



19



OFICINA ESPAÑOLA DE
PATENTES Y MARCAS

ESPAÑA

11 Número de publicación: **2 294 231**

51 Int. Cl.:
C07H 21/00 (2006.01)
C12Q 1/68 (2006.01)

12

TRADUCCIÓN DE PATENTE EUROPEA

T3

86 Número de solicitud europea: **03019321 .3**
86 Fecha de presentación : **27.08.2003**
87 Número de publicación de la solicitud: **1394173**
87 Fecha de publicación de la solicitud: **03.03.2004**

54 Título: **Método mejorado para tratamiento por bisulfito.**

30 Prioridad: **29.08.2002 EP 02019097**
18.12.2002 EP 02028114

45 Fecha de publicación de la mención BOPI:
01.04.2008

45 Fecha de la publicación del folleto de la patente:
01.04.2008

73 Titular/es: **F. HOFFMANN-LA ROCHE AG.**
Grenzacherstrasse 124
4070 Basel, CH
Epigenomics AG.

72 Inventor/es: **Markert-Hahn, Christine y**
Block, Dirk

74 Agente: **Ungría López, Javier**

Aviso: En el plazo de nueve meses a contar desde la fecha de publicación en el Boletín europeo de patentes, de la mención de concesión de la patente europea, cualquier persona podrá oponerse ante la Oficina Europea de Patentes a la patente concedida. La oposición deberá formularse por escrito y estar motivada; sólo se considerará como formulada una vez que se haya realizado el pago de la tasa de oposición (art. 99.1 del Convenio sobre concesión de Patentes Europeas).

DESCRIPCIÓN

Método mejorado para tratamiento por bisulfito.

5 La presente solicitud está dirigida a un método para llevar a cabo una reacción de bisulfito con el fin de determinar las posiciones de metilación en un ácido nucleico, esto es las citosinas metiladas y no metiladas, mediante el cual el ácido nucleico es unido a una fase sólida durante la etapa de desaminación y/o desulfonación de la reacción de bisulfito. La fase sólida es preferiblemente un material que comprende vidrio o sílice, más preferiblemente lana de vidrio, una membrana de vidrio o una partícula magnética de vidrio. Además, se describe la utilización de una fase
10 sólida para unir un ácido nucleico durante la etapa de desaminación y/o desulfonación de la reacción de bisulfito y un kit que contiene un reactivo bisulfito y una fase sólida.

Los genes constituyen únicamente una pequeña proporción del genoma total de los mamíferos, y el control preciso de su expresión en presencia de un impresionante fondo de ácido desoxirribonucleico (ADN) no codificador presenta
15 un problema sustancial para su regulación. El ADN no codificador que contiene intrones, elementos repetitivos y elementos que pueden ser transpuestos potencialmente activos, requiere mecanismos eficaces para su silenciación a largo plazo. Los mamíferos parecen haber aprovechado las posibilidades permitidas por la metilación de las citosinas para proporcionar un mecanismo heredable para alterar las interacciones ADN-proteína con el fin de favorecer tal silenciación. La metilación del ADN es esencial para el desarrollo de los mamíferos y desempeña una función potencial durante el envejecimiento y el cáncer. La implicación de la metilación en la regulación de la expresión génica y como
20 modificación epigenética que marca los genes sellados está bien establecida. En los mamíferos, la metilación tiene lugar únicamente en los residuos de citosina y más específicamente sólo en los residuos de citosina adyacentes a un residuo de guanosina, esto es en la secuencia CG. La detección y la generación de mapas de los sitios de metilación del ADN son etapas esenciales para comprender las señales moleculares que indican si una secuencia dada está metilada.

25 Esto se lleva a cabo actualmente mediante el método llamado del bisulfito descrito por Frommer, M. y col., Proc. Natl. Acad. Sci. USA 89 (1992) 1827-31, para la detección 5-metil-citosinas. El método del bisulfito para el mapeo de 5-metil-citosina utiliza el efecto de que el hidrógeno sulfito de sodio reacciona con citosina pero no reacciona o reacciona sólo débilmente con 5-metil-citosina. La citosina reacciona con el bisulfito para formar un producto intermedio de la reacción que es citosina sulfonada, la cual es susceptible a experimentar una desaminación que
30 tiene como resultado un uracilo sulfonado que puede ser desulfonado a uracilo bajo condiciones alcalinas. Es de conocimiento público el que el uracilo tiene el comportamiento de apareamiento de bases de la timina diferente al de la citosina de partida, mientras que la 5-metil-citosina tiene el comportamiento de apareamiento de bases de la citosina. Esto hace posible discriminar entre citosinas metiladas o no metiladas mediante, por ejemplo, secuenciación genómica con bisulfito (Grigg, G. y Clark, S., Bioessays 16 (1994) 431-6; Grigg, G.W., DNA Seq. 6 (1996) 189-98) o PCR específica de metilación (MSP) descrita en US 5.786.146.

Existen varios documentos dirigidos a aspectos específicos de la reacción de bisulfito. Benyajati, C. y col., Nucleic Acids Res. 8 (1980) 5649-67, realizan investigaciones generales acerca de la modificación con bisulfito de la 5-metil-desoxicitosina y de la desoxicitosina. Olek, A. y col., Nucleic Acids Res. 24 (1996) 5064-6, describen un método para la secuenciación de bases con bisulfito en el cual el tratamiento con bisulfito y las etapas posteriores de PCR se llevan a cabo sobre un material incluido en esferas de agarosa. En el método del bisulfito descrito por Clark, S.J. y col., Nucleic Acids Res. 22 (1994) 2990-7, la muestra es desalada después de la desaminación.
40

45 Raizis, A.M. y col., Anal. Biochem. 226 (1995) 161-6, describen un método con bisulfito para el mapeo de 5-metil-citosina que minimiza la degradación del molde. Investigan la influencia del pH, de la temperatura y del tiempo de reacción. Investigaciones similares han sido realizadas por Grunau, C. y col., Nucleic Acids Res. 29 (2001) E65-5 o por Warnecke, P.M. y col., Methods 27 (2002) 101-7. Componentes adicionales diferentes en la mezcla de bisulfito están descritos por WO 01/98528 o por Paulin, R. y col., Nucleic Acids Res. 26 (1998) 5009-10. En WO 02/31186 se describe una etapa de bisulfito adicional después del tratamiento con bisulfito y PCR. Komiyama, M. y Oshima, S., Tetrahedron Letters 35 (1994) 8185-8188 investigaron la catálisis de la desaminación de citosina inducida por bisulfito en oligodesoxirribonucleótidos.
50

Existen kits para llevar a cabo tratamientos con bisulfito que están disponibles comercialmente en Intergen, distribuidos por Serologicals Corporation, Norcross, GA, EE.UU., por ejemplo el kit de modificación de ADN CpGenome™.
55

Hayatsu y col., Chem. Pharm. Bull. 45(8) pp. 1363-1368, 1997, describen un método para convertir una base citosina de un ADN en una base uracilo mediante tratamiento con bisulfito. El ADN está unido a quitosano.
60

Una variación del método de secuenciación genómica con bisulfito está descrita por Feil, R. y col., Nucleic Acids Res. 22 (1994) 695-6, mediante el cual el ADN genómico es unido a esferas de vidrio después de la desaminación y lavado. Después de la elución el ácido nucleico es desulfonado. Es sabido que los ácidos nucleicos pueden ser aislados mediante la utilización de su comportamiento de unión a superficies de vidrio, por ejemplo la adsorción a gel de sílice o a tierra de diatomeas, la adsorción a partículas magnéticas de vidrio (MGPs) o a partículas de organosilanos bajo condiciones caotrópicas. La extracción utilizando fases sólidas contiene normalmente las etapas de adición de la solución con los ácidos nucleicos a la fase sólida bajo condiciones que permitan la unión de la sustancia de interés a la fase sólida, la eliminación del resto de la solución de los ácidos nucleicos unidos a la fase sólida y la liberación
65

posterior de los ácidos nucleicos de la fase sólida a un eluato líquido (algunas veces denominada elución). El resultado de tal proceso es normalmente una solución que contiene la sustancia de interés en estado disuelto.

Todos los métodos de la técnica anterior para el tratamiento con bisulfito tienen desventajas. Por tanto, el problema que tenía que ser resuelto por la presente invención era proporcionar un método que superara las desventajas de los métodos de la técnica anterior.

El problema anteriormente discutido es solucionado proporcionando un método para la conversión de una base citosina, preferiblemente de bases citosina, de un ácido nucleico en una base uracilo mediante tratamiento con bisulfito, preferiblemente en bases uracilo, mediante el cual preferiblemente las bases 5-metil-citosina no son convertidas significativamente ("reacción de bisulfito" o "tratamiento con bisulfito"), en el que el ácido nucleico está unido a una base sólida durante las etapas de desaminación y/o de desulfonación de la reacción de bisulfito, en el que la fase sólida es seleccionada de vidrio o sílice, un material que contenga vidrio o sílice, un intercambiador iónico o hidroxipatita; prefiriéndose lana de vidrio, una membrana de vidrio o una partícula magnética de vidrio. Además, la presente invención describe utilizaciones de una fase sólida en la etapa de desaminación y/o desulfonación de la reacción de bisulfito y kits que contienen una fase sólida y reactivos para llevar a cabo una reacción de bisulfito.

La utilización de una fase sólida durante la etapa de desaminación y/o desulfonación de la reacción de bisulfito, preferiblemente en la etapa de desulfonación, tiene la ventaja de que el manejo es más sencillo y/o fácilmente susceptible de automatización. Por ejemplo, cuando se utilizan lanas de vidrio para las etapas de desaminación y/o desulfonación, no son necesarias las tediosas reacciones de precipitación de ADN; la separación del ADN unido-libre puede ser realizada fácilmente por centrifugación, el volumen muerto de la lana de vidrio es despreciable y por tanto las etapas de lavado son muy eficaces. Esto es una ventaja cuando el tratamiento con bisulfito del ADN es utilizado para PCR, donde los inhibidores potenciales pueden reducir significativamente la sensibilidad. El método de acuerdo con la invención puede ser realizado fácilmente de forma manual y es por tanto muy adecuado para laboratorios más pequeños en los que no hay disponibles analizadores de rutina. Para laboratorios mayores con una mayor cantidad de muestras, la utilización de una fase sólida que pueda ser manejada por los analizadores de rutina, en particular partículas de vidrio magnéticas, es ventajoso. En una reacción de bisulfito rutinaria, se eligen condiciones de desnaturalización ya que el bisulfito puede reaccionar únicamente con pirimidinas que no estén implicadas en el apareamiento de bases. Por tanto, es sorprendente el que la reacción de bisulfito pueda ser llevada a cabo con éxito de manera satisfactoria mediante el método de acuerdo con la invención, ya que el ácido nucleico está unido a la superficie de la fase sólida por varias interacciones que afectan posiblemente al éxito de la reacción de bisulfito.

De acuerdo con la invención, el término "reacción de bisulfito", "tratamiento con bisulfito" o "método del bisulfito" indica una reacción para la conversión de una base citosina, en particular de bases citosina, de un ácido nucleico en una base o bases uracilo, preferiblemente en presencia de iones bisulfito, mediante la cual preferiblemente las bases 5-metil-citosina no son convertidas significativamente. Esta reacción para la detección de citosinas metiladas está descrita con detalle por Frommer y col., *supra* y Grigg y Clark, *supra*. La reacción de bisulfito contiene una etapa de desaminación y una etapa de desulfonación que pueden ser llevadas a cabo separadamente o simultáneamente (ver la Figura 1: Grigg y Clark, *supra*). La afirmación de que las bases 5-metil-citosina no son convertidas significativamente, tendrá en cuenta únicamente el hecho de que no puede excluirse que un pequeño porcentaje de bases 5-metil-citosina sea convertido a uracilo aunque se desee convertir únicamente y exclusivamente las bases citosina (no metiladas) (Frommer y col., *supra*).

El método de la invención puede ser realizado en varias disposiciones de las etapas de reacción con bisulfito e inmovilización. En una primera realización, la etapa de desaminación y desulfonación se realiza mientras que el ácido nucleico está unido a la fase sólida. Por tanto, en una realización preferida de la invención, se describe un método para la conversión de una base citosina, preferiblemente de bases citosina, de un ácido nucleico en una base uracilo, preferiblemente en bases uracilo ("reacción de bisulfito"), mediante el cual preferiblemente las bases 5-metil-citosina no son convertidas significativamente, que comprende las etapas de

- a) unión del ácido nucleico a una fase sólida,
- b) incubación del ácido nucleico unido a la fase sólida en presencia de iones sulfito, mediante lo cual el ácido nucleico es desaminado,
- c) lavado opcional del ácido nucleico desaminado unido a la fase sólida,
- d) incubación del ácido nucleico desaminado unido a la fase sólida bajo condiciones alcalinas, mediante lo cual el ácido nucleico desaminado es desulfonado,
- e) lavado opcional del ácido nucleico desaminado y desulfonado unido a la fase sólida y
- f) elución opcional del ácido nucleico desaminado y desulfonado de la fase sólida.

En una segunda realización de la invención, la etapa de desulfonación se realiza mientras el ácido nucleico está unido a la fase sólida. Por tanto, en otra realización preferida de la invención, se describe un método para la conversión de una base citosina, preferiblemente de bases citosina, de un ácido nucleico en una base uracilo, preferiblemente

en bases de uracilo, mediante el cual las bases 5-metil-citosina no son convertidas significativamente ("reacción de bisulfito"), que comprende las etapas de

- a) incubación del ácido nucleico en presencia de iones sulfito, mediante lo cual el ácido nucleico es desaminado,
- b) unión del ácido nucleico desaminado a una fase sólida,
- c) lavado opcional del ácido nucleico desaminado unido a la fase sólida,
- d) incubación del ácido nucleico desaminado unido a la fase sólida bajo condiciones alcalinas, mediante lo cual el ácido nucleico desaminado es desulfonado,
- e) lavado opcional del ácido nucleico desaminado y desulfonado unido a la fase sólida y
- f) elución opcional del ácido nucleico desaminado y desulfonado de la fase sólida.

En una tercera realización, la etapa de desaminación se lleva a cabo mientras el ácido nucleico está unido a la fase sólida. Por tanto, en otra realización preferida de la invención, se describe un método para la conversión de una base citosina, preferiblemente de bases citosina, de un ácido nucleico en una base uracilo, preferiblemente en bases uracilo, mediante el cual preferiblemente las bases 5-metil-citosina no son convertidas significativamente ("reacción de bisulfito"), que comprende las etapas de

- a) unión del ácido nucleico a una fase sólida,
- b) incubación del ácido nucleico unido a la fase sólida en presencia de iones sulfito, mediante lo cual el ácido nucleico es desaminado,
- c) lavado opcional del ácido nucleico unido a la fase sólida,
- d) elución del ácido nucleico desaminado a partir de la fase sólida y
- e) incubación del ácido nucleico desaminado bajo condiciones alcalinas, mediante lo cual el ácido nucleico desaminado es desulfonado.

El experto con experiencia en la técnica sabe cómo realizar la reacción del bisulfito, por ejemplo mediante referencia a Frommer y col., *supra* o Grigg y Clark, *supra*, que describen los principales parámetros de la reacción del bisulfito. De Grunau y col., *supra*, el experto en la materia sabe qué variaciones son posibles en el método del bisulfito. Se describe la influencia del tiempo y la temperatura de incubación sobre la eficacia de desaminación y parámetros que influyen sobre la degradación del ADN. En resumen, en la etapa de desaminación se emplea un tampón que contiene iones bisulfito, opcionalmente agentes caotrópicos y opcionalmente también reactivos adicionales tales como un alcohol o estabilizantes tales como hidroquinona, y el pH está en el rango ácido. La concentración de bisulfito está entre 0,1 y 6 M de bisulfito, preferiblemente de 1 M a 5,5 M; la concentración del agente caotrópico está entre 1 y 8 M, por lo que se emplean preferiblemente sales de guanidinio; el pH está en el rango ácido, preferiblemente entre 4,5 y 6,5; la temperatura está entre 0°C y 90°C, preferiblemente entre temperatura ambiente (25°C) y 90°C, y el tiempo de reacción está entre 30 minutos y 24 horas o 48 horas, o incluso mayor, pero preferiblemente entre 1 hora y 24 horas. La etapa de desulfonación se realiza añadiendo una solución o tampón alcalinos tal como por ejemplo una solución que contenga únicamente un hidróxido, por ejemplo hidróxido de sodio, o una solución que contenga etanol, cloruro de sodio e hidróxido de sodio (por ejemplo, EtOH 38%, NaCl 100 mM, NaOH 200 mM) e incubando a temperatura ambiente o a temperaturas elevadas durante varios minutos, preferiblemente de 5 minutos a 60 minutos.

En una realización de la invención, el ácido nucleico es ácido desoxirribonucleico (ADN), en particular ADN genómico, o un ácido nucleico, esto es el ADN o el ácido nucleico que se encuentra en el genoma del organismo y que es transmitido a la descendencia como información necesaria para la supervivencia. La frase es utilizada para distinguir entre otros tipos de ADN, tales como los encontrados en plásmidos. El origen del ácido nucleico puede eucariótico o procariótico, preferiblemente de vertebrados, particularmente de mamíferos, muy preferiblemente de animales o humanos.

En una realización de la invención, el ácido nucleico está unido a la fase sólida, que está sin modificar, esto es el ácido nucleico está unido directamente sin ningún compuesto que medie la unión a la fase sólida. El ácido nucleico se une a la superficie sin modificar de la fase sólida, por lo que la unión a la superficie tendrá también en cuenta que la fase sólida puede contener poros y que el ácido nucleico puede unirse a la superficie de los poros de la fase sólida. En la invención, la fase sólida es un intercambiador iónico (disponible comercialmente en, por ejemplo, Amersham Biosciences Europe, Freiburg, Alemania), capaz de unirse a un ácido nucleico bajo condiciones específicas, hidroxipatita (disponible comercialmente en Sigma, Taufkirchen, Alemania), vidrio o sílice o materiales que contengan vidrio o sílice, preferiblemente con una superficie no modificada. En otra realización, la fase sólida puede estar modificada, esto es la fase sólida se une indirectamente al ácido nucleico con un compuesto que medie la unión a la fase sólida, por ejemplo mediante la unión específica de secuencias del ácido nucleico a oligonucleótidos

fijados a la superficie, o mediante la unión de estreptavidina (fijada a la superficie de la fase sólida) a ADN marcado con biotina. Partículas adecuadas están por tanto disponibles comercialmente en DYNAL, Oslo, Noruega y descritas en, por ejemplo, WO 90/06045.

5 El término “no modificada” significa que no existe ninguna modificación química adicional, esto es ningún otro grupo químico está unido covalentemente o no covalentemente. El término “superficie no modificada”, “superficie de sílice no modificada” o “superficie de vidrio no modificada”, significa que no hay otros grupos químicos unidos covalentemente o no covalentemente que sirvan como sustancia intermedia para la unión del ácido nucleico, y en la que los ácidos nucleicos se unen a la sustancia intermedia y no a la propia superficie de sílice. Por tanto, los ácidos nucleicos se unen preferiblemente a la “superficie no modificada” directamente mediante enlaces de hidrógeno y otras
10 fuerzas atómicas. Ejemplos de superficies modificadas son superficies de sílice a las cuales se fijan oligonucleótidos que se unen de manera específica de la secuencia a moléculas de ácido nucleico. Otro ejemplo de superficies de sílice modificadas son superficies de sílice revestidas con estreptavidina a las cuales se unen moléculas de ADN biotiniladas.

15 En una realización particularmente preferida de acuerdo con la invención, la fase sólida es un material que contiene vidrio o sílice, preferiblemente con una superficie (vidrio o sílice) no modificada, por ejemplo fibras de vidrio, tierra de diatomeas, esferas o partículas de vidrio, membranas de vidrio o partículas magnéticas de vidrio u otras sustancias cubiertas con una superficie de vidrio no modificada. Son particularmente preferidas las lanas de vidrio o las membranas de vidrio o las partículas magnéticas de vidrio. Tales fases sólidas están descritas en, por ejemplo, EP 0 389 063 o
20 US 5.234.809.

Las condiciones para la unión de ADN o de ácidos nucleicos a superficies de vidrio o sílice son básicamente conocidas por los expertos en este campo. Estos procesos están descritos con detalle por varios documentos. En Vogelstein, B. y Gillespie, D., Proc. Natl. Acad. Sci. USA 76 (1979) 615-9, por ejemplo, se propone un procedimiento para unir
25 ácidos nucleicos procedentes de geles de agarosa en presencia de yoduro de sodio a vidrio incoloro esmerilado. La purificación de ADN plasmídico de bacterias sobre polvo de vidrio en presencia de perclorato de sodio está descrita en Marko, M.A. y col., Anal. Biochem. 121 (1982) 382-7. En DE-A 37 34 442, se describe el aislamiento de ADN monocatenario del fago M13 sobre filtros de fibra de vidrio mediante precipitación de las partículas del fago utilizando ácido acético y lisis de las partículas del fago con perclorato. Los ácidos nucleicos unidos a los filtros de fibra de vidrio
30 son lavados y eluidos posteriormente con tampón Tris/EDTA conteniendo metanol. Un procedimiento similar para purificar ADN de fagos lambda está descrito en Jakobi, R. y col., Anal. Biochem. 175 (1988) 196-201. El procedimiento supone la unión selectiva de ácidos nucleicos a superficies de vidrio en soluciones de sales caotrópicas y la separación de los ácidos nucleicos de los contaminantes tales como agarosa, proteínas o residuos celulares. Para separar las partículas de vidrio de los contaminantes, las partículas pueden ser centrifugadas o bien los fluidos son pasados a través de filtros de fibra de vidrio. Ésta es, sin embargo, una etapa limitante que impide que el procedimiento sea utilizado para
35 procesar grandes cantidades de muestra. En una realización preferida de la invención, se utilizan partículas de vidrio magnéticas para unir los ácidos nucleicos después de precipitación por la adición de sal y etanol, según está descrito en, por ejemplo, Alderton, R.P. y col., Anal. Biochem. 201 (1992) 166-9 y en WO 91/12079 (PCT GB 91/00212).

40 En una realización muy preferida de la invención, la fase sólida es una partícula magnética de vidrio, preferiblemente con una superficie de vidrio no modificada. Las partículas magnéticas de vidrio son una dispersión sólida de pequeños núcleos magnéticos en vidrio, esto es, son gotitas de vidrio en las cuales están dispersos objetos magnéticos muy pequeños. Esos objetos que son referidos como magnéticos son atraídos por un imán, esto es, por ejemplo, por materiales ferri o ferromagnéticos o superparamagnéticos. Las sustancias paramagnéticas no son útiles ya que
45 solamente son atraídas por los imanes muy débilmente, lo cual no es suficiente para un método de acuerdo con esta invención. Se prefieren los materiales ferri o ferromagnéticos, en particular si no han sido todavía premagnetizados. La premagnetización en este contexto significa la puesta en contacto con un imán, que incrementa la remanencia magnética. Los materiales magnéticos preferidos son hierro u óxido de hierro tal como por ejemplo magnetita (Fe_3O_4) o Fe_2O_3 , preferiblemente $\gamma\text{-Fe}_2\text{O}_3$. En principio, podría utilizarse ferrita de bario, níquel, cobalto, aleaciones de Al-Ni-Fe-Co o cualquier otro material ferri o ferromagnético. Son particularmente preferidas de acuerdo con la presente invención las partículas de vidrio magnéticas descritas en WO 96/41811, WO 00/32762 y WO 01/37291.
50

En una realización muy preferida de la invención, las partículas de vidrio magnéticas tienen un lixiviador de hierro inferior, ya que el hierro es un inhibidor de la reacción de amplificación posterior, esto es el hierro es un inhibidor
55 enzimático. Ésta es, por tanto, una característica importante de las partículas de vidrio magnéticas. Preferiblemente, el lixiviador de hierro en agua o HCl 1 M (durante 20 minutos) está por debajo de 40 ppm, más preferiblemente por debajo de 20 ppm, muy preferiblemente por debajo de 10 ppm. En la realización más preferida de la invención, las partículas de vidrio magnéticas son las descritas en la solicitud internacional WO 01/37291, que están también disponibles públicamente en el kit de aislamiento de ADN MagNA Pure LC DNA Isolation Kit I (Roche, Mannheim, Alemania). Estas partículas sedimentan lentamente y pueden ser por tanto utilizadas de forma ventajosa en un método
60 automatizado de acuerdo con la invención. La producción de las mismas se resumen a continuación.

Las partículas de vidrio magnéticas son sustancialmente esféricas, tienen un pequeño diámetro y contienen al menos un objeto magnético con un diámetro entre 5 y 500 nm. Esto tiene consecuencias sorprendentes sobre la
65 cinética de sedimentación, cuantificada por los valores del tiempo medio $t_{1/2}$, que es el tiempo transcurrido hasta que el 50% de las partículas han sedimentado a partir de un elemento de volumen específico. El periodo de semivida para la sedimentación de una suspensión de 3 mg/ml, peso por volumen, de las MGPs con una superficie de vidrio no modificada de acuerdo con la invención en isopropanol es más de 3 minutos, preferiblemente 4 minutos, más

preferiblemente 6 minutos. Sin embargo, los valores más preferidos para el periodo de semivida son de más de 10 minutos o incluso de más de 20 minutos. Los objetos magnéticos de las MGP's más preferidas pueden ser, por ejemplo, pigmentos magnéticos. El tamaño de los objetos magnéticos está en el rango de nanoescala, esto es entre 5 y 500 nm, preferiblemente entre 10 y 200 nm, muy preferiblemente entre 15 y 50 nm. Los pigmentos magnéticos adecuados están producidos por la compañía CERAC, tienen un diámetro medio de 23 nm y constan de $\gamma\text{-Fe}_2\text{O}_3$ (superficie BET 50 m²/g, CERAC: P.O. Box 1178, Milwaukee, Wisconsin 53201-1178, EE.UU.; N° de Artículo 1-2012). Las partículas de vidrio magnéticas más preferidas de acuerdo con la presente invención se caracterizan además por el hecho de que las MGP's tienen un diámetro de partícula entre 0,5 μm y 5 μm , preferiblemente entre 1 μm y 2 μm , determinado mediante microscopía electrónica de barrido de alta resolución, mientras que los objetos magnéticos tienen un diámetro entre 5 y 500 nm, preferiblemente entre 10 y 200 nm, muy preferiblemente en el rango de 15 a 50 nm, según se describió anteriormente. Por tanto, las MGP's se caracterizan adicionalmente por una relación de diámetros entre el núcleo de pigmento magnético y la partícula de vidrio magnética menor de 1 a 10, determinada mediante microscopía electrónica de barrido de alta resolución. Las MGP's más preferidas son microporosas pero tienen una superficie muy estructurada y por tanto relativamente grande, con más de 6 m²/g. Preferiblemente, las partículas de vidrio magnéticas tienen un área de superficie en el rango de 5 a 100 m²/g, preferiblemente de 5 a 90 m²/g, más preferiblemente en el rango de 10 a 50 m²/g, muy preferiblemente en el rango de 15 a 30 m²/g. Ésta puede ser determinada mediante el método de Braunauer-Emmett-Teller utilizando un aparato comercial automático. Para una discusión de este método, denominado familiarmente el método BET, ver Braunauer, en "The Adsorption of Gases and Vapors" (1943), Princeton University Press.

Las partículas de vidrio magnéticas utilizadas en la presente invención pueden ser proporcionadas en diferentes formulaciones, esencialmente según está descrito en WO 01/37291. Es posible proporcionarlas en forma de tableta, como un polvo o, preferiblemente, como una suspensión. En una realización preferida de la invención estas suspensiones contienen entre 5 y 60 mg/ml de partículas de vidrio magnéticas (MGP's). En otra realización de la invención, el material que contiene sílice es suspendido en soluciones tamponadas acuosas que pueden contener opcionalmente un agente caotrópico en una concentración de entre 2 y 8 moles/l, y preferiblemente entre 4 y 6 moles/l. Las sales caotrópicas son yoduro de sodio, perclorato de sodio, tiocianato de guanidinio, isotiocianato de guanidinio o clorhidrato de guanidinio. Un agente caotrópico de acuerdo con la presente invención es cualquier sustancia química que altere la estructura ordenada del agua líquida y tendrá como efecto el que el ADN o el ARN se una a las MGP's de acuerdo con la presente invención si este agente está presente en la solución que contiene el ADN o el ARN. Son también posibles otros compuestos conocidos por los expertos en este campo.

En una realización preferida de la invención, las partículas de vidrio magnéticas son producidas mediante el método de sol-gel descrito en WO 01/37291, WO 00/37291 y WO 96/41811, en particular cuando el método de sol-gel comprende las etapas de:

- suspensión de los objetos magnéticos en un sol
- hidrólisis del sol con el fin de cubrir los objetos magnéticos con un gel
- deshidratación por aspersión de los objetos magnéticos cubiertos con un gel en un deshidratador por aspersión de dos boquillas y
- sinterización del polvo deshidratado por aspersión con el fin de formar un vidrio a partir del gel que cubre los objetos magnéticos.

Las MGP's preferidas de acuerdo con la invención son partículas de vidrio magnéticas producidas de acuerdo con el Ejemplo 8 de WO 00/32762 que contienen como pigmento magnético negro mate micronizado. Las MGP's más preferidas de acuerdo con la invención son producidas según la solicitud internacional WO 01/37291, las cuales se proporcionan también en el kit de aislamiento de ADN MagNa Pure LC DNA Isolation Kit I (Roche, Mannheim, Alemania). Son también producidas mediante el método de sol-gel según está descrito en la solicitud internacional WO 01/37291 utilizando objetos o pigmentos magnéticos con un diámetro de 23 nm aproximadamente (fabricados por CERAC, consistentes en $\gamma\text{-Fe}_2\text{O}_3$; CERAC: P.O. Box 1178, Milwaukee, Wisconsin 53201-1178, EE.UU.; N° de Artículo 1-2012). Una vez que los objetos magnéticos son cubiertos con el gel, se crea un polvo mediante pulverización de la suspensión a través de una boquilla de dos fluidos. Sistemas de deshidratación por aspersión adecuados son producidos por Nubilos Molekularzerstäubung, Ladisch GmbH & Co. KG, Konstanz, Alemania, por ejemplo el "Labor-Zerstäubungstrockner (Typ LTK)" o por Büchi AG, Uster, Suiza, por ejemplo el Mini Spray Dryer (Tipo B-191). Como las relaciones de los diámetros entre los núcleos magnéticos y la cubierta de vidrio son menores de 1 a 10, preferiblemente entre 1:10 y 1:1000, la geometría y el número de núcleos magnéticos incorporados o de sus vehículos inertes no determina la forma y el tamaño de las partículas sino las condiciones de fabricación, en particular las condiciones durante la deshidratación por aspersión. En otras palabras, la elección de la presión, la temperatura de entrada, la temperatura de salida y la velocidad de flujo durante el procedimiento de deshidratación por aspersión representa los grados de libertad que determinan la distribución de tamaños, la forma de las gotas de vidrio y por ello modificará las MGP's. Por tanto, las boquillas del sistema de deshidratación por aspersión son calentadas. La temperatura de entrada está entre 120°C y 500°C, preferiblemente entre 170°C y 230°C o entre 150°C y 230°C, muy preferiblemente entre 150°C y 200°C o entre 190°C y 210°C, o a 200°C o ligeramente inferior. La temperatura de salida depende del punto de ebullición del sol y por ello del solvente y puede estar por encima de, ser igual a, o estar ligeramente por debajo de, esto es menos de 10°C, el punto de ebullición del solvente. Cuando se utiliza etanol como

solvente, está entre 50°C y 300°C, preferiblemente entre 70°C y 150°C, muy preferiblemente entre 80°C y 110°C. La temperatura óptima está entre 90°C y 100°C. La presión de la boquilla es más de 3 bares, preferiblemente está regulada entre 4 y 6 bares. El técnico apreciará el hecho de que los parámetros exactos dependerán del sistema de deshidratación por aspersión utilizado. Sin embargo, él puede transferir las descripciones de la presente invención a cualquier otro sistema de deshidratación por aspersión y encontrar los parámetros considerando las descripciones de esta invención. Fórmulas como las descritas en Masters: "Spray Drying Handbook" (1991), John Wiley & Sons, New York, pueden conducirlo al camino para encontrar los parámetros que tienen que ser elegidos para otras preparaciones. Preferiblemente, buscará en los manuales de su sistema de deshidratación por aspersión o contactará con el servicio técnico del fabricante del sistema de deshidratación por aspersión. Para optimizar el rendimiento, la temperatura de densificación o sinterización debe ser tan elevada como sea posible, esto es ligeramente por debajo del rango de fusión. La temperatura exacta depende de la composición del vidrio pero puede estar entre 400°C y 1200°C. En el caso de la composición de vidrio EJ descrita en WO 01/37291, la temperatura de sinterización está entre 720°C y 770°C, preferiblemente alrededor de 750°C. Está dentro de la experiencia del técnico el encontrar las temperaturas para cada composición de vidrio cuando se tienen en cuenta las descripciones de la presente invención. Posteriormente, el polvo es calentado durante 1 hora a 200°C, enfriado opcionalmente hasta temperatura ambiente y calentado a 750°C (temperatura de densificación o sinterización) en una atmósfera de nitrógeno con una velocidad de calentamiento de 1 K/minuto y es mantenido a esa temperatura durante 1 hora. Posteriormente el horno es enfriado a 150°C y calentado de nuevo a 200°C durante una hora en aire. Después de enfriar hasta temperatura ambiente, el polvo es transferido a un tamiz (50 μ m) y tamizado durante 30 minutos. La muestra tamizada es embotellada y esterizada a 200°C durante 4 horas y posteriormente enfriada a 80°C. Posteriormente los vasos de vidrio son retirados del horno, cubiertos con papel de aluminio estéril y cerrados.

El procedimiento experimental para unir el ácido nucleico a superficies de vidrio o de sílice no modificadas (o preferiblemente a las partículas magnéticas de vidrio) puede ser descrito con detalle según sigue. Es realizado preferiblemente en presencia de sales caotrópicas con una concentración de entre 1 y 8 moles/l, y preferiblemente entre 2 y 6 moles/l. Las sales caotrópicas pueden ser yoduro de sodio, perclorato de sodio, tiocianato de guanidinio, isotiocianato de guanidinio o clorhidrato de guanidinio. Un agente caotrópico de acuerdo con la presente invención es cualquier sustancia química que altere la estructura ordenada del agua líquida y tenga como efecto el que el ADN (o ARN) se una a las partículas magnéticas de vidrio si este agente está presente en la solución que contiene el ADN (o el ARN). Pueden estar presentes también otras sustancias biológicas conocidas por los expertos en este campo. Otras sustancias más son también posibles. Para unir la mezcla de ácidos nucleicos y opcionalmente otros compuestos biológicos, las esferas de vidrio con una superficie de vidrio no modificada son añadidas a la mezcla e incubadas durante un tiempo suficiente para que tenga lugar la unión. Los expertos están normalmente familiarizados con la duración de la etapa de incubación. Esta etapa puede ser optimizada determinando la cantidad de ácidos nucleicos inmovilizados sobre la superficie a diferentes puntos de tiempo. Tiempos de incubación de entre 10 segundos y 30 minutos pueden ser apropiados para los ácidos nucleicos. Posteriormente se añaden los reactivos para llevar a cabo las diferentes etapas de la reacción del bisulfito (o incluso pueden haber estado presentes antes). Después de la incubación o del lavado, los ácidos nucleicos pueden separarse del líquido. Esto puede ser conseguido en general por gravedad o, en el caso práctico de ácidos nucleicos unidos a partículas magnéticas de vidrio, mediante separación del ácido nucleico unido a las partículas magnéticas de vidrio por la aplicación de un campo magnético. Por ejemplo, las partículas magnéticas pueden ser arrastradas hacia la pared del vaso en el que se realizó la incubación. El líquido que contiene los componentes biológicos o los componentes de la reacción que no se unieron a las partículas magnéticas puede ser posteriormente eliminado. El procedimiento de eliminación utilizado depende del tipo de vaso en el que se realice la incubación. Las etapas adecuadas incluyen la eliminación del líquido mediante pipeteo o aspiración. El material con el ácido nucleico unido puede ser entonces lavado al menos una vez, preferiblemente con una mezcla de 70 partes en volumen de etanol con 30 partes en volumen de agua ("etanol al 70%") o en una solución de lavado ácida según está descrito en WO 99/40098. Se utiliza una solución de lavado que no haga que los ácidos nucleicos y el ácido nucleico diana sean liberados de la superficie del material, sino que elimine los contaminantes no deseados tan a fondo como sea posible. Esta etapa de lavado tiene lugar preferiblemente mediante incubación del vidrio o de la sílice con el ácido nucleico unido. El material es preferiblemente resuspendido durante esta etapa. La solución de lavado contaminada es eliminada preferiblemente igual que en la etapa de unión anteriormente descrita. Después de la última etapa de lavado, el material puede ser secado brevemente en vacío, o bien puede dejarse evaporar el fluido. Puede realizarse también una etapa de pretratamiento utilizando acetona.

En una realización de la invención, el ácido nucleico es obtenido de una muestra biológica utilizando las fases sólidas de acuerdo con la invención y métodos conocidos por los expertos en este campo. La muestra biológica comprende células de organismos multicelulares como por ejemplo células humanas y de animales tales como leucocitos, y compuestos químicos de alto y bajo peso molecular inmunológicamente activos tales como haptenos, antígenos, anticuerpos y ácidos nucleicos, plasma sanguíneo, fluido cerebral, esputos, heces, especímenes de biopsia, médula ósea, enjuagues orales, suero sanguíneo, tejidos, orina o mezclas de los mismos. En una realización preferida de la invención la muestra biológica es un fluido del cuerpo humano o animal. Preferiblemente, la muestra biológica es sangre, plasma sanguíneo, suero sanguíneo u orina. El plasma sanguíneo es preferiblemente plasma de sangre tratada con EDTA, heparina o citrato. La muestra biológica que contiene los ácidos nucleicos es lisada para crear una mezcla de compuestos biológicos conteniendo ácidos nucleicos y otros componentes. Los procedimientos para lisar muestras biológicas son conocidos por los expertos y pueden ser de naturaleza química, enzimática o física. Es también aplicable una combinación de estos procedimientos. Por ejemplo, la lisis puede ser realizada utilizando ultrasonidos, presión elevada, fuerzas de cizallamiento, álcalis, detergentes o soluciones salinas caotrópicas, o proteasas o lipasas. Para el procedimiento de lisis con el fin de obtener ácidos nucleicos se hace referencia especial a Sambrook y col.:

Molecular Cloning, A Laboratory Manual, 2ª Edición, Cold Spring Harbour Laboratory Press, Cold Spring Harbour, NY y Ausubel y col.: Current Protocols in Molecular Biology 1987, J. Wiley and Sons, NY. Posteriormente los ácidos nucleicos son aislados de la mezcla de lisis utilizando los métodos y las fases sólidas de acuerdo con la invención y pueden ser posteriormente sometidos a los métodos de acuerdo con la invención, esto es al tratamiento con bisulfito de acuerdo con la invención. Se utilizan también agentes caotrópicos con el fin de lisar las células para preparar una mezcla entre ácidos nucleicos y otras sustancias biológicas (ver por ejemplo Sambrook y col. (1989) o EP 0 389 063). Posteriormente, se añade el material que contiene vidrio o sílice y un efecto de purificación es el resultado del comportamiento del ADN o del ARN para unirse al material con una superficie de vidrio bajo estas condiciones, esto es en presencia de ciertas concentraciones de un agente caotrópico, mayores concentraciones de solventes orgánicos o bajo condiciones ácidas. Por tanto, la presente invención considera también la combinación de las etapas de lisis y la reacción del bisulfito, esto es el ácido nucleico aislado de la mezcla entre ácidos nucleicos y otras sustancias biológicas es sometido directamente al tratamiento con bisulfito, por lo que el ácido nucleico está unido a una fase sólida durante la etapa de desaminación y/o desulfonación. Con más detalle, se proporciona un método para la conversión de una base citosina, preferiblemente de bases citosina, de un ácido nucleico en una base uracilo, preferiblemente en bases uracilo, mediante el cual preferiblemente las bases 5-metil-citosina no son convertidas significativamente ("reacción del bisulfito" o "tratamiento con bisulfito"), por lo que el ácido nucleico es aislado de una mezcla que contiene un ácido nucleico y otros compuestos biológicos mediante la unión del mismo a una fase sólida, preferiblemente a un material que contiene vidrio o sílice, y permanece unido a la fase sólida durante la etapa de desaminación y/o desulfonación de la reacción del bisulfito. Incluso con más detalle, se proporciona un método en el que el ácido nucleico es aislado de una mezcla de un ácido nucleico y otros compuestos biológicos y unido a una fase sólida durante la etapa de desaminación y desulfonación de la reacción del bisulfito, esto es se proporciona un método para la conversión de una base citosina, preferiblemente de bases citosinas, de un ácido nucleico en una base uracilo, preferiblemente en bases uracilo, mediante el cual preferiblemente las bases 5-metil-citosina no son convertidas significativamente ("reacción del bisulfito" o "tratamiento con bisulfito"), que comprende las etapas de

- a) la provisión de una mezcla de un ácido nucleico y otros compuestos biológicos,
- b) la unión del ácido nucleico a una fase sólida, eliminando opcionalmente los demás compuestos biológicos y lavando opcionalmente el ácido nucleico unido a la fase sólida,
- c) la incubación del ácido nucleico unido a la fase sólida en presencia de iones sulfito, mediante lo cual el ácido nucleico es desaminado,
- d) el lavado opcional del ácido nucleico desaminado unido a la fase sólida,
- e) la incubación del ácido nucleico desaminado unido a la fase sólida bajo condiciones alcalinas, mediante lo cual el ácido nucleico es desulfonado,
- f) el lavado opcional del ácido nucleico desaminado y desulfonado unido a la fase sólida, y
- g) la elución opcional del ácido nucleico desaminado y desulfonado de la fase sólida.

En otra realización, se proporciona un método en el que el ácido nucleico es aislado de una mezcla de un ácido nucleico y otros compuestos biológicos y está unido a una fase sólida durante la etapa de desulfonación de la reacción del bisulfito, esto es, se proporciona un método para la conversión de una base citosina, preferiblemente de bases citosina, de un ácido nucleico en una base uracilo, preferiblemente en bases uracilo, mediante el cual preferiblemente las bases 5-metil-citosina no son convertidas significativamente ("reacción del bisulfito" o "tratamiento con bisulfito"), que comprende las etapas de

- a) la provisión de una mezcla de un ácido nucleico y otros compuestos biológicos,
- b) la unión del ácido nucleico a una fase sólida, eliminando opcionalmente los demás compuestos biológicos, lavando opcionalmente el ácido nucleico unido a la fase sólida y eluyendo el ácido nucleico de la fase sólida,
- c) la incubación del ácido nucleico eluido en presencia de iones sulfito, mediante lo cual el ácido nucleico es desaminado,
- d) la unión del ácido nucleico desaminado a una fase sólida,
- e) el lavado opcional del ácido nucleico desaminado unido a la fase sólida,
- f) la incubación del ácido nucleico desaminado unido a la fase sólida bajo condiciones alcalinas, mediante lo cual el ácido nucleico es desulfonado,
- g) el lavado opcional del ácido nucleico desaminado y desulfonado unido a la fase sólida, y
- h) la elución opcional del ácido nucleico desaminado y desulfonado de la fase sólida.

En otra realización de la invención, se proporciona un método en el cual el ácido nucleico es aislado de una mezcla de un ácido nucleico y otros compuestos biológicos y unido a una fase sólida durante la etapa de desaminación de la reacción del bisulfito, esto es, se proporciona un método para la conversión de una base citosina, preferiblemente de bases citosina, de un ácido nucleico en una base uracilo, preferiblemente en bases uracilo, mediante el cual

- a) la provisión de una mezcla de un ácido nucleico y otros compuestos biológicos,
- b) la unión del ácido nucleico a una fase sólida, eliminando opcionalmente los demás compuestos biológicos y lavando opcionalmente el ácido nucleico unido a la fase sólida,
- c) la incubación del ácido nucleico unido a la fase sólida en presencia de iones sulfito, mediante lo cual el ácido nucleico es desaminado,
- d) el lavado opcional del ácido nucleico unido a la fase sólida,
- e) la elución del ácido nucleico desaminado de la fase sólida, y
- f) la incubación del ácido nucleico desaminado bajo condiciones alcalinas, mediante lo cual el ácido nucleico desaminado es desulfonado.

El método preferido de acuerdo con la invención comprende además la etapa de elución a partir de dicha fase sólida del ácido nucleico unido. Posteriormente dicho ácido nucleico puede ser, por ejemplo, amplificado. Para que tenga lugar la elución, el material conteniendo vidrio o sílice (con la superficie de sílice no modificada) es resuspendido en una solución con ninguna o con una pequeña cantidad de un agente caotrópico y/o un solvente orgánico. Alternativamente, la suspensión puede ser diluida con una solución con ninguna o con una pequeña cantidad de un agente caotrópico y/o un solvente orgánico. Tampones de esta naturaleza son conocidos a partir de DE 3724442 y Jakobi y col., *supra*. Los tampones de elución con un bajo contenido en sales son en particular tampones con un contenido menor de 0,2 moles/l. En una realización especialmente preferida, el tampón de elución contiene la sustancia Tris para la amortiguación, en particular una solución tamponada con Tris con un pH alrededor de 7 o por encima de 7. En otra realización especial, el tampón de elución es agua desmineralizada. La solución que contiene el ácido nucleico está ahora lista para ser utilizada en la reacción de amplificación una vez que ha sido eliminada la fase sólida. Por tanto, el ácido nucleico es transferido a un nuevo tubo de reacción que contiene todos los reactivos necesarios para la amplificación. Opcionalmente, una solución conteniendo todos los reactivos necesarios para la amplificación es añadida a la suspensión de la fase sólida y los ácidos nucleicos liberados. En otra realización, una solución conteniendo todos los reactivos necesarios para la amplificación es añadida a la suspensión de la fase sólida y el ácido nucleico unido sin etapa de elución, por lo que se realiza la amplificación del ácido nucleico en la fase sólida.

De acuerdo con la presente invención, para las etapas de lavado y de unión, se utilizan preferiblemente líquidos que sean adecuados para procesos de biología molecular, en particular para procesos de purificación de ácido desoxirribonucleico (ADN) o de ácido ribonucleico (ARN) que utilizan la unión de estas sustancias a una fase sólida, en particular a superficies de sílice o de vidrio, más particularmente a partículas magnéticas de vidrio, bajo ciertas condiciones. Los líquidos preferidos comprenden alcoholes y/o cetonas o cualquier mezcla de los mismos con agua. Los alcoholes incluirán, de acuerdo con la invención, preferiblemente alcoholes primarios, secundarios o terciarios de fórmula general R-OH, en la que R representa la fórmula general $-(CH_2)_n-CH_3$ con $n \geq 0$. Sin embargo, otros alcoholes pueden ser también utilizados sin ser adecuados para biología molecular tales como, por ejemplo, glicerol. Son particularmente adecuados los alcoholes isopropanol, etanol o mezclas de los mismos con agua, preferiblemente una mezcla de 80 partes en volumen de isopropanol con 20 partes en volumen de agua. En otra realización de la invención, el líquido contiene cetonas tales como por ejemplo acetona. Además, se utilizan soluciones acuosas tamponadas adecuadas. Sistemas de tampones que son adecuados para biología molecular pueden encontrarse en, por ejemplo, Sambrook, J. y col., en "Molecular Cloning: A Laboratory Manual" (1989), Eds. J. Sambrook, E.F. Fritsch y T. Maniatis, Cold Spring Harbour Laboratory Press, Cold Spring Harbour, NY. Sustancias tampón preferidas son Tris-hidroximetilamina (TRIS), fosfato, N-(2-hidroxi-etil)piperazina-N'-(2-ácido etanosulfónico) (HEPES), sales de las mismas u otras sustancias adecuadas. Adicionalmente, pueden estar presentes sustancias que modifiquen la fuerza iónica de la solución tales como, por ejemplo, NaCl, KCl o $CaCl_2$, o que sean agentes acomplejantes de cationes metálicos tales como, por ejemplo, ácido etilén-diamino-tetraacético (EDTA) o las sales del mismo.

En una realización preferida de la invención, el ácido nucleico es amplificación con la reacción en cadena de la polimerasa (PCR; EP 0 201 184, EP-A-0 200 362, US 4.683.202). El método de amplificación puede ser también la reacción en cadena de la ligasa (LCR; Wu, D.Y. y Wallace, R.B., Genomics 4 (1989) 560-9 y Barany, F., Proc. Natl. Acad. Sci. USA 88 (1991) 189-93); la Reacción en Cadena de Polimerasa Ligasa (Barany, F., PCR Methods Appl. 1 (1991) 5-16); Gap-LCR (Publicación de Patente PCT N° WO 90/01069); la Reacción de Reparación de la Cadena (Publicación de Patente Europea N° EP 439.182 A2); 3SR (Kwoh, D.Y. y col., Proc. Natl. Acad. Sci. USA 86 (1989) 1173-7; Guatelli, J.C. y col., Proc. Natl. Acad. Sci. USA 87 (1990) 1874-8; Publicación de Patente PCT N° WO 92/0880A), y NASBA (Patente de EE.UU. N° US 5.130.238). Además, están la amplificación por desplazamiento de la cadena (SDA), la amplificación mediada por transcripción (TMA) y la amplificación $Q\beta$ (para una revisión ver por ejemplo Whelen, A.C. y Persing, D.H., Annu. Rev. Microbiol. 50 (1996) 349-73; Abramson, R.D. y Myers, T.W., Curr. Opin. Biotechnol. 4 (1993) 41-7). Métodos de amplificación particularmente preferidos de acuerdo con la

invención son el método de PCR específica de metilación (MSP) descrito en US 5.786.146 que combina el tratamiento con bisulfito y una PCR específica de un alelo (ver por ejemplo US 5.137.806, US 5.595.890, US 5.639.611).

En una realización preferida, el método puede comprender además la etapa de detección del ácido nucleico amplificado. El ácido nucleico amplificado puede ser determinado o detectado mediante métodos analíticos estándar conocidos por las personas expertas en la técnica y descritos en, por ejemplo, Sambrook, y col., *Molecular Cloning*, Cold Spring Harbor University Press (1989), Lottspeich y Zorbas, en *"Bioanalytik"* (1998), Eds. L.A. Zorbas, Spektrum Akademischer Verlag, Heidelberg, Berlin, Alemania o en Ausubel, F. y col., en *"Current protocols in molecular biology"* (1994), Eds. F. Ausubel, R. Brent y K.R.E. Wiley & Sons, Verlag, New York. Puede haber también etapas de purificación adicionales antes de que el ácido nucleico diana sea detectado, por ejemplo una etapa de precipitación. Los métodos de detección pueden incluir, pero no se limitan a, la unión o el intercalado de colorantes específicos tales como el bromuro de etidio que se intercala en el ADN bicatenario y después de lo cual cambia su fluorescencia. Los ácidos nucleicos purificados pueden ser también separados por métodos electroforéticos opcionalmente después de una digestión de restricción y visualizados posteriormente. Existen también ensayos basados en sondas que aprovechan la hibridación de oligonucleótidos a secuencias específicas y la detección posterior del híbrido. Es posible también secuenciar el ácido nucleico diana después de etapas adicionales conocidas por los expertos en este campo. Otros métodos aplican una diversidad de secuencias de ácido nucleico a un chip de silicio al cual se unen sondas específicas y producen una señal cuando se unen secuencias complementarias.

En una realización particularmente preferida de la invención, el ácido nucleico es detectado midiendo la intensidad de la luz de fluorescencia durante la amplificación. Este método supone la monitorización de la fluorescencia en tiempo real. Un método particularmente preferido que aprovecha la amplificación y la detección simultáneas midiendo la intensidad de la luz fluorescente es el método TaqMan® descrito en WO 92/02638 y en las patentes de EE.UU. correspondientes US 5.210.015, US 5.804.375, US 5.487.972. Este método aprovecha la actividad exonucleasa de una polimerasa para generar una señal. Con más detalle, el ácido nucleico es detectado por un proceso que comprende la puesta en contacto de la muestra con un oligonucleótido que contiene una secuencia complementaria a una región del ácido nucleico diana y un oligonucleótido marcado que contiene una secuencia complementaria a una segunda región de la misma hebra del ácido nucleico diana, pero no incluye la secuencia de ácido nucleico definida por el primer oligonucleótido, para crear una mezcla de dúplices durante las condiciones de hibridación, donde los dúplices contienen el ácido nucleico diana hibridado al primer oligonucleótido y al oligonucleótido marcado, de tal manera que el extremo 3' del primer oligonucleótido es adyacente al extremo 5' del oligonucleótido marcado. Posteriormente esta mezcla es tratada con una polimerasa de ácido nucleico dependiente del molde que posee actividad nucleasa de 5' a 3' bajo condiciones suficientes para permitir que la actividad nucleasa de 5' a 3' de la polimerasa corte el oligonucleótido hibridado marcado y libere fragmentos marcados. La señal generada por la hidrólisis del oligonucleótido marcado es detectada y/o medida. La tecnología TaqMan® elimina la necesidad de que se forme un complejo de reacción unido a una fase sólida y se convierta en detectable. En términos más generales, la reacción de amplificación y/o detección del método de acuerdo con la invención es un ensayo en fase de solución homogénea. Métodos adicionales preferidos son los formatos utilizados en el instrumento LightCycler® (ver por ejemplo US 6.174.670). Es particularmente preferida la utilización de un tratamiento con bisulfito, la amplificación con o sin cebadores específicos de metilación en presencia de una sonda específica de metilación y la detección de fluorescencia en tiempo real, según está descrito en US 6.331.393.

En una realización preferida de la presente invención, el método es automatizado, esto es el método lleva a cabo un proceso susceptible de ser automatizado como el descrito, por ejemplo, en WO 99/16781. Un proceso susceptible de ser automatizado significa que las etapas del proceso son adecuadas para ser llevadas a cabo con un aparato o una máquina capaz de funcionar con poco o ningún control o influencia externos por un ser humano. Un método automatizado significa que las etapas del método susceptible de ser automatizado son llevadas a cabo con un aparato o una máquina capaz de funcionar con poco o ningún control o influencia externos por un ser humano. Únicamente las etapas de preparación del método pueden tener que ser realizadas manualmente, por ejemplo los recipientes de almacenamiento tienen que ser llenados y colocados en su lugar, la elección de las muestras tiene que ser realizada por un ser humano y las etapas posteriores conocidas por los expertos en este campo, por ejemplo el manejo del ordenador de control. El aparato o la máquina pueden, por ejemplo, añadir líquidos automáticamente, mezclar las muestras o llevar a cabo las etapas de incubación a temperaturas específicas. Típicamente, tal máquina o aparato es un robot controlado por un ordenador que realiza un programa en el cual las etapas y los comandos individuales están especificados. En una realización preferida de la invención, el método está en un formato de alto rendimiento, esto es los métodos automatizados se llevan a cabo en un formato de alto rendimiento, lo cual significa que los métodos y la máquina o el aparato utilizados están optimizados para un número elevado de muestras en un tiempo corto.

Preferiblemente, el método de acuerdo con la invención es utilizado en diagnóstico, para análisis de diagnóstico o para bioanalítica, o bien para someter a selección tejidos o fluidos del cuerpo humano o incluso del cuerpo de animales por la presencia de cierto patrón de metilación. Además, el método de acuerdo con la invención es utilizado para incrementar la velocidad, la precisión o la sensibilidad de la detección de lugares de metilación en ácidos nucleicos.

En una realización preferida, la presente invención está dirigida a la utilización de una fase sólida en la etapa de desaminación y/o desulfonación de una reacción en la que una base citosina, preferiblemente bases citosina, de un ácido nucleico es convertida en una base uracilo, preferiblemente en bases uracilo, en presencia de iones bisulfito, por la que preferiblemente las bases 5-metil-citosina no son convertidas significativamente ("reacción de bisulfito"). En una realización preferida, la presente invención está dirigida a la utilización de una fase sólida en la etapa de desaminación y/o desulfonación de una reacción en la que una base citosina, preferiblemente bases citosina, de un

ácido nucleico es convertida en una base uracilo, preferiblemente en bases uracilo, en presencia de iones bisulfito, por la que preferiblemente las bases 5-metil-citosina no son convertidas significativamente. Más particularmente, esto significa que la fase sólida es utilizada para unir el ácido nucleico durante la etapa de desaminación y/o desulfonación de la reacción del bisulfito, esto es, el ácido nucleico está unido a la fase sólida durante la etapa de desaminación y/o desulfonación de la reacción del bisulfito. Preferiblemente, la fase sólida es un material que comprende sílice o vidrio. Más preferiblemente, la fase sólida es lana de vidrio o una membrana de vidrio. En la realización más preferida, la fase sólida es una partícula magnética de vidrio.

En otra realización preferida, la presente invención está dirigida a un kit para llevar a cabo una reacción de bisulfito, que comprende una solución conteniendo iones bisulfito y una fase sólida. En una realización preferida, la fase sólida es un material conteniendo sílice o vidrio. En una realización más preferida, la fase sólida es lana de vidrio o una membrana de vidrio. En la realización más preferida, la fase sólida es una partícula magnética de vidrio. En otra realización de la invención, se proporciona un kit de partes que comprende un recipiente de almacenamiento conteniendo las partículas magnéticas de vidrio o una suspensión de las mismas de acuerdo con la presente invención. Tales kits conocidos en la técnica contienen además material de plástico que puede ser utilizado durante el procedimiento del bisulfito tal como, por ejemplo, placas de microvaloración en el formato de 96 ó 384 pocillos o tubos de reacción fabricados por, por ejemplo, Eppendorf, Hamburg, Alemania. El kit puede contener además una solución de lavado que sea adecuada para la etapa de lavado de la fase sólida, en particular de la lana o la membrana de vidrio o de las partículas magnéticas de vidrio. A menudo la solución de lavado es proporcionada como una solución madre que tiene que ser diluida antes de su utilización. El kit puede contener además un eluyente, esto es una solución o un tampón (por ejemplo TE, Tris 10 mM, EDTA 1 mM, pH 8,0) o agua pura para eluir el ADN o el ARN unido a la fase sólida. Además, pueden estar presentes reactivos adicionales que contengan tampones adecuados para ser utilizados en la presente invención. Preferiblemente, el kit de acuerdo con la invención es utilizado para una reacción en la que una base citosina, preferiblemente bases citosina, de un ácido nucleico es convertida en una base uracilo, preferiblemente en bases uracilo, en presencia de iones bisulfito, mediante la cual preferiblemente las bases 5-metil-citosina no son convertidas significativamente.

1.1 Ejemplos

1. Ejemplo 1

Establecimiento de una LC-PCR Específica para ADN tratado con Bisulfito

1.1 General

El hecho de que la reacción de bisulfito haya funcionado y convertido las citosinas no metiladas en uracilo, puede ser demostrado por una reacción en cadena de la polimerasa en la cual se utilizan cebadores que son específicos para una región de la secuencia del ácido nucleico en la que citosinas no metiladas han sido convertidas en uracilos, esto es la base adenina del cebador está opuesta al uracilo que es el producto de la reacción del bisulfito a partir de las citosinas no metiladas. En el caso de una conversión incompleta, el cebador no podría hibridarse con esta región ya que habría citosinas que no se aparearían con las bases adenina del cebador. Esto tendría el efecto de no se obtendría ningún producto de la PCR.

Un método mejorado para realizar reacciones en cadena de la polimerasa rápidas está descrito en, por ejemplo, US 6.174.670 y es utilizado en el instrumento LightCycler® (Roche, Mannheim, Alemania). En este método, dos sondas marcadas pueden aproximarse estrechamente de manera dependiente del amplificado, de tal manera que las dos marcas puedan llevar a cabo una transferencia de energía de fluorescencia (FRET). La cantidad de amplificado se correlaciona por ello con la intensidad de la luz emitida de una cierta longitud de onda. Este método de PCR específica puede ser utilizado por tanto para analizar si se ha obtenido una conversión completa de las citosinas no metiladas, analizando por ejemplo la región promotora del gen de la glutation-S-transferasa π (ver por ejemplo la SEC ID N°: 1 para la secuencia de longitud completa de este gen y del promotor, US 5.552.277, código de acceso del Genbank M24485 y Morrow y col. (1989) Gene 75, 3-11) utilizando sondas y cebadores adecuados. Sin embargo, los expertos en la técnica saben que pueden utilizarse también otros métodos para esta evaluación. Las medidas de la fluorescencia son normalizadas dividiendo por la medida de la fluorescencia inicial, esto es por la fluorescencia de fondo, obtenida durante un ciclo temprano de la reacción mientras las medidas de la fluorescencia entre los ciclos parecen ser relativamente constantes. El número de ciclos elegido para la medida de la fluorescencia inicial es el mismo para todas las reacciones comparadas, de tal manera que todas las medidas representan incrementos relativos al mismo ciclo de reacción. En los ciclos tempranos de una amplificación por la reacción en cadena de la polimerasa, el número de moléculas diana puede ser descrito por la ecuación geométrica $N_i = N_0 \times (1 + E)^i$, donde N_0 = número de moléculas diana al inicio de la reacción, N_i = número de moléculas diana al finalizar el ciclo i^o , E = eficacia de la amplificación ($0 \leq E \leq 1$). Durante esta fase de crecimiento geométrico de la amplificación, el número de ciclos requeridos para alcanzar un valor umbral particular (valor de C_T o punto de cruce) es inversamente proporcional al logaritmo de $(1 + E)$. Por tanto, el valor de C_T representa una medida de la eficacia de la reacción que permite comparaciones entre reacciones. Una disminución del valor de C_T , que significa que la reacción alcanzó el valor umbral en menos ciclos, indica un incremento de la eficacia de la reacción. Como el incremento del producto de la amplificación es monitorizado midiendo el incremento de la fluorescencia de la reacción, se define C_T en la presente como el número de ciclos de amplificación llevados a cabo hasta que la fluorescencia exceda un nivel de fluorescencia arbitrario (AFL). El AFL fue elegido próximo al nivel de fluorescencia basal, pero por encima del rango de las fluctuaciones aleatorias

ES 2 294 231 T3

de la fluorescencia medida, de tal manera que la cinética de la reacción fue medida durante la fase de crecimiento geométrico de la amplificación. La acumulación del producto amplificado en los ciclos más tardíos inhibe la reacción y da lugar finalmente a una meseta de la reacción. Se eligió un AFL de 1,5 para todas las reacciones. Como una amplificación por PCR consta de ciclos discretos y las medidas de la fluorescencia se llevan a cabo una vez por ciclo, la fluorescencia medida aumenta típicamente desde por debajo del AFL hasta por encima del AFL en un único ciclo. Con el fin de mejorar la precisión de las medidas, se calculó un número “exacto” de ciclos para alcanzar el umbral de AFL, referido en la presente como valor de C_T o punto de cruce, interpolando las medidas de la fluorescencia entre ciclos.

1.2 Metodología General

El experimento siguiente demuestra que la PCR descrita en el instrumento LightCycler® puede ser utilizada como herramienta de evaluación del ADN tratado con bisulfito. Muestra que la combinación cebador/sonda diseñada da resultados positivos únicamente con ADN después del tratamiento con bisulfito. El ADN tratado con bisulfito (en este caso el ADN fue tratado con bisulfito de acuerdo con el protocolo descrito en el Ejemplo 2) y el ADN no tratado fueron amplificados en paralelo utilizando las mismas concentraciones de molde (20 ng y 1 ng por PCR).

1.3 Análisis Mediante PCR en el Instrumento LightCycler®

1.3.1 Composición de la Mezcla Matriz

Sonda de hibridación “LC FastStart DNA Master Hybridation Probe” 1x, $MgCl_2$ 2 mM, cebador directo 0,5 μM , cebador inverso 0,5 μM , sonda donante 250 nM, sonda aceptora 250 nM, molde 10 μl , volumen total de la PCR 20 μl .

1.3.2 Condiciones de la PCR

Desnaturalización 10 minutos/95°C

55 ciclos 95°C/10 segundos

65°C/10 segundos - adquisición de la señal

72°C/10 segundos - Incremento gradual de la temperatura 20°C/segundo

1.4 Resultado

ADNM/PCR	Tratamiento con Bisulfito	Calor de C_T o Punto de Cruce
20 ng	Si	30,55
		29,72
		29,95
		30,06
1 ng	Si	34,7
		35,8
		34,07
		33,86
20 ng	No	Sin curva de crecimiento
		Sin curva de crecimiento
		Sin curva de crecimiento
		Sin curva de crecimiento
1 ng	No	Sin curva de crecimiento
		Sin curva de crecimiento
		Sin curva de crecimiento
		Sin curva de crecimiento

ES 2 294 231 T3

El resultado muestra puntos de cruce únicamente para el ADN tratado con bisulfito. Por tanto, esta PCR es adecuada para evaluar los métodos del bisulfito. Para los expertos en la técnica está claro que podría utilizarse cualquier PCR como herramienta de evaluación si se garantiza que la combinación cebador/sonda no reacciona con el ADN antes del tratamiento con bisulfito.

2. Ejemplo 2

Reacción del Bisulfito Utilizando Partículas Magnéticas de Vidrio (MGPs)

2.1.1 Desnaturalización del ADN

Cien microlitros de la dilución del ADN metilado (Intergen, distribuido por Serologicals Corporation, Norcross, GA, EE.UU.; Cat S7821) (30 ng y 6 ng/ensayo añadidos a 1000 ng de hADN de fondo, catálogo de Roche 1691112; 10 replicados por concentración), y 12 μ l de NaOH 2 M son mezclados e incubados durante 15 minutos a 37°C.

2.1.2 Desaminación del ADN

Se mezclan 112 μ l del ADN desnaturalizado con 200 μ l de reactivo bisulfito (bisulfito de sodio 2,5 M, hidroquinona 125 mM, pH 5,0) y se incuban durante 16 horas a 50°C.

2.2 Procesamiento Utilizando MGPs

Se mezclan 312 μ l del ADN desaminado con 600 μ l de tampón de unión (kit de aislamiento de ADN “MagNAPure DNA Isolation Kit I”, Roche, N° de Catálogo 3 003 990) y 75 μ l de una solución de partículas magnéticas de vidrio (MagNAPure DNA Isolation Kit I) y se incuban durante 15 minutos a temperatura ambiente con mezclado continuo. Posteriormente, las partículas magnéticas de vidrio son lavadas tres veces con 1 ml de etanol al 70%. La separación del ADN unido y el libre se realiza con un separador magnético (Catálogo de Roche 1641794). Posteriormente, tiene lugar la desulfonación por la adición de 250 μ l de EtOH al 90%/NaOH 20 mM al ADN unido a las MGPs; la mezcla es incubada durante 10 minutos a temperatura ambiente con mezclado. Posteriormente las MGPs son lavadas dos veces con etanol al 90%. Para eliminar los restos de etanol las MGPs fueron calentadas durante 15 minutos/60°C en un termomezclador con la tapa abierta. Posteriormente el ADN es eluido con 50 μ l de Tris 10 mM/EDTA 0,1 mM pH 7,5 (15 minutos/60°C). Se utilizan 10 μ l del ADN eluido para el análisis mediante PCR posterior.

2.3 Tratamiento con Bisulfito Utilizando el Kit de Intergen

Se trataron 30 ng y 6 ng de ADN metilado (Intergen, distribuido por Serologicals Corporation, Norcross, GA, EE.UU.; Cat S7821) (10 replicados por concentración) de acuerdo con el método descrito en el prospecto del paquete del kit de Intergen “CpGenome DNA Modification Kit” (Intergen, distribuido por Serologicals Corporation, Norcross, GA, EE.UU.; Cat S7820). Se utilizan 10 μ l del ADN eluido para el análisis mediante PCR posterior.

2.4 Detección del ADN Tratado con Bisulfito Mediante la Utilización de una PCR Específica en el Instrumento LightCycler® (Formato Hyprobe)

2.4.1 Composición de la Mezcla Matriz

Sonda de hibridación “LightCycler® FastStart DNA Master Hybridization Probe” 1x (Roche 2239272), MgCl₂ 2 mM, cebador directo 0,5 μ M, cebador inverso 0,5 μ M, sonda donante 250 nM, sonda aceptora 250 nM, molde 10 μ l, volumen total de la PCR 20 μ l.

2.4.2 Condiciones de la PCR

Desnaturalización 10 minutos/95°C

55 ciclos 95°C/10 segundos

65°C/10 segundos - adquisición de la señal

72°C/10 segundos - Incremento gradual de la temperatura 20°C/segundo

Las muestras procedentes del tratamiento con bisulfito de MGP y del tratamiento con bisulfito de Intergen fueron procesadas en paralelo en el mismo proceso en el instrumento LightCycler®.

ES 2 294 231 T3

2.4.3 Resultados

Replicados	ADN metilado por		Método del bisulfito utilizado	
	Bisulfito	PCR	Intergen	Método de MGP
			Valores de C _T o Puntos de Cruce	
1	30 ng	6 ng	29,90	30,46
2			30,07	29,86
3			30,07	30,44
4			30,14	30,35
5			30,22	30,24
6			30,26	30,46
7			30,31	30,50
8			30,19	30,54
9			30,03	30,17
10			29,85	30,69
1	6 ng	1,2 ng	32,49	32,14
2			32,67	32,60
3			32,29	32,83
4			32,87	32,53
5			32,15	32,90
6			32,23	32,77
7			32,59	32,73
8			32,91	33,09
9			32,46	32,88
10			33,17	32,83

Los valores de C_T o puntos de cruce calculados durante la PCR en tiempo real son casi idénticos para los dos métodos del bisulfito utilizados, esto es, el funcionamiento de los métodos es el mismo.

3. Ejemplo 3

Reacción del Bisulfito Automatizada Utilizando MGPs

3.1 Realización de la Reacción del Bisulfito

3.1.1 Desnaturalización del ADN

Se mezclan y se incuban durante 10 minutos a 37°C 20 µl de la dilución de ADN metilado (Intergen, distribuido por Serologicals Corporation, Norcross, GA, EE.UU.; Cat S7821) (50 ng/ensayo), 4 µl de una solución de Poli(dA) (concentración 250 ng/µl) y 2,6 µl de NaOH 2 M.

3.1.2 Desaminación del ADN

Se mezclan 26 µl del ADN desnaturalizado con 220 µl de reactivo de bisulfito (bisulfito de sodio 2,5 M, hidroquinona 125 mM, pH 5,0) y se incuban durante 4 horas a 50°C.

ES 2 294 231 T3

3.1.3 Procesamiento Automatizado Utilizando el Instrumento LC MagNAPure

Se mezclan 250 μ l del ADN desaminado con 600 μ l de tampón de unión (kit de aislamiento de ADN “MagNAPure DNA Isolation Kit I”, Roche, Mannheim, Alemania) y 75 μ l de la solución de partículas magnéticas de vidrio (kit de aislamiento de ADN “MagNAPure DNA Isolation Kit I”, Roche, Mannheim, Alemania) y se incuban durante 15 minutos/temperatura ambiente con mezclado continuo. Posteriormente, las partículas magnéticas de vidrio son lavadas tres veces con 1 ml de Etanol al 70%. Posteriormente, tiene lugar la desulfonación por la adición al ADN unido a las MGP de 250 μ l de EtOH 90%/NaOH 20 mM; la mezcla es incubada durante 10 minutos a temperatura ambiente con mezclado. Posteriormente, las MGPs son lavadas dos veces con etanol al 90% y eluidas con 50 μ l de Tris 10 mM/EDTA 0,1 mM pH 7,5 (7 minutos, 180°C).

3.1.4 Detección del ADN Tratado con Bisulfito Mediante la Utilización de una PCR Específica en el Instrumento LightCycler® (Formato Hyprobe)

3.1.4.1 Composición de la Mezcla Matriz

Sonda de hibridación “LightCycler® FastStart DNA Master Hybridation Probe” 1x, MgCl₂ 2 mM, cebador directo 0,5 μ M, cebador inverso 0,5 μ M, sonda donante 250 nM, sonda aceptora 250 nM, molde 5 μ l, volumen total de la PCR 20 μ l.

3.1.4.2 Condiciones de la PCR

Desnaturalización 10 minutos/95°C

55 ciclos 95°C/10 segundos

65°C/10 segundos - adquisición de la señal

72°C/10 segundos - Incremento gradual de la temperatura 20°C/segundo

3.1.4.3 Resultados

Molde	ng de ADN	ng de ADN	
	por ensayo de bisulfito	por PCR	Punto de cruce
ADN Metilado Univers.	100	10	33,97
			36,66
ADN Metilado Univers.	50	5	35,66
			35,82
			37,67
			38,37
ADN Metilado Univers.	10	1	37,82
			39,89
			38,76
			39,85

Los resultados muestran los puntos de cruce para concentración utilizada. Esto indica que el tratamiento con bisulfito automatizado tuvo éxito.

4. Ejemplo 4

Realización de las Reacciones del Bisulfito Utilizando Lana de Vidrio

4.1 Desnaturalización del ADN

Se mezclan 100 μ l de la dilución de ADN metilado (Intergen, distribuido por Serologicals Corporation, Norcross, GA, EE.UU.; Cat S7821) (30 ng y 6 ng/ensayo, 10 replicados por concentración) con 12 μ l de NaOH 2 M y se incuban durante 15 minutos a 37°C.

ES 2 294 231 T3

4.2 Desaminación del ADN

Se incuban 112 μ l del ADN desnaturalizado con 200 μ l de reactivo de bisulfito (bisulfito de sodio 2,5 M, hidroquinona 125 mM, pH 5,0) durante 16 horas/50°C con mezclado continuo.

4.3 Procesamiento del ADN Desaminado con el Kit "High Pure PCR Template Preparation Kit" (Catálogo de Roche I 796 828)

- Se mezclan 312 μ l de ADN desaminado con 200 μ l del tampón de unión del kit y 100 μ l de isopropanol, y se pipetea todo ello sobre la columna que contiene la lana de vidrio. La columna es posteriormente centrifugada en una centrifuga de sobremesa Eppendorf (1 minuto/8000 rpm).
- Posteriormente, las columnas son lavadas tres veces cada una con 500 μ l de etanol al 80% (centrifugación 10 segundos/12000 rpm).
- Para la desulfonación, se añaden a las columnas μ l del reactivo (etanol 38%/NaCl 100 mM/NaOH 200 mM). Después de una incubación de 5 minutos/temperatura ambiente, se centrifuga 1 minuto/800 rpm.
- Posteriormente, las columnas son lavadas dos veces cada una con 500 μ l de etanol 80% (centrifugación 10 segundos/12000 rpm).
- Finalmente, el ADN unido es eluido por la adición de 50 μ l de tampón de elución (Tris 10 mM/EDTA 0,1 mM, pH 7,5) precalentado (70°C) y centrifugación durante 1 minuto/800 rpm.

4.4 Detección del ADN Tratado con Bisulfito Mediante la Utilización de una PCR Específica en el Instrumento LightCycler® (Formato Hyprobe)

4.4.1 Composición de la Mezcla Matriz

Sonda de hibridación "LightCycler® FastStart DNA Master Hybridation Probe" 1x (Roche 2239272), MgCl₂ 2 mM, cebador directo 0,5 μ M, cebador inverso 0,5 μ M, sonda donante 250 nM, sonda aceptora 250 nM, molde 10 μ l, volumen total de la PCR 20 μ l.

4.4.2 Condiciones de la PCR

Desnaturalización 10 minutos/95°C

55 ciclos 95°C/10 segundos

65°C/10 segundos - adquisición de la señal

72°C/10 segundos - Incremento gradual de la temperatura 20°C/segundo

4.4.3 Resultados

ADN metilado por		Valores de C _T o Puntos de Cruce	ADN metilado por		Valores de C _T o Puntos de Cruce
Ensayo de Bisulfito	PCR		Ensayo de Bisulfito	PCR	
30 ng	6 ng	32,27	6 ng	1,2 ng	34,28
		32,01			35,70
		31,89			35,52
		33,23			36,23
		32,18			35,05
		32,63			35,60
		32,65			34,75
		32,26			34,86
		32,00			34,80
		31,84			34,93

ES 2 294 231 T3

El resultado muestra los puntos de cruce para cada concentración utilizada. Esto indica que el tratamiento con bisulfito utilizando lana de vidrio tuvo éxito.

5. Ejemplo 5

Realización de la Reacción del Bisulfito en una Fase Sólida de Lana de Vidrio

5.1 Unión del ADN a la Lana de Vidrio

Se mezclan 100 μ l de ADN (conteniendo una mezcla de 1 μ g de hADN (Roche) y 100 ng de ADN metilado (Intergen, distribuido por Serologicals Corporation, Norcross, GA, EE.UU.; Cat S7821) con 200 μ l de tampón de unión ("High Pure PCR Template Preparation Kit", Catálogo de Roche 1796828) y 100 μ l de isopropanol. La mezcla es pipeteada sobre la columna del kit. La columna es posteriormente centrifugada en una centrífuga de sobremesa Eppendorf (1 minuto/8000 rpm). La lana de vidrio es lavada dos veces con el tampón de lavado del kit (500 μ l por etapa de lavado).

5.2 Desnaturalización del ADN Unido a la Lana de Vidrio

La desnaturalización tiene lugar mediante el pipeteo de 200 μ l de EtOH 38%/NaOH 100 mM/NaCl 200 mM sobre la lana de vidrio y la incubación de ambos durante 10 minutos a temperatura ambiente.

Posteriormente, la lana de vidrio es lavada una vez con 500 μ l del tampón de lavado del kit.

5.3 Desaminación del ADN Unido a la Lana de Vidrio

Se pipetea 200 μ l de solución de desaminación (urea 6,25 M/bisulfito de sodio 2 M/pH 5,0) sobre la lana de vidrio que tiene el ADN seguido por incubación a 50°C durante 16 horas en un baño de agua.

Posteriormente, se retira el reactivo de desaminación y se lava la lana de vidrio dos veces con 500 μ l cada vez del tampón de lavado del kit.

5.4 Desulfonación del ADN Desaminado Unido a la Lana de Vidrio

Para la desulfonación, se añaden a las columnas 250 μ l de reactivo (etanol 90%/NaOH 20 mM). Después de una incubación de 15 minutos/temperatura ambiente las columnas son centrifugadas 1 minuto/8000 rpm. Posteriormente, las columnas son lavadas dos veces con 500 μ l cada vez de etanol al 80% (centrifugación 10 segundos/12000 rpm).

5.5 Elución del ADN

Finalmente, el ADN unido es eluido por la adición de 50 μ l de tampón de elución (Tris 10 mM/EDTA 0,1 mM, pH 7,5) precalentado (70°C) y centrifugación durante 1 minuto/8000 rpm.

5.6 Detección del ADN Tratado con Bisulfito Mediante la Utilización de una PCR Específica en el Instrumento LightCycler® (Formato Hyprobe)

5.6.1 Composición de la Mezcla Matriz

Sonda de hibridación "LightCycler® FastStart DNA Master Hybridation Probe" 1x (Roche 2239272), MgCl₂ 2 mM, cebador directo 0,5 μ M, cebador inverso 0,5 μ M, sonda donante 250 nM, sonda aceptora 250 nM, molde 10 μ l, volumen total de la PCR 20 μ l.

5.6.2 Condiciones de la PCR

Desnaturalización 10 minutos/95°C

55 55 ciclos 95°C/10 segundos

65°C/10 segundos - adquisición de la señal

60 72°C/10 segundos - Incremento gradual de la temperatura 20°C/segundo

ES 2 294 231 T3

5.6.3 Resultado

Número de la muestra	ADN metilado por PCR	Punto de Cruce
1	20 ng	34,90
2	20 ng	35,27
3	20 ng	36,09
4	20 ng	36,80

En cada reacción se detectó una curva de crecimiento y se calculó el punto de cruce. Este resultado muestra que la desaminación y la desulfonación sobre la fase sólida de lana de vidrio son factibles.

Lista de referencias

Abramson, R.D. y Myers, T.W., *Curr. Opin. Biotechnol.* 4 (1993) 41-7.

Alderton, R.P. y col., *Anal. Biochem.* 201 (1992) 166-9.

Ausubel, F. y col., en "Current protocols in molecular biology" (1994), Eds. F. Ausubel, R. Brent y K.R.E., Wiley & Sons, Verlag, New York.

Barany, F., *PCR Methods Appl.* 1 (1991) 5-16.

Barany, F., *Proc. Natl. Acad. Sci. USA* 88 (1991) 189-93.

Benyajati, C. y col., *Nucleic Acids Res.* 8 (1980) 5649-67.

Braunauer, en "The Adsorption of Gases and Vapors" (1943), Princeton University Press.

Clark, S.J. y col., *Nucleic Acids Res.* 22 (1994) 2990-7.

DE 3724442.

DE-A 37 34 442.

EP 0 200 362.

EP 0 201 184.

EP 0 389 063.

EP 0 439 182.

Feil, R. y col., *Nucleic Acids Res.* 22 (1994) 695-6.

Frommer, M. y col., *Proc. Natl. Acad. Sci. USA* 89 (1992) 1827-31.

GB 91/00212.

Grigg, G. y Clark, S., *Bioessays* 16 (1994) 431-6.

Grigg, G.W., *DNA Seq.* 6 (1996) 189-98.

Grunau, C. y col., *Nucleic Acids Res.* 29 (2001) E65-5.

Guatelli, J.C. y col., *Proc. Natl. Acad. Sci. USA* 87 (1990) 1874-8.

Jakobi, R. y col., *Anal. Biochem.* 175 (1988) 196-201.

Komiyama, M. y Oshima, S., *Tetrahedron Letters* 35 (1994) 8185-8188.

Kwoh, D.Y. y col., *Proc. Natl. Acad. Sci. USA* 86 (1989) 1173-7.

ES 2 294 231 T3

Lottspeich y Zorbas, en “Bioanalytik” (1998), Eds. L.A. **Zorbas**, *Spektrum Akademischer Verlag*, Heidelberg, Berlin, Alemania.

Marko, M.A. y col., *Anal. Biochem.* 121 (1982) 382-7.

Morrow, C.S. y col., *Gene* 75 (1989) 3-11.

Oakeley, E.J., *Pharmacol. Ther.* 84 (1999) 389-400.

Olek, A. y col., *Nucleic Acids Res.* 24 (1996) 5064-6.

Paulin, R. y col., *Nucleic Acids Res.* 26 (1998) 5009-10.

Raizis, A.M. y col., *Anal. Biochem.* 226 (1995) 161-6.

Sambrook, J. y col., en “Molecular Cloning: A Laboratory Manual” (1989), Eds. J. **Sambrook**, E.F. **Fritsch** y T. **Maniatis**, Cold Spring Harbour Laboratory Press, *Cold Spring Harbour*, NY.

Spray Drying Handbook (1991), John Wiley & Sons, New York.

US 4.683.202.

US 5.130.238.

US 5.137.806.

US 5.210.015.

US 5.234.809.

US 5.487.972.

US 5.552.277.

US 5.595.890.

US 5.639.611.

US 5.786.146.

US 5.804.375.

US 6.174.670.

US 6.331.393.

Vogelstein, B. y **Gillespie**, D., *Proc. Natl. Acad. Sci. USA* 76 (1979) 615-9.

Warnecke, P.M. y col., *Methods* 27 (2002) 101-7.

Whelen, A.C. y **Persing**, D.H., *Annu. Rev. Microbiol.* 50 (1996) 349-73.

WO 00/32762.

WO 00/37291.

WO 01/37291.

WO 01/98528.

WO 02/31186.

WO 90/01069.

WO 90/06045.

WO 92/02638.

ES 2 294 231 T3

WO 92/0880A.

WO 96/41811 1.

5 WO 99/16781.

WO 99/40098.

10 **Wu**, D.Y. y **Wallace**, R.B., *Genomics* 4 (1989) 560-9.

15

20

25

30

35

40

45

50

55

60

65

REIVINDICACIONES

1. Método para la conversión de una base citosina de un ácido nucleico en una base uracilo mediante el tratamiento con bisulfito **caracterizado** porque el ácido nucleico está unido a una fase sólida durante las etapas de desaminación y/o desulfonación,

caracterizado porque la fase sólida es seleccionada de vidrio o sílice, un material conteniendo vidrio o sílice, un intercambiador de iones o hidroxipatita.

2. Método para la conversión de la base citosina de un ácido nucleico en una base uracilo de acuerdo con la reivindicación 1, que comprende las etapas de

a) unión del ácido nucleico a una fase sólida,

b) incubación del ácido nucleico unido a la fase sólida en presencia de iones sulfito, mediante lo cual el ácido nucleico es desaminado,

c) lavado opcional del ácido nucleico desaminado unido a la fase sólida,

d) incubación del ácido nucleico desaminado unido a la fase sólida bajo condiciones alcalinas, mediante lo cual el ácido nucleico desaminado es desulfonado,

e) lavado opcional del ácido nucleico desaminado y desulfonado unido a la fase sólida y

f) elución opcional del ácido nucleico desaminado y desulfonado de la fase sólida.

3. Método para la conversión de una base citosina de un ácido nucleico en una base uracilo de acuerdo con la reivindicación 1, que comprende las etapas de

a) incubación del ácido nucleico en presencia de iones sulfito, mediante lo cual el ácido nucleico es desaminado,

b) unión del ácido nucleico desaminado a una fase sólida,

c) lavado opcional del ácido nucleico desaminado unido a la fase sólida,

d) incubación del ácido nucleico desaminado unido a la fase sólida bajo condiciones alcalinas, mediante lo cual el ácido nucleico desaminado es desulfonado,

e) lavado opcional del ácido nucleico desaminado y desulfonado unido a la fase sólida y

f) elución opcional del ácido nucleico desaminado y desulfonado a partir de la fase sólida.

4. Método para la conversión de una base citosina de un ácido nucleico en una base uracilo de acuerdo con la reivindicación 1, que comprende las etapas de

a) unión del ácido nucleico a una fase sólida,

b) incubación del ácido nucleico unido a la fase sólida en presencia de iones sulfito, mediante lo cual el ácido nucleico es desaminado,

c) lavado opcional del ácido nucleico unido a la fase sólida,

d) elución del ácido nucleico desaminado a partir de la fase sólida y

e) incubación del ácido nucleico desaminado bajo condiciones alcalinas, mediante lo cual el ácido nucleico desaminado es desulfonado.

5. El método de acuerdo con la reivindicación 1, **caracterizado** porque la fase sólida es lana de vidrio o una membrana de vidrio.

6. El método de acuerdo con la reivindicación 1, **caracterizado** porque la fase sólida es una partícula magnética de vidrio.

7. El método de acuerdo con la reivindicación 6, **caracterizado** porque la partícula magnética de vidrio tiene un diámetro medio entre 0,5 μm y 5 μm .

ES 2 294 231 T3

8. El método de acuerdo con la reivindicación 6 ó 7, **caracterizado** porque la partícula magnética de vidrio contiene un objeto magnético con un diámetro entre 5 y 500 nm.

5 9. El método de la reivindicación 8, **caracterizado** porque la partícula magnética de vidrio contiene un objeto magnético con un diámetro medio de 23 nm.

10. El método de acuerdo con cualquiera de las reivindicaciones 6 a 9, **caracterizado** porque la partícula magnética de vidrio es producida mediante el método sol-gel.

10 11. El método de la reivindicación 10, donde dicho método sol-gel comprende las etapas de

a) suspensión de los objetos magnéticos en un sol,

15 b) hidrólisis del sol para cubrir los objetos magnéticos con un gel,

c) deshidratación por aspersión de los objetos magnéticos cubiertos con un gel en un deshidratador por aspersión de dos boquillas y

20 d) sinterización del polvo deshidratado por aspersión para formar un vidrio a partir del gel que cubre los objetos magnéticos.

25 12. Utilización de una fase sólida en la etapa de desaminación y/o desulfonación de una reacción en la que una base citosina de un ácido nucleico es convertida en una base uracilo en presencia de iones bisulfito, en la que la fase sólida es seleccionada de vidrio o sílice, un material conteniendo vidrio o sílice, un intercambiador de iones o hidroxiapatita.

13. Utilización de acuerdo con la reivindicación 12, en la que la fase sólida es lana de vidrio o una membrana de vidrio.

30 14. Utilización de acuerdo con la reivindicación 12, en la que la fase sólida es una partícula magnética de vidrio.

15. Un kit para la realización de un método de acuerdo con cualquiera de las reivindicaciones 1 a 11, que contiene una solución que comprende iones bisulfito y una fase sólida, en la que la fase sólida es seleccionada de vidrio o sílice, un material conteniendo vidrio o sílice, un intercambiador de iones o hidroxiapatita.

35 16. El kit de acuerdo con la reivindicación 15, en el que la fase sólida es lana de vidrio o una membrana de vidrio.

17. El kit de acuerdo con la reivindicación 15 ó 16, en el que la fase sólida es una partícula magnética de vidrio.

40 18. Utilización del kit de acuerdo con cualquiera de las reivindicaciones 15 a 17 para una reacción en la cual una base citosina de un ácido nucleico es convertida en una base uracilo en presencia de iones bisulfito.

45

50

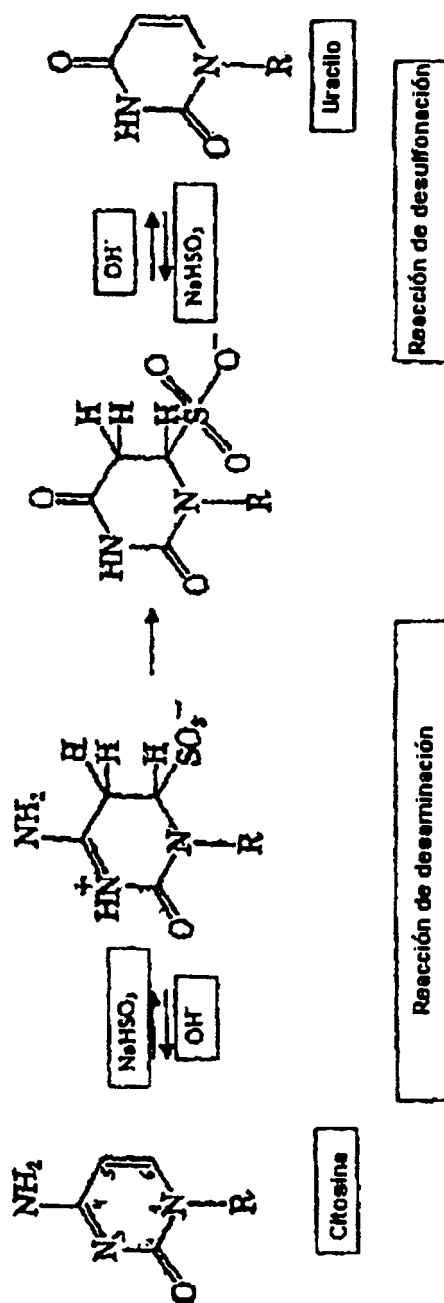
55

60

65

Figura 1

Reacción de las citosinas de ácidos nucleicos con bisulfito



ES 2 294 231 T3

LISTA DE SECUENCIAS

<110> Roche Diagnostics GmbH F. Hoffmann-La Roche AG
5 <120> Método mejorado para el tratamiento con bisulfito
<130> 21371
<140>
<141>
10 <150> 02019097.1
<151> 29-08-2002
<150> 02028114.3
<151> 18-12-2002
15 <160> 1
<170> PatentIn Versión 2.1

20 <210> 1
<211> 4261
<212> ADN
<213> *Homo sapiens*
25 <220>
<221> señal varia
<222> (1156)..(1162)
<223> motivo regulador de la transcripción; supuesto
30 <220>
<221> señal de GC
<222> (1169)..(1174)
35 <220>
<221> señal de GC
<222> (1179)..(1184)
<220>
40 <221> señal de TATA
<222> (1199)..(1198)
<220>
<221> exón
45 <222> (1225)..(1254)
<220>
<221> señal de poliA
50 <222> (4041)..(4046)
<300>
<308> Genbank: M24485
55 <309> 04-03-2000
<300>
<303> Gen
<304> 75
60 <305> 1
<306> 3-11
<307> 1989
<308> Morrow y col.
65 <300>
<310> US 5.552.277

ES 2 294 231 T3

<311> 19-07-1994

<312> 03-09-1996

5 <400> 1

	aacaagagat caatatctag aataaatgga gatctgcaaa tcaacagaaa gtaggcagca	60
10	aagccaaaga aaatagccta aggcacagcc actaaaagga acgtgatcat gtcctttgca	120
	gggacatggg tggagctgga agccgttagc ctcagcaaac tcacacagga acagaaaacc	180
	agcgagaccg catggtctca cttataagtg ggagctgaac aatgagaaca catggtcaca	240
15	tggcgcgcat caacacacac tgggtgcctgt tgagcggggg gctggggagg gagagtacca	300
	ggaagaatag ctaagggata ctgggcttaa tacctgggtg atgggatgat ctgtacagca	360
	aaccatcatg gcgcacacac ctatgtaaca aacctgcaca tcctgcacat gtaccccgga	420
20	acttcaaata aaagttggac ggccaggcgt ggtggctcac gcctgtaatc ccagcacttt	480
	gggaagccga ggcgtgcaga tcacctaaag tcaggagttc gagaccagcc cggccaacat	540
	ggtgaaaccc cgtctctact aaaaatacaa aaatcagcca gatgtggcac gcacctataa	600
25	ttccacctac tcgggaggct gaagcagaat tgcttgaacc cgagaggcgg aggttgcagt	660
	gagccgccga gatcgcgccca ctgcaactcca gcctgggcca cagcgtgaga ctacgtcata	720
	aaataaaata aaataacaca aaataaaata aaataaaata aaataaaata aaataataaa	780
30	ataaaataaa ataaaataaa ataaaataaa ataaagcaat ttcctttcct ctaagcggcc	840
	tccacccctc tcccctgccc tgtgaagcgg gtgtgcaagc tccgggatcg cagcggctctt	900
	agggaaatttc ccccgcgat gtcccgccgc gccagttcgc tgcgcacact tcgctgcggt	960
35	cctcttcctg ctgtctgttt actccctagg ccccgctggg gacctgggaa agagggaaaag	1020
	gcttcccccg ccagctgcgc ggcgactccg gggactccag ggcgcccctc tgcggccgac	1080
40	gcccggggtg cagcggccgc cggggctggg gccggcgagg gtccgcggga ccctccagaa	1140

45

50

55

60

65

ES 2 294 231 T3

	gagcgggccgg cgccgtgact cagcactggg gcgagcggg gcgggaccac ccttataagg	1200
	ctcgagggcc gcgaggcctt cgct gga gtt tcg ccg ccg cag tet tcg cca	1251
5	cca gtgagtaacg gcgccccgct ccccggggat ggggctcaga gctcccagca	1304
	tggggccaac ccgcagcatc agggccgggc tcccggcagg gctcctcgcc cacctcgaga	1364
	cccgggacgg gggcctaggg gaccagggac gtccccagtg ccgttagcgg ctttcagggg	1424
10	gccccgagcg cctcggggag ggatgggacc ccgggggcgg ggaggggggg caggctgcgc	1484
	tcaccgcgcc ttggcatcct cccccgggct ccagcaaaact tttctttgtt cgctgcagtg	1544
	ccgccctaca ccgtggtcta tttcccagtt cgaggtagga gcatgtgtct ggcagggaag	1604
15	ggaggcaggg gctggggctg cagcccacag cccctcgccc acccgagag atccgaaccc	1664
	ccttatccct ccgtcgtgtg gcttttacc ccgggcctcct tcctgttccc cgcctctccc	1724
	gccatgcctg ctccccgcc cagtgttgtg tgaaatcttc ggcggaacct gtttacctgt	1784
20	tccttcctg cactcctgac cctccccgg gttgtgcga ggcggagtcg gcccggtccc	1844
	cacatctcgt acttctccct ccccgaggc cgctgcgcgg ccctgcgcac gctgctggca	1904
	gatcagggcc agagctggaa ggaggaggtg gtgaccgtgg agacgtggca ggagggtca	1964
25	ctcaaagcct cctgcgtaag tgaccatgcc cgggcaaggg gaggggggtgc tgggccttag	2024
	ggggctgtga ctaggatcgg gggacgcca agctcagtc ccctccctga gccatgcctc	2084
	ccccaacagc tatacgggca gctccccaag ttccaggacg gagacctcac cctgtaccag	2144
30	tccaatacca tcctgcgtca cctggggccgc acccttggtg agtcttgaac ctccaagtcc	2204
	agggcaggca tgggcaagcc tctgcccccg gagccctttt gtttaaataca gctgccccgc	2264
35	agccctctgg agtgaggaa actgagacct actgaggtta cgtagtgtgc ccaaggtcaa	2324
	gcctgggtgc ctgcaatcct tgccctgtgc caggctgcct ccaggtgtc aggtgagctc	2384
	tgagcacctg ctgtgtggca gtctctcatc ctccacgca catectcttc cctcctccc	2444
40	aggctggggc tcacagacag cccctggtt ggcccatccc cagtactgt gtgttgatca	2504
	ggcgcccagt cacgcggcct gctccctcc acccaacccc agggctctat ggaaggacc	2564
	agcaggaggc agccctggtg gacatggtga atgacggcgt ggaggacctc cgctgcaaat	2624
45	acatctccct catctacacc aactatgtga gcatctgcac cagggttggg cactgggggc	2684
	tgaacaaaga aaggggcttc ttgtgccctc acccccctta cccctcaggt ggcttgggct	2744
	gaccccttct tgggtcaggg tgcaggggct gggtcagctc tgggccaggg gccaggggc	2804
50	ctgggacaag acacaacctg cacccttatt gcctgggaca tcaaccagcc aagtaacggg	2864
	tcatgggggc gagtgcagg acagagacct ccagcaactg gtggtttctg atctcctggg	2924
	gtggcgaggg cttcctggag tagccagagg tggaggagga tttgtcgcca gtttctggat	2984
55	ggaggtgctg gcacttttag ctgaggaaaa tatgcagaca cagagcacat ttggggacct	3044
	gggaccagtt cagcagaggc agcgtgtgtg cgcgtgcgtg tgcgtgtgtg tgcgtgtgtg	3104
	tgtgtacgct tgcatttgtg tcgggtgggt aaggagatag agatgggcgg gcagtaggcc	3164
60	cagggtcccga aggccttgaa ccactggtt tggagtctcc taagggcaat gggggccatt	3224

65

ES 2 294 231 T3

	gagaagtctg aacagggctg tgtctgaatg tgaggtctag aaggatcctc cagagaagcc	3284
	agctctaaag cttttgcaat catctggtga gagaaccag caaggatgga caggcagaat	3344
5	ggaatagaga tgagttggca gctgaagtgg acaggatttg gtactagcct ggttggtggg	3404
	agcaagcaga ggaggatctg ggactctggt gtctggcctg gggcagacgg ggggtgtctca	3464
	ggggctggga gggatgagag taggatgata catggtggtg tctggcagga ggcgggcaag	3524
10	gatgactatg tgaaggcact gcccgggcaa ctgaagcctt ttgagaccct gctgtcccag	3584
	aaccagggag gcaagacctt cattgtggga gaccaggtga gcatctggcc ccatgctgtt	3644
	ccttcctcgc caccctctgc ttccagatgg acacaggtgt gagccatttg tttagcaaag	3704
15	cagagcagac ctaggggatg ggcttaggcc ctctgcccc aattcctcca gcctgctccc	3764
	gctggctgag tccctagccc ccctgcccctg cagatctcct tcgctgacta caacctgctg	3824
	gacttgctgc tgatccatga ggtcctagcc cctggctgcc tggatgcgtt ccccctgctc	3884
20	tcagcatatg tggggcgccct cagtgcccg cccaagctca aggccttcct ggcctcccct	3944
	gagtacgtga acctcccat caatggcaac gggaaacagt gagggttggg gggactctga	4004
	gcgggaggca gagtttgcct tcctttctcc aggaccaata aaatttctaa gagagctact	4064
25	atgagcactg tgtttcctgg gacggggcct aggggttctc agcctcgagg tcggtgggag	4124
	ggcagagcag aggactagaa aacagctcct ccagcacagt cagtggcttc ctggagccct	4184
	cagcctggct gtgtttactg aacctcacia actagaagag gaagaaaaaa aaagagagag	4244
30	agaaacaaag agaaata	4261

35 LISTADO DE SECUENCIAS

	<110> Roche Diagnostics GmbH F. Hoffmann-La Roche AG
40	<120> Método mejorado para el tratamiento con bisulfito
	<130> 21371
	<140>
	<141>
45	<150> 02019097.1
	<151> 29-08-2002
	<150> 02028114.3
	<151> 18-12-2002
50	<160> 1
	<170> PatentIn Versión 2.1
55	<210> 1
	<211> 4261
	<212> ADN
	<213> <i>Homo sapiens</i>
60	<220>
	<221> señal varia
	<222> (1156)..(1162)
	<223> motivo regulador de la transcripción; supuesto
65	<220>
	<221> señal de GC

ES 2 294 231 T3

<222> (1169)..(1174)
<220>
<221> señal de GC
5 <222> (1179)..(1184)
<220>
<221> señal de TATA
10 <222> (1194)..(1198)
<220>
<221> exón
<222> (1225)..(1254)
15 <220>
<221> señal de poliA
<222> (4041)..(4046)
<300>
20 <308> Genbank: M24485
<309> 04-03-2000
<300>
25 <303> Gen
<304> 75
<305> 1
<306> 3-11
30 <307> 1989
<308> Morrow y col.
<300>
35 <310> US 5.552.277
<311> 19-07-1994
<312> 03-09-1996

40

45

50

55

60

65

ES 2 294 231 T3

<400> 1

	aacaagagat caatatctag aataaatgga gatctgcaaa tcaacagaaa gtaggcagca	60
5	aagccaaaga aaatagccta aggcacagcc actaaaagga acgtgatcat gtcctttgca	120
	gggacatggg tggagctgga agccgttagc ctcagcaaac tcacacagga acagaaaacc	180
	agcgagaccg catggtctca cttataagtg ggagctgaac aatgagaaca catggtcaca	240
10	tggcggcgat caacacacac tgggtgcctgt tgagcggggt gctggggagg gagagtacca	300
	ggaagaatag ctaagggata ctgggcttaa tacctgggtg atgggatgat ctgtacagca	360
	aaccatcatg gcgcacacac ctatgtaaca aacctgcaca tcctgcacat gtaccccaga	420
15	acttcaaata aaagttggac ggccaggcgt ggtggctcac gcctgtaatc ccagcacttt	480
	gggaagccga ggctgcaga tcacctaaagg tcaggagttc gagaccagcc cgccaacat	540
	ggtgaaaccc cgtctctact aaaaatacaa aaatcagcca gatgtggcac gcacctataa	600
20	ttccacctac tcgggaggct gaagcagaat tgcttgaacc cgagaggcgg aggttgcagt	660
	gagccgccga gatcgcgcca ctgcactcca gcctgggcca cagcgtgaga ctacgtcata	720
	aaataaaata aaataacaca aaataaaata aaataaaata aaataaaata aaataataaa	780
25	ataaaataaa ataaaataaa ataaaataaa ataaagcaat ttcctttcct ctaagcggcc	840
	tccacccctc tcccctgcc tgtgaagcgg gtgtgcaagc tccgggatcg cagcggctct	900
	agggaaattc ccccgcgat gtcccggcgc gccagttcgc tgcgcacact tcgctgcggt	960
30	cctcttctcg ctgtctgttt actccctagg ccccgtggg gacctgggaa agagggaaaag	1020
	gcttcccccg ccagctgcgc ggcgaactcg gggactccag ggcgccctc tgcggccgac	1080
35	gcccggggtg cagcggccgc cggggtggg gccggcggga gtccgcggga ccctccagaa	1140
	gagcggcccg cgcctgact cagcaactgg gcggagcgg gcgggaccac ccttataagg	1200
	ctcggaggcc gcgaggcctt cgct gga gtt tcg ccg ccg cag tct tcg cca	1251
40	cca gtgagtacgc gggcccgct cccgggggat ggggctcaga gctcccagca	1304
	tggggccaac ccgcagcatc aggcccggc tcccggcagg gctcctcgcc cacctcgaga	1364
	cccgggacgg gggcctaggg gaccaggac gtccccagtg ccgttagcgg ctttcagggg	1424
45	gcccggagcg cctcggggag ggatgggacc ccgggggcgg ggaggggggg caggctgcgc	1484
	tcaccgcgcc ttggcatcct ccccgggct ccagcaaaact tttctttgtt cgctgcagtg	1544
	ccgccctaca ccgtggtcta tttcccagtt cgaggtagga gcatgtgtct ggcagggaag	1604
50	ggaggcaggg gctggggctg cagcccacag ccctcgccc acccgagag atccgaaccc	1664
	ccttatecct ccgtcgtgtg gcttttacct cgggcctcct tcctgttccc cgcctctccc	1724
	gccatgcctg ctccccgcc cagtgttgtg tgaatatctt gccggaacct gtttacctgt	1784
55	tccctccctg cactcctgac ccctccccgg gtgtctgcga ggcggagtcg gcccggtccc	1844
	cacatctcgt acttctccct ccccgaggc cgctgcgcgg ccctgcgcat gctgctggca	1904
	gatcagggcc agagctggaa ggaggagggt gtgaccgtgg agacgtggca ggagggtca	1964
60	ctcaaagcct cctgcgtaag tgaccatgcc cgggcaaggg gaggggggtg tgggccttag	2024
	ggggctgtga ctaggatcgg gggacgcca agctcagtc ccctccctga gccatgcctc	2084

65

ES 2 294 231 T3

	ccccaacagc tatacgggca gctccccaag ttccaggacg gagacctcac cctgtaccag	2144
	tccaataacca tcctgcgtca cctggggccgc acccttggtg agtcttgaac ctccaagtcc	2204
5	agggcaggca tgggcaagcc tctgcccccg gagccctttt gtttaaatca gctgccccgc	2264
	agccctctgg agtgaggaa actgagacct actgaggta cgtagtttgc ccaagggtcaa	2324
	gcctgggtgc ctgcaatcct tgcctgtgc caggctgcct cccagggtgc aggtgagctc	2384
10	tgagcacctg ctgtgtggca gtctctcatc ctccacgca catctcttc cctcctccc	2444
	aggctggggc tcacagacag cccctggtt ggcccatccc cagtgactgt gtgttgatca	2504
	ggcgcccagt cacgcggcct gctccccctc acccaacccc agggctctat gggaaggacc	2564
15	agcaggaggc agccctggtg gacatggtga atgacggcgt ggaggacctc cgctgcaaat	2624
	acatctccct catctacacc aactatgtga gcctctgcac cagggttggg cactgggggc	2684
	tgaacaaaga aaggggcttc ttgtgcctc acccccctta cccctcagggt ggcttgggct	2744
20	gacccttct tgggtcaggg tgcaggggct gggtcagctc tgggccaggg gccaggggc	2804
	ctgggacaag acacaacctg cacccttatt gcctgggaca tcaaccagcc aagtaacggg	2864
	tcattggggc gagtgcaagg acagagacct ccagcaactg gtggtttctg atctcctggg	2924
25	gtggcgaggg cttcctggag tagccagagg tggaggagga tttgtcgcca gtttctggat	2984
	ggagggtctg gcacttttag ctgaggaaaa tatgcagaca cagagcacat ttggggacct	3044
	gggaccagtt cagcagaggc agcgtgtgtg cgcgtgcgtg tgcgtgtgtg tgcgtgtgtg	3104
30	tgtgtacgct tgcatttgtg tgggtgggt aaggagatag agatgggcgg gcagtaggcc	3164
	caggctccga aggccttgaa cccactggtt tggagtctcc taagggaat gggggccatt	3224
	gagaagtctg aacagggtctg tgtctgaatg tgaggctctag aaggatcctc cagagaagcc	3284
35	agctctaaag cttttgcaat catctggtga gagaaccag caaggatgga caggcagaat	3344
	ggaatagaga tgagttggca gctgaagtgg acaggatttg gtactagcct ggttgtgggg	3404
40	agcaagcaga ggaggatctg ggactctggt gtctggcctg gggcagacgg ggggtgtctca	3464
	ggggctggga gggatgagag taggatgata catggtggtg tctggcagga ggcgggcaag	3524
	gatgactatg tgaaggcact gcccgggcaa ctgaagcctt ttgagaccct gctgtcccag	3584
45	aaccagggag gcaagacctt cattgtggga gaccaggta gcctctggcc ccatgctgtt	3644
	ccttctctgc caccctctgc ttccagatgg acacagggtg gagccatttg tttagcaaa	3704
	cagagcagac ctaggggatg ggcttaggcc ctctgcccc aattcctcca gcctgctccc	3764
50	gctggctgag tccttagccc cctgcctg cagatctcct tcgctgacta caacctgctg	3824
	gacttgctgc tgatccatga ggtcctagcc cctggctgcc tggatgcgtt cccctgctc	3884
	tcagcatatg tgggggcct cagtgcccg cccaagctca aggccttctt ggcctccct	3944
55	gagtacgtga acctcccat caatggcaac gggaaacagt gagggttggg gggactctga	4004
	gcgggaggca gagtttgcct tcctttctcc aggaccaata aaatttctaa gagagctact	4064
	atgagcactg tgtttcctgg gacggggcct aggggttctc agcctcgagg tcggtgggag	4124
60	ggcagagcag aggactagaa aacagctcct ccagcacagt cagtggcttc ctggagccct	4184
	cagcctggct gtgtttactg aacctcacia actagaagag gaagaaaaaa aaagagagag	4244
65	agaaacaaag agaaata	4261