molecular son los genes propiamente dichos, la traducción de estos genes en RNA y las proteínas formadas a partir de ellos. En qué momento del transcurso del desarrollo de un individuo se activa un gen determinado y de qué modo se controla la activación y la inhibición de determinados genes en determinadas células y tejidos, está en correlación con la extensión y el carácter de la metilación del gen o del genoma. En relación con esto, se manifiestan estados patológicos en un modelo de metilación modificado de genes individuales o del genoma.

La presente invención describe un procedimiento, con el cual pueden investigarse muchas bases de citosina en una muestra de DNA dada simultáneamente en cuanto a la presencia de un grupo metilo en la posición 5 por medio de hibridación. La invención describe además ácidos nucleicos, oligonucleótidos y oligómeros PNA que son útiles para emplear el procedimiento para el diagnóstico de enfermedades existentes o de la predisposición a enfermedades.

La 5-metilcitosina es la base modificada covalentemente más frecuente en el DNA de las células eucariotas. La misma juega por ejemplo un papel en la regulación de la transcripción, en la impresión de la huella genética y en la génesis de los tumores. La identificación de 5-metilcitosina como constituyente de información genética presenta por tanto un interés considerable. Las posiciones de 5-metilcitosina no pueden, sin embargo, identificarse por secuenciación, dado que la 5-metilcitosina exhibe el mismo comportamiento de apareamiento de bases que la citosina. Adicionalmente, en el caso de una amplificación por PCR, se pierde por completo la información epigenética que llevan las 5-metilcitosinas.

La metilación de las islas CpG se equipara a menudo con inactividad de transcripción. Aunque existen pruebas inequívocas a favor de que las islas de CpG puedan encontrarse en los promotores de los genes, no todas las islas de CpG y puntos de metilación están localizados en promotores conocidos. En el caso de diferentes genes específicos de tejidos e "impresores de la huella", las islas de CpG están localizadas a distancias considerables aguas abajo del comienzo de la transcripción y, adicionalmente, muchos genes poseen promotores múltiples. Para una multiplicidad de enfermedades, se ha documentado como causante la metilación de dinucleótidos de CpG. En contraposición a las mutaciones clásicas, en el caso de la metilación del DNA se trata de un mecanismo que describe una sustitución de bases, sin modificar la fracción codificante de un gen. Este cambio entre modificación epigenética y mutaciones clásicas juega un papel importante en la génesis de los tumores. Por ejemplo, la hipermetilación focal y la desmetilación genómica generalizada son características de muchos tipos de tumores diferentes. Está aceptado que la génesis de los tumores y la progresión de los mismos están causadas por una parte por hipermetilación de episodios de mutación inducidos y por otra parte por la desactivación de genes, que controlan la proliferación celular y/o la reactivación inducida de genes por desmetilación, que son utilizados únicamente para el desarrollo embriológico.

En el caso del cáncer colorrectal hereditario distinto de la poliposis, por ejemplo, la mayor parte de los casos de cáncer de intestino grueso negativos en cuanto a mutaciones depende más probablemente de la hipermetilación del promotor hMLH1 y de la falta de expresión subsiguiente de hMLH1, un gen reparador de los apareamientos erróneos (Bevilacqua RA, Simpson AJ, Methylation of the hMLH1 promoter but no hMLH1 mutations in sporadic gastric carcinomas with high-level microsatellite instability. *Int J Cancer*. 2000 Jul 15; 87 (2):200-3.). En la patogénesis del cáncer de pulmón, la pérdida de expresión está correlacionada con la metilación de islas de CpG en la secuencia promotora de un efector-homólogo RAS. (Dammann R, Li C, Yoon JH, Chin PL, Bates S, Pfeifer GP, Nucleotide. Epigenetic inactivation of a RAS association domain family protein from the lung tumour suppressor locus 3p21.3. *Nat Genet*. 2000 Jul; 25(3):315-9). Una desactivación epigenética del gen supresor de tumores LKB1, que incluye la hipermetilación del promotor, está asociada con el Síndrome de Peutz-Jeghers (Esteller M, Avizienyte E, Corn PG, Lothe RA, Baylin SB, Aaltonen LA, Herman JG, Epigenetic inactivation of LKB1 in primary tumors associated with the Peutz-Jeghers syndrome. *Oncogene*. 2000 Jan 6; 19(1):164-8).

Una multiplicidad de enfermedades, que están asociadas con la metilación, exhiben en su etiología una asociación estrecha con los genes supresores de tumores p16 o p15. Así, está aceptada una relación entre Mycosis fungoides y la hipermetilación del gen p16(INK4a) (Navas IC, Ortiz-Romero PL, Villuendas R, Martínez P, García C, Gómez E, Rodríguez JL, García D, Vanaclocha F, Iglesias L, Piris MA, Algara P, p16 (INK4a) gene alterations are frequent in lesions of mycosis fungoides. *Am J Pathol*. 2000 May; 156(5):1565-72). Se parte también de una correlación estrecha entre la desactivación de la transcripción del gen p16 en el carcinoma gástrico y la metilación de novo de varios puntos de CpG menos específicos (Song SH, Jong HS, Choi HH, Kang SH, Ryu MH, Kim NK, Kim WH, Bang YJ, Methylation of specific CpG sites in the promoter region could significantly down-regulate p16(INK4a) expression in gastric adenocarcinoma. *Int J Cancer*. 2000 Jul 15; 87(2):236-40). La patogénesis del colangiocarcinoma, que está asociado con la colangitis esclerosante primaria, está relacionada con la desactivación del gen supresor de tumores p16, que depende a su vez de la metilación del promotor p16 (Ahrendt SA, Eisenberger CF, Yip L, Rashid A, Chow JT, Pitt HA, Sidransky D. Chromosome 9p21 loss and p16 inactivation in primary sclerosing cholangitis-associated cholangiocarcinoma. *J Surg Res*. 1999 Jun 1; 84(1):88-93). En la génesis de la leucemia y en el progreso de la leucemia

linfática aguda juega un papel la desactivación del gen p16 por hipermetilación (Nakamura M, Sugita K, Inukai T, Goi K, Iijima K, Tezuka T, Kojika S, Shiraishi K, Miyamoto N, Karakida N, Kagami K, O-Koyama T, Mori T, Nakazawa S. p16/MTS1/INK4A gene is frequently inactivated by hypermethylation in childhood acute lymphoblastic leukemia with 11q23 translocation. *Leukemia*. 1999 Jun; 13(6): 884-90). Adicionalmente, se ha postulado que la hipermetilación de los genes p16 y p15 juega un papel decisivo en la génesis de los tumores del mieloma múltiple (Ng MH, Wong IH, Lo KW. DNA methylation changes and multiple myeloma. *Leuk Lymphoma*. 1999 Aug; 34(5-6):463-72). En la predisposición para el carcinoma renal parece estar implicado el gen VHL desactivado por metilación (Glavac D, Ravnik-Glavac M, Ovcak Z, Masera A, Genetic changes in the origin and development of renal cell carcinoma (RCC). *Pflugers Arch*. 1996; 431(6 Suppl 2):R193-4). Una metilación anómala de la isla 5'CpG está implicada posiblemente en la desactivación de la transcripción del gen p16 en el caso del carcinoma nasofaríngeo (Lo KW, Cheung ST, Leung SF, van Hasselt A, Tsang YS, Mak KF, Chung YF, Woo JK, Lee JC, Huang DP, Hypermethylation of the p16 gene in nasopharyngeal carcinoma. *Cancer Res*. 1996 Jun 15; 56(12):2721-5). En el caso del carcinoma de las células hepáticas, se ha documentado una desactivación de la proteína p16. La hipermetilación de promotores y deleciones homocigóticas forman parte en este caso de los mecanismos frecuentes (Jin M, Piao Z, Kim NG, Park C, Shin EC, Park JH, Jung HJ, Kim CG, Kim H, p16 is a major inactivation target in hepatocellular carcinoma. *Cancer*. 2000 Jul 1; 89(1): 60-8). La metilación del DNA como control de la expresión génica se ha documentado para el gen BRCA1 en el caso del cáncer de mama (Magdinier F, Billard LM, Wittmann G, Frappart L, Benchaib M, Lenoir GM, Guerin JF, Dante R Regional methylation of the 5' end CpG island of BRCA1 is associated with reduced gene expression in human somatic cells *FASEB J*. 2000 Aug; 14(11):1585-94). Una correlación entre metilación y linfoma no-Hodgkin está admitida también (Martínez-Delgado B, Richart A, García MJ, Robledo M, Osorio A, Cebrián A, Rivas C, Benítez J, Hypermethylation of P16ink4a and P15ink4b genes as a marker of disease in the follow-up of non-Hodgkin's lymphomas. *Br J Haematol*. 2000 Apr; 109(1):97-103).

La metilación de CpG provoca también la progresión de la leucemia de las células T, que está relacionada con la expresión disminuida del gen CDKN2A (Nosaka K, Maeda M, Tamiya S, Sakai T, Mitsuya H, Matsuoka M, Increasing methylation of the CDKN2A gene is associated with the progression of adult T-cell leukemia. *Cancer Res*. 2000 Feb 15; 60(4):1043-8). En el caso del cáncer de vejiga, se ha comprobado una metilación incrementada de las islas CpG (Salem C, Liang G, Tsai YC, Coulter J, Knowles MA, Feng AC, Groshen S, Nichols PW, Jones PA, Progressive increases in de novo methylation of CpG islands in bladder cancer. *Cancer Res*. 2000 May 1; 60(9):2473-6). La desactivación de la transcripción de los carcinomas epiteliales de placas del esófago está relacionada con la metilación del gen FHIT, que está asociado a la progresión de la enfermedad (Shimada Y, Sato F, Watanabe G, Yamasaki S, Kato M, Maeda M, Imamura M, Loss of fragile histidine triad gene expression is associated with progression of esophageal squamous cell carcinoma, but not with the patient's prognosis and smoking history. *Cancer*. 2000 Jul 1; 89(1):5-11). La endopeptidasa neutra 24.11 (NEP) desactiva el crecimiento de neuropéptidos que están implicados en el progreso del cáncer de próstata independiente de andrógenos. Una pérdida de la expresión de NEP por hipermetilación del promotor de NEP contribuye posiblemente al desarrollo del cáncer de próstata independiente de andrógenos estimulados por neuropéptidos (Usmani BA, Shen R, Janeczko M, Papandreou CN, Lee WH, Nelson WG, Nelson JB, Nanus DM, Methylation of the neutral endopeptidase gene promoter in human prostate cancers. *Clin Cancer Res*. 2000 May; 6(5):1664-70). El tumor adrenocortical en los adultos exhibe anomalías estructurales en el DNA del tumor. Estas anomalías comprenden entre otras una sobreexpresión del gen IGF2 en correlación con una desmetilación del DNA en este locus (Wilkin F, Gagne N, Paquette J, Oligny LL, Deal C, Pediatric adrenocortical tumors: molecular events leading to insulin-like growth factor II gene overexpression. *J Clin Endocrinol Metab*. 2000 May; 85(5):2048-56. Revisión). Está admitido que en el caso del gen del retinoblastoma están implicadas en la enfermedad metilaciones del DNA en varios exones (Mancini D, Singh S, Ainsworth P, Rodenhiser D, Constitutively methylated CpG dinucleotides as mutation hot spots in the retinoblastoma gene (RB1). *Am J Hum Genet*. 1997 Jul; 61(1):60-7). En la leucemia mieloide crónica se sospecha una relación entre la desregulación del gen p53 y una alteración del modelo de metilación con la progresión de la enfermedad (Guinn BA, Mills KI, p53 mutations, methylation and genomic instability in the progression of chronic myeloid leukaemia. *Leuk Lymphoma*. 1997 Jul; 26(3-4):211-26). También para la leucemia mieloide aguda se ha documentado una relación con la metilación (Melki JR, Vincent PC, Clark SJ. Concurrent DNA hypermethylation of multiple genes in acute myeloid leukemia. *Cancer Res*. 1999 Aug 1; 59(15): 3730-40). Se ha identificado un punto de metilación específico del tumor en el gen supresor del tumor de Wilms (Kleymenova EV, Yuan X, LaBate ME, Walker CL, Identification of a tumor-specific methylation site in the Wilms tumor suppressor gene. *Oncogene*. 1998 Feb 12; 16(6):713-20). En el linfoma de Burkitt, varios promotores exhiben una metilación total de CpG (Tao Q, Robertson KD, Manns A, Hildesheim A, Ambinder RF, Epstein-Barr virus (EBV) in endemic Burkitt's lymphoma: molecular analysis of primary tumor tissue. *Blood*. 1998 Feb 15; 91(4):1373-81). Se ha documentado que en el caso del carcinoma de tiroides juega un papel la metilación del DNA (Venkataraman GM, Yatin M, Marcinek R, Ain KB, Restoration of iodide uptake in dedifferentiated thyroid carcinoma: relationship to human Na+/I-symporter gene methylation status. *J Clin Endocrinol Metab*. 1999 Jul; 84(7): 2449-57).

No sólo muchas enfermedades cancerosas están asociadas con la metilación, sino que también están relacionadas con la metilación muchas enfermedades no cancerosas. Así, investigaciones para la artritis inflamatoria apuntan a que esta enfermedad está asociada con una inframetilación del DNA genómico (Kim YI, Logan JW, Mason JB, Roubenoff R, DNA hypomethylation in inflammatory arthritis: reversal with methotrexate. *J Lab Clin Med*. 1996 Aug; 128(2):165-72). Para el síndrome ICF se ha documentado una expresión regulada de la metilación (Kondo T, Bobek MP, Kuick R, Lamb B, Zhu X, Narayan A, Bourc'his D, Viegas-Pequignot E, Ehrlich M, Hanash SM, Whole-genome methylation scan in ICF syndrome: hypomethylation of nonsatellite DNA repeats D4Z4 and NBL2). Se sospecha la implicación de la metilación en el lupus eritematoso sistémico (Vallin H, Perers A, Alm GV, Ronnblom L, Antidouble-stranded DNA antibodies and immunostimulatory plasmid DNA in combination mimic the endogenous IFN-alpha

inducir in systemic lupus erythematosus. *J Immunol.* 1999 Dec1; 163(11):6306-13); y asimismo una relación entre la distrofia muscular de Duchenne y una isla rica en CpG (Banerjee S, Singh PB, Rasberry C, Cattanaach BM, Embryonic inheritance of the chromatin organisation of the imprinted H19 domain in mouse spermatozoa. *Mech Dev.* 2000 Feb; 90(2):217-26; Burmeister M, Lehrach H, Long range restriction map around the Duchenne muscular dystrophy gene. *Nature.* 1986 Dec 11-17; 324(6097):582-5). Un efecto epigenético que está implicado en la infradesmetilación de la proteína precursora del amiloide, y que está relacionado con el desarrollo de la enfermedad, se sospecha en el caso de la enfermedad de Alzheimer (West RL, Lee JM, Maroun LE, Hypomethylation of the amyloid precursor protein gene in the brain of an Alzheimer's disease patient. *J Mol Neurosci.* 1995; 6(2):141-6). También al nivel cromosómico juega un papel importante el estado de metilación. Por ejemplo, en el caso de síndromes de retraso mental que están asociados con la fragilidad del cromosoma X, el grado de la fragilidad cromosómica está determinado por la metilación (de Muniain AL, Cobo AM, Poza JJ, Sáenz A, [Diseases due to instability of DNA]. *Neurologia*, diciembre de 1995; suplemento 10 1:12-9).

Un método relativamente nuevo y utilizado actualmente con gran frecuencia para la investigación de DNA de 5-metilcitosina se basa en la reacción específica de bisulfito con citosina, que se transforma después de hidrólisis alcalina subsiguiente en uracilo, que corresponde en su comportamiento de apareamiento de bases a la timidina. Por el contrario, La 5-metilcitosina no se ve modificada en estas condiciones. De este modo, el DNA original se transforma de tal manera que la metilcitosina, que originalmente no puede diferenciarse de la citosina por su comportamiento de hibridación, puede documentarse ahora por técnicas "normales" de biología molecular como única citosina residual por ejemplo por amplificación e hibridación o secuenciación. Todas estas técnicas dependen del apareamiento de bases, que es muy utilizado ahora. El estado de la técnica, por lo que concierne a la sensibilidad, está definido por un procedimiento, que encierra el DNA a investigar en una matriz de agarosa, impidiéndose de este modo la difusión y renaturalización del DNA (el bisulfito reacciona solamente con DNA monocatenario) y sustituyéndose todos los pasos de precipitación y purificación por diálisis rápida (Olek, A. *et al.*, *Nucl. Acids. Res.* 1996, 24, 5064-5066). Con este método pueden investigarse células individuales, lo cual ilustra el potencial del método. Sin embargo, hasta ahora solamente se investigan regiones individuales de hasta 3000 pares de bases de longitud, no siendo posible una investigación global de células hasta millares de posibles análisis de metilación. Sin embargo, este procedimiento no puede analizar fiablemente fragmentos muy pequeños a partir de cantidades de muestra escasas. Estas se pierden a pesar de la protección contra la difusión a través de la matriz.

Una ojeada acerca de las posibilidades adicionales conocidas para detectar 5-metilcitosinas, puede deducirse del artículo de reseña siguiente: Rein, T., DePamphilis, M.L., Zorbas, H., *Nucleic Acids Res.* 1998, 26, 2255.

La técnica del bisulfito se emplea hasta ahora, salvo unas cuantas excepciones (p.ej. Zechnigk, M. *et al.*, *Eur. J. Hum. Gen.* 1997, 5, 94-98) solamente en investigación. No obstante, se amplifican siempre fragmentos específicos cortos de un gen conocido después de un tratamiento con bisulfito y, o bien se secuencian completamente (Olek A. Walter, J., *Nat. Genet.* 1997, 17, 275-276) o se detectan posiciones individuales de citosina por una "reacción de extensión de iniciadores" (Gonzalzo, M.L. y Jones, P.A., *Nucl. Acids Res.* 1997, 25, 2529-2531, patente WO 9500669) o un corte enzimático (Xiong, Z. y Laird, P.W., *Nucl. Acids Res.* 1997, 25, 2532-2534). Adicionalmente, se ha descrito la detección por hibridación (Olek *et al.*, WO-A-99/28498).

Otras publicaciones que tratan de la aplicación de la técnica del bisulfito a la detección de la metilación en genes individuales, son: Xiong, Z. und Laird, P. W. (1997), *Nucl. Acids Res.* 25, 2532; Gonzalzo, M. L. und Jones, P. A. (1997), *Nucl. Acids Res.* 25, 2529; Grigg, S. und Clark, S. (1994), *Bioassays* 16, 431; Zeschnek, M. *et al.* (1997), *Human Molecular Genetics* 6, 387; Teil, R. *et al.* (1994), *Nucl. Acids Res.* 22, 695; Martin, V. *et al.* (1995), *Gene* 157, 261; WO-A 97/46705, WO-A 95/15373 und WO-A 95/45560.

Una reseña acerca del estado de la técnica en la producción de redes de oligómeros puede tomarse de una edición especial aparecida en enero de 1999 de *Nature Genetics* (*Nature Genetics Supplement*, volumen 21, enero de 1999) y de la bibliografía citada en dicho lugar.

Para la exploración de una red de DNA inmovilizada se han utilizado un gran número de sondas marcadas por fluorescencia. Particularmente apropiada para la marcación por fluorescencia es la incorporación simple de los colorantes Cy3 y Cy5 en el 5'-OH de la sonda respectiva. La detección de la fluorescencia de las sondas hibridadas se realiza por ejemplo por medio de un microscopio confocal. Los colorantes Cy3 y Cy5 están, además de muchos otros, disponibles comercialmente.

La espectrometría de masas por desorción/ionización con láser asistido por matriz (MALDI-TOF) es un desarrollo muy eficiente para el análisis de biomoléculas (Karas, M. y Hillenkamp, F. (1988), *Laser desorption ionization of protein with molecular masses exceeding 10.000 Daltons*, *Anal. Chem.* 60: 2299-2301). Un analito se encapsula en una matriz fotoabsorbente. Mediante un breve pulso de láser, se evapora la matriz y la molécula del analito así desfragmentada se lleva a la fase gaseosa. Mediante choques con moléculas de la matriz se consigue la ionización del analito. Una tensión aplicada acelera los iones en un tubo de vuelo exento de campo. Debido a sus diferentes masas, los iones se aceleran considerablemente de modo diferente. Los iones más pequeños alcanzan el detector antes que los de mayor tamaño.

La espectrometría MALDI-TOF es muy adecuada para el análisis de péptidos y proteínas. El análisis de ácidos nucleicos es algo más difícil (Gut, I.G. und Beck, S. (1995)), *DNA and Matrix Assisted Laser Desorption Ionization*

Mass Spectrometry. Molecular Biology: Current Innovations and Future Trends 1: 147-157.) Para ácidos nucleicos, la sensibilidad es aproximadamente 100 veces peor que para péptidos y disminuye de forma desproporcionada con el tamaño creciente de los fragmentos. Para ácidos nucleicos que tienen una cadena principal con carga negativa múltiple, el proceso de ionización por la matriz es esencialmente ineficiente. En la espectrometría MALDI-TOF, la elección de la matriz juega un papel muy importante. Para la desorción de péptidos se han encontrado varias matrices muy eficientes, que dan como resultado una cristalización muy fina. En el caso del DNA, aunque es cierto que existen actualmente algunas matrices convenientes, sin embargo la diferencia de sensibilidad no disminuye por ello. La diferencia de sensibilidad puede reducirse modificando químicamente el DNA de tal modo que el mismo se vuelva análogo a un péptido. Ácidos nucleicos de tipo fosforotioato, en los cuales los fosfatos normales de la cadena principal están sustituidos por tiofosfatos, pueden transformarse por química de alquilación simple en un DNA con carga neutra (Gut, I. G. und Beck, S. (1995), A procedure for selective DNA alkylation and detection by mass spectrometry. Nucleic Acide Res. 23: 1367-1373). El acoplamiento de un “marcador de carga” a este DNA modificado da como resultado el aumento de la sensibilidad en la misma magnitud que se ha encontrado para los péptidos. Una ventaja adicional de la “marcación de carga” es la mayor estabilidad del análisis frente a impurezas, que dificultan acusadamente la detección de los sustratos no modificados.

El DNA genómico se obtiene por métodos estándar a partir de DNA de células, tejidos u otras muestras de ensayo. Esta metodología estándar se encuentra en referencias tales como Fritsch y Maniatis, compiladores, Molecular Cloning: A Laboratory Manual, 1989.

La presente invención proporciona un procedimiento particularmente eficiente y fiable, que permite investigar simultáneamente muchas bases de citosina en una muestra de DNA dada en presencia de un grupo metilo en la posición 5 por hibridación. A este fin, se proporcionan adicionalmente oligonucleótidos y oligómeros PNA, que son particularmente apropiados para la utilización del procedimiento para diagnóstico de enfermedades existentes y de la predisposición para enfermedades por análisis de una serie de parámetros genéticos y/o epigenéticos.

Particularmente pueden designarse como mutaciones inserciones, deleciones, mutaciones puntuales, inversiones y polimorfismos, y de modo particularmente preferido SNPs (Single Nucleotide Polymorphisms). No obstante, los polimorfismos pueden ser también inserciones, deleciones o inversiones.

Parámetros epigenéticos en el contexto de esta invención son particularmente metilaciones de citosina y secuencias adicionalmente necesarias para su regulación. Otros parámetros epigenéticos son por ejemplo la acetilación de histonas, que si bien no puede analizarse directamente con el procedimiento descrito, está correlacionada a su vez con la metilación del DNA.

El presente procedimiento sirve para la detección del grado de metilación de al menos una citosina determinada en el contexto secuencial 5'-CpG-3' de una muestra de DNA genómico. De modo particularmente preferido, el procedimiento se utiliza para la detección simultánea de muchas posiciones de metilación diferentes.

El objetivo se resuelve de acuerdo con la invención por un procedimiento para la detección del grado de metilación de una citosina determinada en el contexto secuencial 5'-CpG-3' de una muestra de DNA genómico, que se caracteriza porque

- a) se trata el DNA genómico, transformándose las bases citosina en uracilo, pero no las bases 5-metilcitosina;
- b) se amplifican fragmentos definidos, que contienen dicha citosina determinada, conservando los amplificados una marcación detectable;
- c) se hibridan los amplificados en dos clases de oligonucleótidos y/u oligómeros PNA en cada caso con un miembro de dicha citosina determinada;
- d) se determina la magnitud de la hibridación de los amplificados en las dos clases de oligonucleótidos por detección de la marcación de los amplificados;
- e) se deduce de la relación de las marcaciones detectadas en las dos clases de oligonucleótidos como consecuencia de la hibridación el grado de metilación de dicha citosina determinada en la muestra de DNA genómico.

En este contexto es particularmente preferido un procedimiento en el cual en el paso c) se realiza una hibridación de los amplificados en dos clases de oligómeros (oligonucleótidos y/u oligómeros PNA) en cada caso con un miembro de dicha citosina determinada, donde los oligómeros de la primera clase se hibridan preferiblemente a la secuencia que resulta del tratamiento químico del DNA genómico, si dicha citosina determinada en el DNA genómico se encontrara metilada, y donde los oligómeros de la segunda clase se hibridan preferiblemente a la secuencia que resulta del tratamiento químico del DNA genómico si dicha citosina determinada en el DNA genómico se encontrara no metilada. Una de estas dos clases de oligómeros podría estar formada por ejemplo por oligonucleótidos que contienen en su punto medio una estructura CG, y la otra clase por oligonucleótidos que contienen en su punto medio una estructura CA (o una estructura CA, en la cadena opuesta). Las partes restantes de las secuencias de oligómeros deberían ser preferiblemente compatibles entre ambas clases. En este caso los oligonucleótidos de la primera clase se hibridarían

a la secuencia (en torno a la citosina determinada a investigar), que se encontraría en el caso metilado después de transformación con bisulfito, y por el contrario, los de la segunda clase se hibridarían a la secuencia que se encontraría en el caso no metilado después de transformación con bisulfito.

5 Se prefiere también particularmente un procedimiento en el cual en el paso c) se realiza una hibridación de los
amplificados en dos clases de oligómeros (oligonucleótidos y/u oligómeros PNA) con al menos un miembro en cada
caso, donde los oligómeros de la primera clase se hibridan preferiblemente a la secuencia que resulta del tratamiento
químico del DNA genómico, si dicha citosina determinada en el DNA genómico se encontrara metilada y menos
preferiblemente a la secuencia que resulta del tratamiento químico del DNA genómico, si dicha citosina determinada
10 en el DNA genómico se encontrara no metilada, y donde los oligómeros de la segunda clase se hibridan al amplificado
a investigar de modo esencialmente independiente del grado de metilación de dicha citosina determinada en el DNA
genómico.

De acuerdo con ello, se prefiere también un procedimiento, en el cual en el paso c) se realiza una hibridación de los
15 amplificados en dos clases de oligómeros (oligonucleótidos y/u oligómeros PNA) en cada caso con un miembro para
dicha citosina determinada, donde los oligómeros de la primera clase se hibridan preferiblemente a la secuencia que
resulta del tratamiento químico del DNA genómico, si dicha citosina determinada en el DNA genómico se encontrara
no metilada y menos preferiblemente a la secuencia que resulta del tratamiento químico del DNA genómico, si dicha
citosina determinada en el DNA genómico se encontrara metilada, y donde los oligómeros de la segunda clase se
20 hibridan al amplificado a investigar de modo esencialmente independiente del grado de metilación de dicha citosina
determinada en el DNA genómico.

En estos casos se hibrida por tanto la segunda clase de oligómeros al amplificado, sin que se produzca una espe-
cificidad de metilación esencial, y por tanto preferiblemente en una posición del amplificado que no corresponde a
25 ninguna posición metilable de citosina. Con ello, la concentración del amplificado se determina finalmente sólo por la
intensidad de la hibridación. En relación con ello, la hibridación en la primera clase de oligonucleótidos tiene lugar
dependiendo del grado de metilación de la citosina determinada a investigar.

Se prefiere que el procedimiento se realice no sólo con la muestra de DNA genómico, sino también análoga-
30 mente con DNA estándar presente como es bien sabido en la posición de dicha citosina determinada metilado o
no metilado, donde las relaciones medidas en cada caso con el DNA estándar no metilado de las marcaciones de-
tectadas en ambas clases de oligonucleótidos sirven como valor de contraste para un grado de metilación de 0
y, correspondientemente, las relaciones medidas en cada caso con el DNA estándar metilado de las marcaciones
detectadas en ambas clases de oligonucleótidos sirven como valor de contraste para un grado de metilación de
35 1, y estos valores de contraste se emplean para la determinación del grado de metilación del DNA genómico de
muestra.

Se prefiere particularmente que muestras de DNA estándar conocidas adicionales se empleen para el contraste, que
exhiben en cada caso un grado de metilación conocido cualquiera de dicha citosina determinada.

40 Las muestras de DNA estándar empleadas y la muestra (el amplificado producido a partir de un DNA genómico)
se marcan preferiblemente de manera diferente en cada caso. Las muestras de DNA estándar empleadas se marcan a
su vez en cada caso preferiblemente de manera diferente.

45 Se prefiere también particularmente un procedimiento en el cual amplificados, que resultan de muestras de DNA
genómico diferentes, están provistos de marcaciones diferentes. En este caso es posible medir simultáneamente con
una serie de oligonucleótidos de las dos clases diferentes muestras, sea por ejemplo en una red de oligómeros, que
contiene oligonucleótidos de las dos clases.

50 Es también particularmente preferido un procedimiento en el cual amplificados, que resultan de las mismas mues-
tras de DNA genómico, se proveen de marcaciones diferentes, a fin de alcanzar por una determinación del valor medio
de los valores obtenidos por diversos procedimientos de detección un aumento de la exactitud de la medida. Esto puede
realizarse por ejemplo por marcaciones con colorantes de fluorescencia diferentes. La medida se realiza en este caso
por medio de un escáner de fluorescencia, que dispone de varios canales para la medida de las longitudes de onda de
55 emisión individuales de los colorantes de fluorescencia.

Por consiguiente es también particularmente preferido un procedimiento en el cual las marcaciones son marcacio-
nes de fluorescencia.

60 Adicionalmente, se prefiere de acuerdo con la invención que dicha marcación sea una marcación de fluorescencia.
En este contexto se prefiere que dicha marcación se detecte por quimioluminiscencia, su absorción UV o polarización
de fluorescencia.

Es muy particularmente preferido de acuerdo con la invención que el tratamiento del DNA en el paso a) se realice
65 con una solución de un bisulfito (= hidrogenosulfito, disulfito).

Se prefiere también que las marcaciones sean radionucleidos.

Adicionalmente se prefiere que las marcaciones sean marcaciones separables, que se detecten en un espectrómetro de masas.

De acuerdo con la invención, es particularmente preferido que los productos PCR en su totalidad o sus fragmentos característicos se detecten en el espectrómetro de masas y se caractericen por consiguiente inequívocamente por su masa.

De acuerdo con la invención es particularmente preferible que los oligómeros (oligonucleótidos y/u oligómeros PNA) comprendan una sola clase de la secuencia 5'-CG-3'.

De acuerdo con la invención, se prefiere particularmente que los oligómeros (oligonucleótidos y/u oligómeros PNA) comprendan una sola clase de la secuencia 5'-TG-3' y/o la secuencia 5'-CA-3'.

Es además también adicionalmente preferido, que los oligonucleótidos de la primera clase comprendan la secuencia 5'-CG-3' y los oligonucleótidos de las segundas clases comprendan la secuencia 5'-TG-3' y/o la secuencia 5'-CA-3'.

Se prefiere también que los oligonucleótidos de la clase primera y segunda estén inmovilizados en una fase sólida común. Asimismo, se prefiere en este contexto que los oligonucleótidos estén dispuestos en una sola fase sólida plana en una trama rectangular o hexagonal, y el sitio de determinados oligonucleótidos en la fase sólida esté correlacionado con su secuencia respectiva.

Es asimismo particularmente preferido que los oligómeros de la primera y la segunda clase estén inmovilizados sobre perlas, que están codificadas con una serie de marcaciones detectables por separado. Las últimas sirven para la identificación de las perlas, es decir de las secuencias fijadas a la perla respectiva. Los amplificados unidos a las perlas se identifican luego por medio de otras marcaciones, que se fijan a los amplificados. Instrumentos para la realización de tales medidas basadas sobre perlas son vendidos por ejemplo por la firma Luminex.

Muy particularmente, se prefiere un procedimiento correspondiente a la invención, en el cual el paso b) se realiza en dos pasos parciales como sigue:

- a) una preamplificación por PCR con al menos un par de iniciadores de secuencia diferente, que se hibridan inespecíficamente a una muestra de DNA pretratada según la reivindicación 1 y dan por tanto en el paso PCR más de un amplificado;
- b) una amplificación por PCR del producto formado en la preamplificación con iniciadores de secuencia diferente, que son respectivamente idénticos o inversamente complementarios a una sección de la muestra de DNA pretratada según la reivindicación 1 [cadena (+) o cadena (-)] y se hibridan específicamente al DNA a amplificar.

Bajo hibridación, en el contexto de esta invención se entiende una hibridación de dos cadenas de DNA de acuerdo con las reglas de Watson-Crick totalmente complementarias de modo inverso una a otra, sin que se produzca un apareamiento de bases erróneo. En este contexto el uracilo se considera como timina.

De acuerdo con la invención, se prefiere adicionalmente que la amplificación de varias secciones de DNA se realice en un solo recipiente de reacción.

Adicionalmente, se prefiere de acuerdo con la invención que para la amplificación se utilice una DNA-polimerasa térmicamente estable. Se prefiere también particularmente, que los oligonucleótidos iniciadores utilizados para la amplificación contengan o bien solamente las bases T, A y C o las bases T, A y G.

Es preferible también que se analicen al menos 10 posiciones CpG en contexto secuencial diferente al mismo tiempo. Particularmente, se prefiere que se analicen simultáneamente al menos 50 posiciones CpG en contexto secuencial diferente. Muy particularmente, se prefiere que se analicen simultáneamente al menos 100 posiciones CpG en contexto secuencial diferente. Es muy preferido que se analicen simultáneamente al menos 500 posiciones CpG en contexto secuencial diferente. Lo más preferible es que se analicen simultáneamente al menos 1000 posiciones CpG en contexto secuencial diferente.

De acuerdo con la invención, se prefiere el procedimiento en el cual la muestra de DNA genómico se ha obtenido a partir de líneas de células, sangre, esputo, heces, orina, líquido cefalorraquídeo, tejido encapsulado en parafina, por ejemplo tejido de los ojos, el intestino, los riñones, el cerebro, el corazón, la próstata, el pulmón, la mama o el hígado, portaobjetos histológicos o todas las combinaciones posibles de los mismos.

Se prefiere la utilización de un procedimiento correspondiente a la invención para el diagnóstico y/o pronóstico de episodios perniciosos para pacientes o individuos, en el cual estos episodios perniciosos pertenecen al menos a una de las categorías siguientes: reacciones indeseables de medicamentos; enfermedades cancerosas; disfunciones, deterioro o enfermedad del CNS; síntomas de agresión o trastornos del comportamiento; consecuencias clínicas y psicológicas de daños cerebrales; alteraciones psicóticas y trastornos de la personalidad; demencia y/o síndromes asociados; enfermedad, disfunción y deterioro cardiovascular; disfunción, deterioro o enfermedad del tracto gastrointestinal; dis-

función, deterioro o enfermedad del sistema respiratorio; lesión, inflamación, infección, inmunidad y/o convalecencia; disfunción, deterioro o enfermedad del cuerpo como anomalía en el proceso de desarrollo, disfunción, deterioro o enfermedad de la piel, los músculos, el tejido conjuntivo o los huesos; disfunción, deterioro o enfermedad endocrina y metabólica; dolores de cabeza o disfunción sexual.

Adicionalmente, se prefiere la utilización de un procedimiento correspondiente a la invención para la diferenciación de tipos de células o tejidos o para la investigación de la diferenciación celular.

Objeto de la presente invención es un kit, que comprende un reactivo que contiene bisulfito, oligonucleótidos iniciadores para la producción de los amplificados y/o preferiblemente oligonucleótidos inmovilizados en una fase sólida así como instrucciones para la realización del procedimiento correspondiente a la invención.

Esta muestra de DNA genómico se obtiene preferiblemente a partir de líneas de células, sangre, esputo, heces, orina, líquido cefalorraquídeo, tejido encapsulado en parafina, por ejemplo tejido de los ojos, el intestino, los riñones, el cerebro, el corazón, la próstata, el pulmón, la mama o el hígado, portaobjetos histológicos, o todas las combinaciones posibles de los mismos.

En este procedimiento, se trata en el primer paso una muestra de DNA genómico de tal manera que, a excepción de las bases de 5-metilcitosina, todas las bases de citosina se transforman en uracilo. Este tratamiento químico se realiza preferiblemente con la solución de un bisulfito (= hidrogenosulfito, disulfito).

Este paso del procedimiento puede realizarse no sólo con la muestra de DNA genómico, sino análogamente de modo preferible también con, como es sabido, DNA estándar existente metilado o no metilado en la posición de dicha citosina determinada.

En el segundo paso del procedimiento, se amplifican las partes del DNA genómico, que contienen dicha citosina determinada. Este paso puede realizarse de modo particularmente preferido en dos pasos parciales:

1. En primer lugar se realiza una preamplificación por PCR con al menos un par de iniciadores de secuencia diferente, que se hibridan a un DNA pretratado químicamente. Este pretratamiento se realiza químicamente de tal manera que las bases citosina se transforman en uracilo, pero no las bases 5-metilcitosina.
2. Se realiza una amplificación por PCR del producto formado en la preamplificación, con iniciadores de secuencia diferente. Estos iniciadores son complementariamente idénticos o inversos a una sección del DNA pretratado químicamente [cadena (+) o cadena (-)] y se hibridan específicamente al DNA a amplificar. Los amplificados contienen preferiblemente un marcador detectable.

En el tercer paso siguiente del procedimiento se realiza una hibridación de los amplificados a preferiblemente dos clases de oligonucleótidos en cada caso con un miembro. En una variante particularmente preferida del procedimiento, los oligonucleótidos de la primera clase comprenden la secuencia 5-CG-3' y los oligonucleótidos de la segunda clase la secuencia 5'-TG-3' y/o la secuencia 5'-CA-3'. Los oligonucleótidos de la primera y la segunda clase están preferiblemente inmovilizados sobre una fase sólida común. Los oligonucleótidos están dispuestos sobre una fase sólida plana en una trama rectangular o hexagonal, y el sitio de los oligonucleótidos determinados está correlacionado en la fase sólida con la secuencia respectiva.

Los oligonucleótidos de la primera clase se hibridan preferiblemente a la secuencia que resulta del tratamiento químico del DNA genómico, si dicha citosina determinada se encontrara metilada en el DNA genómico. Los oligonucleótidos de la segunda clase se hibridan preferiblemente a la secuencia que resulta del tratamiento químico del DNA genómico, si dicha citosina determinada se encontrara no metilada en el DNA genómico.

La amplificación de varias secciones de DNA se realiza preferiblemente en un solo recipiente de reacción. Preferiblemente, la amplificación se conduce con la reacción en cadena de la polimerasa (PCR) utilizándose preferiblemente una DNA-polimerasa térmicamente estable.

Los oligonucleótidos iniciadores utilizados para la amplificación contienen preferible o solamente las bases T, A y C o las bases T, A y G.

En el cuarto paso del procedimiento, se determina la magnitud de hibridación de los amplificados a las dos clases de oligonucleótidos por la detección de las marcaciones de los amplificados. Las marcaciones son de modo particularmente preferible marcaciones fluorescentes, radionucleidos o marcaciones máscicos separables, que se detectan en un espectrómetro de masas. Las marcaciones se detectan preferiblemente asimismo por quimioluminiscencia, absorción UV o polarización de fluorescencia. Los productos PCR pueden detectarse también preferiblemente en su totalidad o como sus fragmentos característicos en el espectrómetro de masas. De este modo, los productos PCR se caracterizan inequívocamente por su masa.

En el último paso del procedimiento, se deduce de la relación de las marcaciones detectadas como consecuencia de la hibridación, a las dos clases de oligonucleótidos el grado de metilación de dicha citosina determinada en la muestra de DNA genómico.

ES 2 299 520 T3

Las relaciones medidas en cada caso con el DNA estándar no metilado de las marcaciones detectadas en ambas clases de oligonucleótidos sirven preferiblemente como valor de contraste para un grado de metilación de 0.

Correspondientemente, las relaciones medidas en cada caso con el DNA estándar metilado de las marcaciones detectadas en las dos clases de oligonucleótidos sirven preferiblemente como valor de contraste para un grado de metilación de 1. Estos valores de contraste se emplean de modo particularmente preferible para la determinación del grado de metilación de las muestras del DNA genómico.

Para la calibración, pueden utilizarse preferiblemente también otras muestras conocidas de DNA estándar, que exhiben en cada caso un grado de metilación discrecional conocido de dicha citosina determinada.

El procedimiento se caracteriza porque de modo preferible se analizan simultáneamente al menos 10 posiciones CpG en contexto secuencial diferente. Por otra parte, pueden analizarse simultáneamente de modo preferible al menos 50 posiciones CpG en contexto secuencial diferente. Se prefiere además, que se realicen simultáneamente al menos 100 posiciones CpG en contexto secuencial diferente. Es muy preferible el análisis simultáneo de al menos 500 posiciones CpG en contexto secuencial diferente. Por último, es particularmente preferido, el análisis simultáneo de al menos 1000 posiciones CpG en contexto secuencial diferente.

El procedimiento descrito se utiliza preferiblemente para el diagnóstico y/o el pronóstico de episodios perniciosos para pacientes o individuos, en donde estos episodios perniciosos pertenecen al menos a una de las categorías siguientes: reacciones indeseables de medicamentos; enfermedades cancerosas; disfunciones, deterioro o enfermedad del CNS; síntomas de agresión o alteraciones del comportamiento; consecuencias clínicas, psicológicas y sociales de daños cerebrales; alteraciones psicóticas y trastornos de la personalidad; demencia y/o síndromes asociados; enfermedad, disfunción y deterioro cardiovascular; disfunción, deterioro o enfermedad del tracto gastrointestinal; disfunción, deterioro o enfermedad del sistema respiratorio; lesión, inflamación, infección, inmunidad y/o convalecencia; disfunción, deterioro o enfermedad del cuerpo como anomalía en el proceso de desarrollo; disfunción, deterioro o enfermedad de la piel, los músculos, el tejido conjuntivo o los huesos; disfunción, deterioro o enfermedad endocrina y metabólica; dolores de cabeza o disfunción sexual.

El presente procedimiento se utiliza de modo particularmente preferible para la diferenciación de tipos de células o tejidos o para la investigación de la diferenciación celular.

Por determinación de las relaciones de hibridación entre las dos clases de oligonucleótidos empleadas (p.ej. que contienen CG/TG) se consigue la independencia de la intensidad de la hibridación total de las muestras de tejido desconocidas.

Para la calibración de muestras de tejidos desconocidas se emplean como estándares muestras comparativas no metiladas y totalmente metiladas.

Componente de este procedimiento es adicionalmente un kit, que comprende un reactivo que contiene bisulfito, oligonucleótidos iniciadores para la producción de los amplificadores y/o preferiblemente oligonucleótidos inmunizados en una fase sólida. Los oligonucleótidos (primera clase) comprenden la secuencia 5'-CG-3'. Los oligonucleótidos (segunda clase) comprenden la secuencia 5'-TG-3' y/o la secuencia 5'-CA-3'. Forman parte también del kit instrucciones para la realización del procedimiento.

Los oligómeros pueden contener al menos un dinucleótido CpG. La citosina del dinucleótido CpG correspondiente se encuentra aproximadamente en el tercio medio del oligómero.

Los oligómeros pueden producirse sobre un material portador en una disposición fija, donde al menos un oligómero está acoplado a una fase sólida. Procedimientos para la fijación de sondas de oligómeros en fases sólidas son conocidos por los expertos.

Es posible que todas las sondas de oligómeros tengan la misma longitud. De modo particularmente preferible, todas las sondas son además 18-meros, que contienen en su punto medio un dinucleótido CG y que se hibridan a una de las Seq. ID 1 a Seq. ID 40712 sin apareamientos de bases erróneos.

Los oligómeros pueden utilizarse para el diagnóstico de reacciones indeseables de medicamentos, enfermedades cancerosas, disfunciones, deterioro o enfermedades del CNS, síntomas agresivos o alteraciones del comportamiento, consecuencias clínicas y psicológicas de lesiones cerebrales, alteraciones psicóticas y trastornos de la personalidad, demencia y/o síndromes asociados, enfermedad, cardiovascular, disfunción, deterioro o afección del tracto gastrointestinal, disfunción, deterioro o afección del sistema respiratorio, lesión, inflamación, infección, inmunidad y/o convalecencia, deterioro o afección del cuerpo como anomalía en el proceso del desarrollo, disfunción, deterioro o afección de la piel, de los músculos, del tejido conjuntivo o de los huesos, disfunción, deterioro o afección endocrina y metabólica, dolores de cabeza y disfunciones sexuales por análisis de patrones de metilación.

Los expertos comprenderán que los oligómeros en el caso de un cambio de timina por uracilo en las secuencias utilizadas cumplen la misma finalidad.

El DNA genómico a analizar se obtiene preferiblemente a partir de las fuentes habituales de DNA, como p.ej. línea de células, sangre, esputo, heces, orina, líquido cefalorraquídeo, tejidos encapsulados en parafina, por ejemplo tejido de los ojos, el intestino, los riñones, el cerebro, el corazón, la próstata, el pulmón, la mama o hígado, portaobjetos histológicos y todas sus posibles combinaciones.

Los ejemplos siguientes ilustran la invención.

Ejemplo 1

Preparación de DNA no metilado y totalmente metilado, y tratamiento con bisulfito

Para la preparación de DNA totalmente metilado se trató DNA genómico humano con S-adenosilmetion [sic] y la CpG-metilasa (SssI, New England Biolabs.) de acuerdo con las indicaciones del fabricante. Para la preparación de DNA no metilado, se amplificó por PCR el fragmento de gen ELK-1 (número de acceso ep59011) con el iniciador [SEQ ID NO: 1] GCTCTATGGTCTTGTCTAACCGTA Y [SEQ ID No: 2] AGGTGGTGGTGGCGGTGG procedente de DNA genómico humano. El DNA no metilado y totalmente metilado así producido, al igual que DNA genómico humano, se trató con empleo de bisulfito (hidrogenosulfito, disulfito) de tal manera que todas las citosinas no metiladas en la posición 5 de la base se modifican de tal modo que se forma una base diferente en lo que respecta al comportamiento de apareamiento de bases, mientras que las citosinas metiladas en la posición 5 quedaban inalteradas. Si se emplea para la reacción bisulfito en el intervalo de concentraciones comprendido entre 0,1 M y 6 M, entonces se produce una adición en las bases de citosina no metiladas. Adicionalmente, debe estar presente un reactivo desnaturalizador o disolvente, así como un eliminador de radicales libres. Una hidrólisis alcalina subsiguiente conduce en tal caso a la transformación de las nucleobases de citosina no metiladas en uracilo. Este DNA transformado sirve para detectar las citosinas metiladas.

Ejemplo 2

Preparación de las sondas de gen marcadas con Cy5

Partiendo de las muestras de DNA tratadas con bisulfito, se amplifica en cada caso un fragmento decidido de 529 pb de longitud a partir de la región promotora del gen ELK-1 (número de acceso ep59011). La amplificación se realiza con los oligonucleótidos iniciadores [SEQ ID NO: 3] ATGGTTTTGTTTAATYGTAGAGTTGTTT y [SEQ ID No: 4] TAAACCCRAAAAAAAAAAACCCAATAT. Por utilización de oligonucleótidos iniciadores, que están marcados con el colorante fluorescente Cy5, se marca el fragmento directamente durante la PCR. Como DNA matriz se utiliza DNA tratado con bisulfito (hidrogenosulfito, disulfito) (1) no metilado, (2) totalmente metilado y (3) DNA genómico humano. A continuación, se investigan estos tres fragmentos diferentes de DNA en hibridaciones separadas respecto a su grado de metilación en una posición CpG específica.

Ejemplo 3

Realización de la hibridación y evaluación de un "chip" de DNA hibridado

Las sondas de gen preparadas en el Ejemplo 2, se hibridan a un chip de DNA. En el chip están inmovilizados previamente oligonucleótidos. Las secuencias de oligonucleótidos se derivan del fragmento amplificado del gen ELK-1 mencionado en el Ejemplo 2, y representan los dinucleótidos CG, que incluyen el entorno inmediato. La longitud de los oligonucleótidos es 14-22 nucleótidos, y la posición del dinucleótido CG dentro de los oligonucleótidos es variable. Después de la hibridación, se escanea el chip de DNA (véase Fig. 1) y se evalúa numéricamente la señal de hibridación (datos no presentados). El resultado de la hibridación para los oligonucleótidos [SEQ ID NO: 5] CTACTCAACGAAAACAAA und [SEQ ID No: 6] CTACTCAACAAAAAC-AAA se muestra en Fig. 1 y Fig. 2. En este caso se hibrida preferiblemente [SEQ ID NO: 5] CTACTCAACGAAAACAAA, si la citosina del fragmento ELK-1, que se encuentra en la posición 103 del amplificado, está metilada, y [SEQ ID NO: 6] CTACTCAACAAAAACAAA si esta citosina no está metilada.

En la Figura 1 se representa un chip de DNA después de hibridación con el fragmento ELK-1. Se representa la imagen falsamente coloreada, tal como se obtiene después del escaneo. Frente a la imagen en blanco y negro aquí representada, se obtiene del escáner una imagen en color. La intensidad de los diferentes colores representa el grado de hibridación, disminuyendo el grado de hibridación desde rojo (reconocible en la Figura 1 como puntos brillantes) a azul (reconocible en la Figura 1 como puntos oscuros).

La Figura 2A representa una imagen parcial de la Figura 1. Para el esclarecimiento del esquema de hibridación, los pares de oligonucleótidos punteados están contorneados de blanco: [SEQ ID NO: 6] ctactcaacaaaacaaa (izquierda) y [SEQ ID NO: 5] ctactcaacgaaaacaaa (derecha).

La imagen parcial de la Figura 2B muestra el modelo de punteado para un estado de metilación desconocido de la muestra de tejido y la imagen parcial Figura 2C el estado de metilación para la muestra de comparación totalmente metilada.

TABLA 1

5		Muestra A (no metilada)		Muestra B (desconocida)		Muestra C (totalmente metilada)	
	Secuencia del oligó- mero de detección	Fluorescencia (recuentos)	Valor medio	Fluorescencia (recuentos)	Valor medio	Fluorescencia (recuentos)	Valor medio
10	ctactcaacgaaaacaaa [SEQ ID No: 5]	3352		6102		6002	
15	ctactcaacgaaaacaaa [SEQ ID No: 5]	2950		6775		7898	
	ctactcaacgeaaaacaaa [SEQ ID No: 5]	4196		6360		7485	
20	ctactcaacgaaaacaaa [SEQ ID No: 5]	5181		5521		11401	
			3920		6190		8197
25	ctactcaacaaaaacaaa [SEQ ID No: 6]	20577		7074		7290	
	ctactcaacaaaaacaaa [SEQ ID No: 6]	19709		9171		9985	
30	ctactcaacaaaaacaaa [SEQ ID No: 6]	24130		7603		9286	
35	ctactcaacaaaaacaaa [SEQ ID No: 6]	21601		9434		12435	
			21504		8321		9749
40	CG/CA		0,28		0,74		0,84

El valor medio se indica en cada caso para una longitud de onda de 635 nm. En la columna A se dan los valores para la muestra no metilada, en la columna B para un estado de metilación desconocido de una muestra de tejido, y en la columna C los valores para la muestra de comparación totalmente metilada. Las relaciones CG/CA representan el estado de metilación de la muestra respectiva. El valor de 0,74 indica que la muestra se encuentra esencialmente en forma totalmente metilada.

Ejemplo 4

El ejemplo siguiente se refiere a un fragmento del gen hMLH1 asociado al cáncer colorrectal hereditario y distinto de poliposis, en el cual se investiga una determinada posición CG respecto a la metilación.

En el primer paso se trata una secuencia genómica con utilización de bisulfito (hidrogenosulfito, disulfito) de tal manera que todas las citosinas no metiladas en la posición 5 de la base se alteran de tal manera que se forma una base diferente con respecto al comportamiento de apareamiento de bases, mientras que las citosinas metiladas en la posición 5 quedan inalteradas. Si se utiliza para la reacción bisulfito en el campo de concentraciones comprendido entre 0,1 M y 6 M, entonces tiene lugar una adición a las bases de citosina no metiladas. Adicionalmente, tiene que estar presente un reactivo desnaturalizante o disolvente y un eliminador de radicales libres. Una hidrólisis alcalina subsiguiente conduce luego a la transformación de las nucleobases de citosina no metiladas en uracilo. Este DNA transformado sirve para detectar las citosinas metiladas. En el segundo paso del procedimiento, se diluye la muestra de DNA tratada con agua o con un disolvente acuoso. Preferiblemente se realiza a continuación una desulfonación del DNA (10-30 min, 90-100°C) a un valor de pH alcalino. En el tercer paso del procedimiento se amplifica la muestra de DNA en una relación de cadena de polimerasa, preferiblemente con una DNA-polimerasa térmicamente estable. En el ejemplo presente se investigan citosinas del gen hMLH1, en este caso a partir de una región flanqueante 5' de tamaño 1551 pb. A este

fin se amplifica con los oligonucleótidos iniciadores específicos [SEQ ID NO: 7] AGCAACACCTCCATGCACTG y [SEQ ID No: 8] TTGATTGGACAGCTTGAATGC un fragmento definido de 719 pb de longitud. Este amplificado sirve como muestra, que se hibrida a un oligonucleótido unido previamente a una fase sólida con formación de una estructura dúplex, por ejemplo [SEQ ID No: 3] GAAGAGCGGACAG, donde la citosina a detectar se encuentra en la posición 588 del amplificado. La detección del producto de hibridación se basa en los oligonucleótidos iniciadores marcados fluorescentemente Cy3 y Cy5, que se han utilizado para la amplificación. Solamente cuando en el DNA tratado con bisulfito se ha cargado inicialmente en este punto una citosina metilada, se produce una reacción de hibridación del DNA amplificado con el oligonucleótido. Por consiguiente, el estado de metilación de la citosina respectiva a investigar decide acerca del producto de hibridación.

Ejemplo 5

Preparación de DNA modificado con bisulfito mediante perlas de agarosa

En el presente experimento se amplifica, a partir de DNA tratado con bisulfito, un fragmento definido de 529 pb de longitud a partir de la región promotora del gen ELK-1 (número de acceso ep59011). Por utilización de los oligonucleótidos iniciadores [SEQ ID NO: 3] ATGGTTTTGTTTAATYGTAGAGTTGTTT y [SEQ ID No: 4] TAAACCCRAAAAAAAAAAACCAATAT, que están marcados con el colorante fluorescente ALEXA 488, se marca el fragmento directamente durante la PCR. Los oligonucleótidos de la primera clase (en este caso por ejemplo [SEQ ID NO: 10] ATTAATAGCGTTTTGGTT) y la segunda clase (en este caso: por ejemplo [SEQ ID NO: 11] ATTAATAGTGTGTTTTGGTT) se inmovilizan en las superficies de las perlas, que se diferencian por una codificación de color individual. En un paso subsiguiente, se ponen en contacto los amplificados producidos con los oligonucleótidos iniciadores arriba mencionados del gen ELK-1, con una mezcla de ambas clases de las perlas donde los amplificados se hibridan contra los oligonucleótidos inmovilizados, en este caso por ejemplo [SEQ ID No: 10] ATTAATAGCGTTTTGGTT y [SEQ ID No: 11] ATTAATAGTGTGTTTTGGTT, encontrándose el C o T a detectar en todos los casos en la posición 476 del amplificado. A continuación se aíslan las perlas, se identifican luego por medida de fluorescencia con ayuda de su codificación de color y por medida de las intensidades de fluorescencia, que son específicas para el colorante fluorescente ALEXA 488, se determina el grado de hibridación.

Ejemplo 6

Utilización de colorantes múltiples para calibración interna

A partir de DNA tratado con bisulfito, se amplifica un fragmento definido de 529 pb de longitud de la región promotora del gen ELK-1. Por utilización de oligonucleótidos iniciadores marcaciones de fluorescencia [SEQ ID NO: 3] ATGGTTTTGTTTAATYGTAGAGTTGTTT y [SEQ ID NO: 4] TAAACCCRAAAAAAAAAAACCAATAT, se marca el fragmento directamente durante la PCR. Para la reacción PCR, que se realiza en un termociclador (Eppendorf GmbH), se emplean 10 ng de DNA tratado con bisulfito, 6 pmol de cada iniciador, 200 μ m de cada dNTP, $MgCl_2$ 1,5 mM y 1 U de HotstartTaq (Qiagen AG). Las restantes condiciones se seleccionan de acuerdo con las indicaciones del fabricante. Para la amplificación se realiza una desnaturalización durante 14 min a 96°C, efectuándose a continuación 39 ciclos con las condiciones de 60 s a 96°C, 45 s a 55°C y 75 s a 72°C. Por último, se realiza una elongación durante 10 min a 72°C. En el caso presente, las muestras a investigar, en este caso tejido de personas sanas y enfermas, se marcan con el colorante Cy2. Para la calibración interna del estado de metilación se utilizan oligonucleótidos iniciadores para la amplificación de las muestras para la calibración, que están marcadas con los colorantes fluorescentes Cy3 y Cy5. Los amplificados procedentes de las muestras para la calibración representan un estado de metilación conocido, por una parte, un estado de metilación 100% y por otra un estado no metilado. Dado que en este procedimiento las relaciones de las intensidades de color de los colorantes fluorescentes, que se miden con utilización del equipo ScanArray 4000 XL, Packard BioScience-BioChip Technologies, se calculan entre dos clases de oligonucleótidos, en este caso por ejemplo [SEQ ID NO: 10] ATTAATAGCGTTTTGGTT y [SEQ ID NO: 11] TTAATAGTGTGTTTTGGTT, donde el C o T a detectar se encuentra en todos los casos en la posición 476 del amplificado, puede determinarse la relación de estado metilado a no metilado de muestras desconocidas.

Ejemplo 7

Utilización de colorantes múltiples para aumento de los caudales volumétricos de muestra y el aumento de la complejidad del análisis

El presente experimento sirve para analizar diversas muestras en solo paso de hibridación y aumentar con ello el caudal volumétrico de muestras. Para ello se amplifica un fragmento definido de cuatro individuos en cada caso a partir de la región promotora del gen ELK-1 sendos fragmentos definidos de 529 pb de longitud a partir de DNA tratado con bisulfito, con los oligonucleótidos iniciadores [SEQ ID NO: 3] ATGGTTTTGTTTAATYGTAGAGTTGTTT y [SEQ ID NO: 4] TAAACCCRAAAAAAAAAAACCAATAT. Estos fragmentos procedentes de los cuatro individuos se marcan con los cuatro colorantes fluorescentes diferentes Cy3, Cy5, Cy2 y Cy7 y se hibridan frente a oligonucleótidos inmovilizados, en este caso por ejemplo [SEQ ID NO: 10] ATTAATAGCGTTTTGGTT y [SEQ ID NO: 11] ATTAATAGTGTGTTTTGGTT, donde el C o T a detectar se encuentra en todos los casos en la posición 476 del amplificado.

ES 2 299 520 T3

Estas muestras diferentes marcadas fluorescentemente se analizan a continuación a longitudes de onda diferentes, sin que se produzca una influencia recíproca basada en un colorante fluorescente.

Inversamente, es también posible, a partir de una muestra de DNA producir distintas series diferentes de fragmentos, que se marcan con colorantes diferentes, en este caso Cy2, Cy3 y Cy5. Si se inmoviliza una serie de sondas de oligonucleótidos para el gen 64 (serie 1) en un chip, entonces la especificidad es suficiente para analizar 64 fragmentos marcados p.ej. Cy3 independientemente unos de otros. Dado que las muestras de la serie 1 se marcan con el colorante fluorescente Cy3 y las muestras de la serie 2 con el colorante fluorescente Cy5 (y la serie 3 con Cy2), la detección del estado de metilación en los fragmentos de la serie 1 no se ve influida por la medida de las intensidades de fluorescencia de los amplificados marcados fluorescentemente de las series 2 y 3 (y viceversa). Por consiguiente, es posible, a pesar de la complejidad incrementada de los amplificados, obtener datos fiables del mismo modo que en el caso de una complejidad de 64 amplificados.

Ejemplo 8

Utilización de colorantes múltiples para verificación de la reproducibilidad experimental

En el presente experimento se marcan amplificados PCR iguales con cuatro colorantes fluorescentes distintos y se verifican éstos en redundancia cuádruple. Para ello, partiendo de DNA tratado con bisulfito, se amplifica un fragmento definido de 529 pb de longitud a partir de la región promotora del gen ELK-1 con los oligonucleótidos iniciadores [SEQ ID NO: 3] ATGGTTTTGTTTAATYGTAGAGTTGTTT y [SEQ ID NO: 4] TAAACCCRAAAAAAAAAAACCCTAA TAT, y se hibridan contra oligonucleótidos inmovilizados, en este caso por ejemplo [SEQ ID NO: 10] ATTAA TAGCGTTTTGGTT y [SEQ ID NO: 11] ATTAATAGTGTGTTTGGTT, donde el C o T a detectar se encuentra en todos los casos en la posición 476 del amplificado. Por utilización de oligonucleótidos iniciadores marcados fluorescentemente con Cy3, Cy5, Cy2 y Cy7 se comparan las relaciones de las distintas muestras marcadas fluorescentemente y de este modo se obtiene una mayor seguridad experimental.

REIVINDICACIONES

1. Proceso para la detección del grado de metilación de una citosina determinada en el contexto secuencial 5'-CpG-3' de una muestra de DNA genómico, **caracterizado** porque

- a) se trata químicamente el DNA genómico, transformándose las bases citosina en uracilo, pero no las bases 5-metilcitosina;
- b) se amplifican fragmentos definidos, que contienen dicha citosina determinada, conservando los amplificados una marcación detectable;
- c) se hibridan los amplificados en dos clases de oligonucleótidos y/u oligómeros PNA en cada caso con un miembro de dicha citosina determinada;
- d) se determina la magnitud de la hibridación de los amplificados en las dos clases de oligonucleótidos y/u oligómeros PNA por detección de la marcación de los amplificados;
- e) se deduce de la relación de las marcaciones detectadas en las dos clases de oligonucleótidos y/u oligómeros PNA como consecuencia de la hibridación el grado de metilación de dicha citosina determinada en la muestra de DNA genómico.

2. Procedimiento según la reivindicación 1, **caracterizado** porque en el paso c) se realiza una hibridación de los amplificados en dos clases de oligómeros (oligonucleótidos y/u oligómeros PNA) en cada caso con un miembro de dicha citosina determinada, donde los oligómeros de la primera clase se hibridan preferiblemente a la secuencia que resulta del tratamiento químico del DNA genómico, si dicha citosina determinada en el DNA genómico se encontrara metilada, y donde los oligómeros de la segunda clase se hibridan preferiblemente a la secuencia que resulta del tratamiento químico del DNA genómico si dicha citosina determinada en el DNA genómico se encontrara no metilada.

3. Procedimiento según la reivindicación 1, **caracterizado** porque en el paso c) se realiza una hibridación de los amplificados en dos clases de oligómeros (oligonucleótidos y/u oligómeros PNA) en cada caso con un miembro de dicha citosina determinada, donde los oligómeros de la primera clase se hibridan preferiblemente a la secuencia que resulta del tratamiento químico del DNA genómico, si dicha citosina determinada en el DNA genómico se encontrara metilada y menos preferiblemente a la secuencia que resulta del tratamiento químico del DNA genómico, si dicha citosina determinada en el DNA genómico se encontrara no metilada, y donde los oligómeros de la segunda clase se hibridan al amplificado a investigar de modo esencialmente independiente del grado de metilación de dicha citosina determinada en el DNA genómico.

4. Procedimiento según la reivindicación 1, **caracterizado** porque en el paso c) se realiza una hibridación de los amplificados en dos clases de oligómeros (oligonucleótidos y/u oligómeros PNA) en cada caso con un miembro para dicha citosina determinada, donde los oligómeros de la primera clase se hibridan preferiblemente a la secuencia que resulta del tratamiento químico del DNA genómico, si dicha citosina determinada en el DNA genómico se encontrara no metilada y menos preferiblemente a la secuencia que resulta del tratamiento químico del DNA genómico, si dicha citosina determinada en el DNA genómico se encontrara metilada, y donde los oligómeros de la segunda clase se hibridan al amplificado a investigar de modo esencialmente independiente del grado de metilación de dicha citosina determinada en el DNA genómico.

5. Procedimiento según una de las reivindicaciones 1 a 4, **caracterizado** porque el procedimiento se realiza no sólo con la muestra de DNA genómico, sino también análogamente con DNA estándar presente como es bien sabido en la posición de dicha citosina determinada metilado o no metilado, donde las relaciones medidas en cada caso de acuerdo con la reivindicación 1 con el DNA estándar no metilado de las marcaciones detectadas en ambas clases de oligonucleótidos sirven como valor de contraste para un grado de metilación de 0 y, correspondientemente, las relaciones medidas en cada caso de acuerdo con la reivindicación 1 con el DNA estándar metilado de las marcaciones detectadas en ambas clases de oligonucleótidos sirven como valor de contraste para un grado de metilación de 1, y estos valores de contraste se emplean para la determinación del grado de metilación del DNA genómico de muestra.

6. Procedimiento según la reivindicación 5, **caracterizado** porque se utilizan muestras de DNA estándar conocidas adicionales para la calibración, las cuales tienen en todos los casos un grado de metilación cualquiera conocido de dicha citosina determinada.

7. Procedimiento según cualquiera de las reivindicaciones 5 ó 6, **caracterizado** porque los DNAs utilizados como estándar están marcados en cada caso de manera diferente y la muestra (el amplificado producido a partir de un DNA genómico correspondiente a la reivindicación 1) está provista a su vez de un marcador distinto de ellos.

8. Procedimiento según cualquiera de las reivindicaciones 1 a 7, **caracterizado** porque los amplificados, procedentes de diversas muestras de DNA genómico, están provistos de marcaciones diferentes.

9. Procedimiento según cualquiera de las reivindicaciones 1 a 8, **caracterizado** porque los amplificados, procedentes de las mismas muestras de DNA genómico, se proveen de marcaciones diferentes, a fin de conseguir por una determinación del valor medio de los valores obtenidos a partir de distintos procedimientos de detección un aumento de la exactitud de la medida.

10. Procedimiento según cualquiera de las reivindicaciones anteriores, **caracterizado** porque dichas marcaciones son marcaciones fluorescentes.

11. Procedimiento según cualquiera de las reivindicaciones anteriores, **caracterizado** porque el tratamiento químico se realiza con una solución de un bisulfito (= hidrogeno sulfito, disulfito).

12. Procedimiento según cualquiera de las reivindicaciones anteriores, **caracterizado** porque dicho marcador se detecta por su quimioluminiscencia, su absorción UV o su polarización de fluorescencia.

13. Procedimiento según cualquiera de las reivindicaciones 1 a 11, **caracterizado** porque las marcaciones son radionucleidos.

14. Procedimiento según cualquiera de las reivindicaciones 1 a 11, **caracterizado** porque las marcaciones son marcaciones másicas separables, que se detectan en un espectrómetro de masas.

15. Procedimiento según cualquiera de las reivindicaciones 1 a 11, **caracterizado** porque los productos PCR globalmente o sus fragmentos característicos se detectan en el espectrómetro de masas y por consiguiente se **caracterizan** inequívocamente por su masa.

16. Procedimiento según cualquiera de las reivindicaciones anteriores, **caracterizado** porque los oligómeros (oligonucleótidos y/u oligómeros PNA) comprenden una clase de la secuencia 5'-CG-3'.

17. Procedimiento según cualquiera de las reivindicaciones anteriores, **caracterizado** porque los oligómeros (oligonucleótidos y/u oligómeros PNA) comprenden una clase de la secuencia 5'-TG-3' o la secuencia 5'-CA-3'.

18. Procedimiento según las reivindicaciones 16 y 17, **caracterizado** porque los oligómeros (oligonucleótidos y/o PNA-oligómeros) de la primera clase contienen la secuencia 5'-CG-3' y los oligómeros de la segunda clase la secuencia 5'-TG-3' o la secuencia 5'-CA-3'.

19. Procedimiento según cualquiera de las reivindicaciones anteriores, **caracterizado** porque los oligómeros de la primera y de la segunda clase están inmovilizados sobre una fase sólida común.

20. Procedimiento según la reivindicación 11, **caracterizado** porque los oligonucleótidos están dispuestos sobre una fase sólida plana en una trama rectangular o hexagonal y el sitio de determinados oligonucleótidos en la fase sólida está correlacionado con su secuencia respectiva.

21. Procedimiento según cualquiera de las reivindicaciones 1-18, **caracterizado** porque los oligómeros de la primera y de la segunda clase están inmovilizados sobre perlas, que están codificadas con una serie de marcaciones detectables por separado.

22. Procedimiento según cualquiera de las reivindicaciones anteriores, **caracterizado** porque el paso b) de la reivindicación 1 se realiza en dos pasos parciales como sigue:

a) una preamplificación por PCR con al menos un par de iniciadores de secuencia diferente, que se hibridan inespecíficamente a una muestra de DNA pretratada según la reivindicación 1 y dan por tanto en el paso PCR más de un amplificado;

b) una amplificación por PCR del producto formado en la preamplificación con iniciadores de secuencia diferente, que son respectivamente idénticos o inversamente complementarios a una sección de la muestra de DNA pretratada según la reivindicación 1 [cadena (+) o cadena (-)] y se hibridan específicamente al DNA a amplificar.

23. Procedimiento según cualquiera de las reivindicaciones anteriores, **caracterizado** porque la amplificación de varias partes de DNA se realiza en un solo recipiente de reacción.

24. Procedimiento según cualquiera de las reivindicaciones anteriores, **caracterizado** porque para la amplificación se utiliza una DNA-polimerasa térmicamente estable.

25. Procedimiento según cualquiera de las reivindicaciones anteriores, **caracterizado** porque para la amplificación se utilizan oligonucleótidos iniciadores que contienen o bien solamente las bases T, A y C o las bases T, A y G.

26. Procedimiento según cualquiera de las reivindicaciones anteriores, **caracterizado** porque se analizan simultáneamente al menos 10 posiciones CpG en contexto secuencial diferente.

ES 2 299 520 T3

27. Procedimiento según cualquiera de las reivindicaciones anteriores, **caracterizado** porque se analizan simultáneamente al menos 50 posiciones CpG en contexto secuencial diferente.

5 28. Procedimiento según cualquiera de las reivindicaciones anteriores, **caracterizado** porque se analizan simultáneamente al menos 100 posiciones CpG en contexto secuencial diferente.

29. Procedimiento según cualquiera de las reivindicaciones anteriores, **caracterizado** porque se analizan simultáneamente al menos 500 posiciones CpG en contexto secuencial diferente.

10 30. Procedimiento según cualquiera de las reivindicaciones anteriores, **caracterizado** porque se analizan simultáneamente al menos 1000 posiciones CpG en contexto secuencial diferente.

15 31. Procedimiento según cualquiera de las reivindicaciones anteriores, en el cual la muestra de DNA genómico se ha obtenido de líneas de células, sangre, esputo, heces, orina, líquido cefalorraquídeo, tejido encapsulado en parafina, por ejemplo tejido de los ojos, el intestino, los riñones, el cerebro, el corazón, la próstata, el pulmón, la mama o el hígado, portaobjetos histológicos o todas las combinaciones posibles de los mismos.

20 32. Utilización de un procedimiento según cualquiera de las reivindicaciones anteriores para el diagnóstico y/o pronóstico de episodios perniciosos para pacientes o individuos, donde estos episodios perniciosos pertenecen al menos a una de las categorías siguientes: reacciones indeseables de medicamentos; enfermedades cancerosas; disfunciones, deterioro o enfermedad del CNS; síntomas de agresión o alteraciones del comportamiento; consecuencias clínicas o psicológicas de daños cerebrales; alteraciones psicóticas y trastornos de la personalidad; demencia y/o síndromes asociados; enfermedad, disfunción y deterioro cardiovascular; disfunción, deterioro o enfermedad del tracto gastrointestinal; disfunción, deterioro o enfermedad del sistema respiratorio; lesión, inflamación, infección, inmunidad y/o
25 convalecencia; disfunción, deterioro o enfermedad del cuerpo como anomalía en el proceso de desarrollo; disfunción, deterioro o enfermedad de la piel, los músculos, el tejido conjuntivo o los huesos; disfunción, deterioro o enfermedad endocrina y metabólica; dolores de cabeza o disfunción sexual.

30 33. Utilización de un procedimiento según cualquiera de las reivindicaciones anteriores para la diferenciación de tipos de células o tejidos o para la investigación de la diferenciación celular.

34. Kit para la realización de un procedimiento según cualquiera de las reivindicaciones mencionadas anteriormente que comprende

35 (a) un reactivo que contiene bisulfito;

(b) oligonucleótidos iniciadores para la preparación de amplificadores definidos;

40 (c) dos clases de oligonucleótidos, que están inmovilizadas en una fase sólida; donde

- los oligonucleótidos de la primera clase contienen la secuencia 5'-CG-3', y donde

- los oligonucleótidos de la segunda clase contienen la secuencia 5'-TG-3' y/o la secuencia 5'-CA-3'; y

45 (d) indicaciones para la realización del procedimiento.

50

55

60

65

Fig. 1

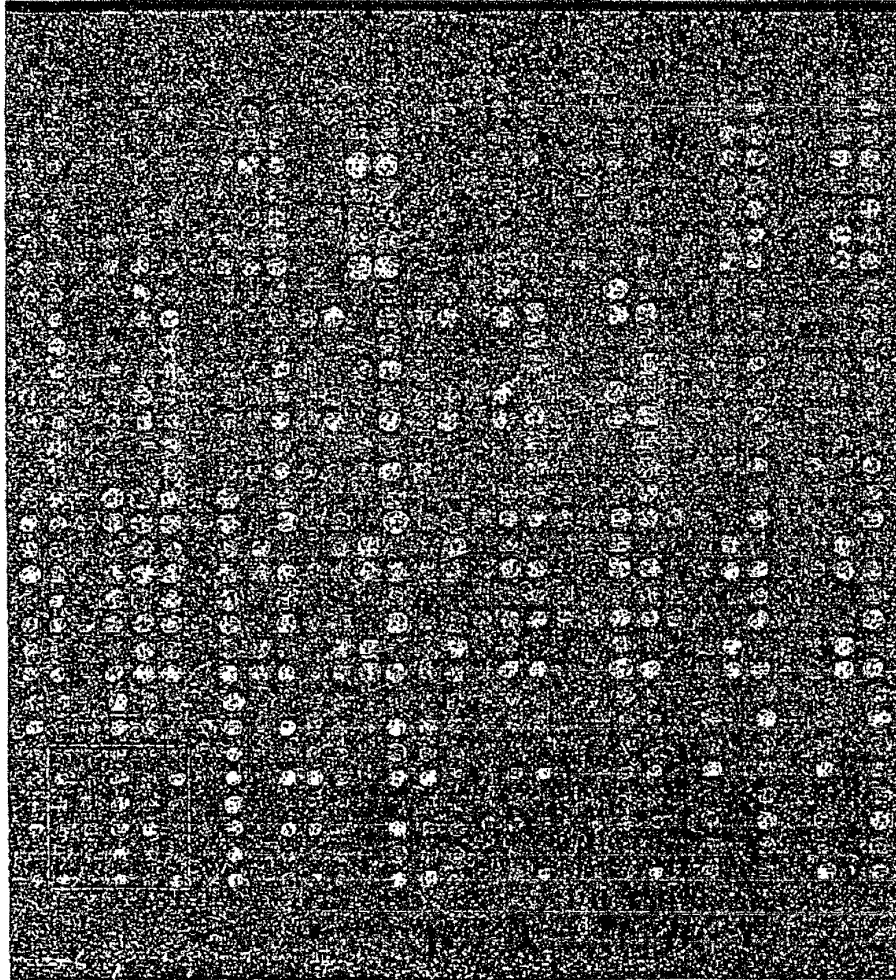
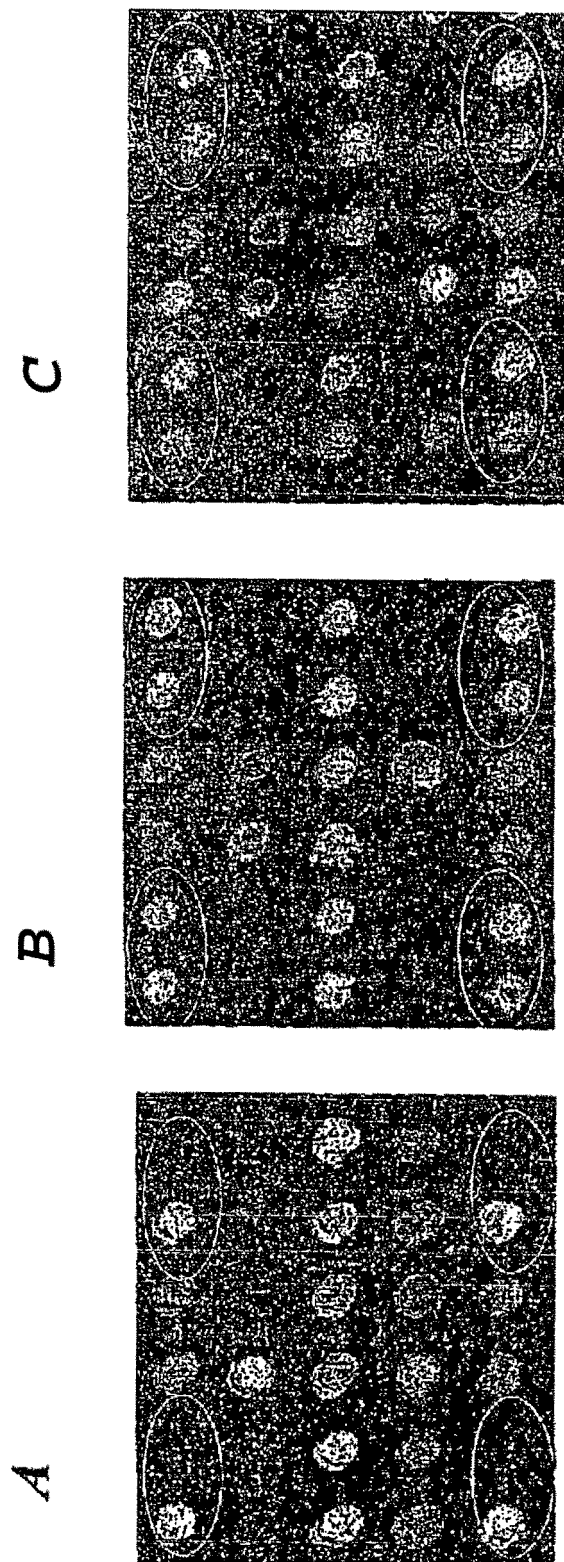


Fig. 2



ES 2 299 520 T3

LISTA DE SECUENCIAS

	<110> Epigenomics AG	
5	<120> Procedimiento para la determinación del grado de metilación de determinadas citosinas en DNA genómico en el contexto secuencial 5'-CpG-3'	
	<160> 11	
10	<210> 1	
	<211> 24	
	<212> DNA	
15	<213> Secuencia Artificial	
	<220>	
20	<223> Oligonucleótido	
	<400> 1	
	gctctatggg cttgtctaac cgta	24
25	<210> 2	
	<211> 18	
	<212> DNA	
30	<213> Secuencia Artificial	
	<220>	
35	<223> Oligonucleótido	
	<400> 2	
	aggtggtggg ggcgggtgg	18
40	<210> 3	
	<211> 28	
	<212> DNA	
45	<213> Secuencia Artificial	
	<220>	
50	<223> Oligonucleótido	
	<400> 3	
	atggttttgt ttaatygtag agttgttt	28
55	<210> 4	
	<211> 27	
	<212> DNA	
60	<213> Secuencia Artificial	
	<220>	
65	<223> Oligonucleótido	

ES 2 299 520 T3

	<400> 4	
	taaaccraa aaaaaaaaaac ccaatat	27
5	<210> 5	
	<211> 18	
	<212> DNA	
10	<213> Secuencia Artificial	
	<220>	
	<223> Oligonucleótido	
15	<400> 5	
	ctactcaacg aaaacaaa	18
20	<210> 6	
	<211> 18	
	<212> DNA	
25	<213> Secuencia Artificial	
	<220>	
	<223> Oligonucleótido	
30	<400> 6	
	ctactcaaca aaaacaaa	18
35	<210> 7	
	<211> 20	
	<212> DNA	
40	<213> Secuencia Artificial	
	<220>	
	<223> Oligonucleótido	
45	<400> 7	
	agcaacacct ccatgcactg	20
50	<210> 8	
	<211> 21	
	<212> DNA	
55	<213> Secuencia Artificial	
	<220>	
	<223> Oligonucleótido	
60	<400> 8	
	ttgattggac agcttgaatg c	21
65	<210> 9	
	<211> 13	

ES 2 299 520 T3

<212> DNA

<213> Secuencia Artificial

5 <220>

<223> Oligonucleótido

<400> 9

10

gaagagcgga cag

13

<210> 10

15 <211> 18

<212> DNA

<213> Secuencia Artificial

20 <220>

<223> Oligonucleótido

<400> 10

25

attaatagcg ttttggtt

18

<210> 11

30 <211> 18

<212> DNA

<213> Secuencia Artificial

35 <220>

<223> Oligonucleótido

<400> 11

40

attaatagtg ttttggtt

18

45

50

55

60

65