

19



OFICINA ESPAÑOLA DE
PATENTES Y MARCAS

ESPAÑA



11 Número de publicación: **2 294 462**

51 Int. Cl.:

C07H 21/04 (2006.01)

C01D 5/00 (2006.01)

C12Q 1/68 (2006.01)

12

TRADUCCIÓN DE PATENTE EUROPEA MODIFICADA
TRAS OPOSICIÓN

T5

96 Fecha de presentación y número de la solicitud europea: **28.01.2004 E 04705800 (3)**

97 Fecha y número de publicación de la concesión europea modificada tras oposición: **14.01.2015 EP 1590362**

54 Título: **Método mejorado para el tratamiento de bisulfito**

30 Prioridad:

29.01.2003 EP 03001854
02.05.2003 EP 03010020

45 Fecha de publicación y mención en BOPI de la
traducción de la patente modificada:
06.05.2015

73 Titular/es:

EPIGENOMICS AG (100.0%)
Kleine Präsidentenstrasse 1
10178 Berlin, DE

72 Inventor/es:

BERGMANN, FRANK;
MARKET-HAHN, CHRISTINE;
KLEIBER, JOERG y
BLOCK, DIRK

74 Agente/Representante:

ISERN JARA, Jorge

Observaciones :

**Véase nota informativa (Remarks) en el
folleto original publicado por la Oficina
Europea de Patentes**

ES 2 294 462 T5

DESCRIPCIÓN

Método mejorado para el tratamiento de bisulfito

5 Sector de la invención

La presente invención se refiere a un procedimiento para realizar una reacción de bisulfito para determinar las posiciones de metilación en un ácido nucleico, es decir, citocinas metiladas y no metiladas, a cuyo efecto, el ácido nucleico, se incubaba en una solución que comprende el ácido nucleico, durante un transcurso de tiempo que va de 1,5 a 3,5 horas, a una temperatura comprendida dentro de unos márgenes situados entre 70 y 90°C, y en donde, las concentración de bisulfito en la solución, es de un valor comprendido dentro de unos márgenes situados entre 3 M y 6,25 M, y en donde el valor de pH de la solución es el correspondiente a un valor comprendido entre 5,25 y 5,75, en donde el ácido nucleico, es decir, las bases de citosina en el ácido nucleico, se desamina. A continuación, la solución que comprende el ácido nucleico desaminado, se desulfona y, de una forma preferible, se desaliniza. La solicitud se refiere adicionalmente, a un equipo a modo de "kit", con una solución que comprende bisulfito, con un determinado valor de pH y usos de éste, así como también a un equipo a modo de "kit", que comprende la solución.

Antecedentes y trasfondo de la invención

Los genes, constituyen únicamente una pequeña proporción de genoma total de los mamíferos, y el control preciso de su expresión, en presencia de un contundente historial de ácido desoxirribonucleico (ADN) no codificante, presenta un sustancial problema para su regulación. El ADN no codificante, que contiene intrones, elementos repetitivos, y elementos transponibles, requiere un mecanismo efectivo para su silenciación a largo plazo. Los mamíferos parecen haber obtenido ventaja de las posibilidades proporcionadas por la metilación de citocinas para proporcionar un mecanismo hereditario para modificar las interacciones ADN – proteínas para ayudar en dicha silenciación. La metilación de ADN es esencial para el desarrollo de los mamíferos y juega un rol interpretativo potencial durante el envejecimiento y el cáncer. El compromiso de la metilación en la regulación de la expresión de genes y como una modificación epigenética que marca genes provistos de impronta, se encuentra bien establecida. En los mamíferos, la metilación acontece únicamente en residuos de citosina y, de una forma más específica, únicamente en residuos de citosina adyacentes a un residuo de guanosina, es decir, en la secuencia CG. La detección y elaboración de mapas de sitios de metilación de ADN, son etapas esenciales hacia el entendimiento de las señales moleculares, las cuales indican si una secuencia dada, se encuentra metilada.

Esto se realiza, actualmente, mediante el denominado procedimiento de bisulfito, descrito por parte de Frommer, M., et al., Proc. Natl. Acad. Sci. USA 89 (1992) 1827 – 1831, para la detección de 5-metil-citosinas. El procedimiento de bisulfito de elaboración de mapas de 5-metilcitosina, utiliza el efecto consistente en que el hidrogenosulfito de sodio, reacciona con citosina, pero no, o sólo de una forma escasa, con 5-metil-citosina. La citosina, reacciona con bisulfito, para formar un intermediario de reacción de citosina sulfonada, el cual es propenso a la desaminación, dando como resultado un uracilo sulfonado, el cual puede desulfonarse a uracilo en condiciones alcalinas (véase la figura 1). Es de conocimiento corriente, el hecho de que el uracilo, tiene el comportamiento de apareamiento de bases de timina, diferente al educto citosina, mientras que la 5-metilcitosina tiene el comportamiento de apareamiento de bases de citosina. Esto hace posible la discriminación de citosinas metiladas o no metiladas mediante, por ejemplo, la secuenciación genómica con bisulfito (Grigg, G., y Clark, S. Bioessays 16 (1994) 431 – 436; Grigg, G. W., DNA Seq. 6 (1996) 189 – 198) o PCR específica de metilación (MSP), dada a conocer en la patente estadounidense US 5.786.146. Se han realizado estudios básicos sobre la reacción de uracilo y derivados de la citosina con bisulfito, por parte de Shapiro et al., JACS 92 (1970) 422 – 424.

Existen varios documentos que hacen referencia a los aspectos específicos de la reacción de bisulfito.

Hayatsu, H., et al., Biochemistry 9 (1970) 2858 – 2865, hicieron reaccionar citosina, o sus derivados, con bisulfito 1 M, a un valor de pH de alrededor de 6, a una temperatura de 37°C, durante un transcurso de tiempo de 24 horas. Hayatsu, H., et al., J. Am. Chem. Soc. 92 (1970) 724 – 726, describen la reacción de citosina con bisulfito 3 M, a un valor de pH de alrededor de 6, a una temperatura de 80°C, durante un transcurso de tiempo de 30 minutos. Slæe y Shapiro, J. Org. Chem. 43 (1978) 4197 – 4200, describen la desaminación de citidina, con bisulfito 1 M, a un valor de pH alrededor de un valor neutro, a varias temperaturas, y en donde, no se describe el tiempo de reacción. No hubo investigaciones de la determinación de citosina o metil-citosina en ácidos nucleicos, en estos documentos.

Paulin, R. et al. Nucl. Acids Res. 26 (1998) 5009 – 5010, investigaron los efectos de la urea en la eficiencia de la secuenciación de 5-metilcitosina en ADN, mediada por bisulfito. El ADN, se hace reaccionar con bisulfito 3,44 M, en presencia en urea 5,36 M, e hidroquinona 0,5 mM, a un valor de pH de 5,0, a una temperatura de 55°C, durante un transcurso de tiempo de 15 horas.

Raizis, A. M. et al., Anal. Biochem, 226 (1995) 161 – 166, han dado a conocer un procedimiento de bisulfito para la elaboración de mapas de 5-metilcitosina, el cual minimiza la degradación de moldes. Éstos investigaron un

procedimiento que minimiza la degradación de los moldes, utilizando soluciones de bisulfito 5 M, en presencia de hidroquinona 100 mM, a un valor de pH de 5, a una temperatura de 50°C. Se observó un rendimiento productivo máximo de producto de PCR, después de un transcurso de tiempo de 4 horas. Se investigaron también otras condiciones, como las consistentes en un valor de pH incrementado y bajas temperaturas.

Grunau, C., et al., *Nucleic Acids Res* 29 (2001) e 65- 5, páginas 1 a 7, realizan una investigación de los parámetros experimentales críticos de la reacción de bisulfito. Éstos investigan soluciones de bisulfito de 3,87 a 4,26 M y de 5,2 a 5,69 M, a un valor de pH de 5. Las temperaturas que se sometieron a test de ensayo, son las correspondientes a unos valores de 15, 35, 55, 80, 85 y 95°C, durante un transcurso de tiempo de 1, 4 y 18 horas. La degradación de ADN, es un problema en estas investigaciones.

Wang, R. Y. et al., *Nucleic Acids Res.* 8 (1980) 4777 – 4790, dan a conocer el uso de solución de bisulfito 3 M, a un valor de pH de 5,5, a una temperatura de 37°C, durante varios períodos de tiempo, en el tratamiento de ADN, con bisulfito. Feil, R. et al., *Nucleic Acids Res* 22 (1994) 695 – 696, dan a conocer el uso de una solución de bisulfito 3,5 M, a un valor de pH de 5, a una temperatura de 0°C, durante un transcurso de tiempo de 24 horas, en el tratamiento de ADN con bisulfito. Clark, S.J., et al., *Nucleic Acids Res* 22 (1994), 2990 – 2997, dan a conocer el uso de una solución de bisulfito 4,8 a 5,8 M, a un valor de pH de 5, a una temperatura comprendida dentro de unos márgenes que van de 37 a 72°C, durante un transcurso de tiempo que va de 8 a 16 horas, en el tratamiento de ADN con bisulfito. Tasheva, E.S., y Roufa, D. J. *Mol. Cell. Biol.* 14 (1994) 5636 – 5644, dan a conocer el uso de una solución de bisulfito 1 M, a un valor de pH de 5, a una temperatura de 50°C, durante un transcurso de tiempo de 48 horas, en el tratamiento de fragmentos de ADN genómico, con bisulfito. Komiyama, M., y Oshima, S. *Tetrahedron Letters* 35 (1994) 8185 – 8188, dan a conocer el uso de una solución de bisulfito 1 M, a un valor de pH de 5, a una temperatura de 37°C, durante un transcurso de tiempo de 4 horas, en el tratamiento de ADN con bisulfito, en el cual, se encuentra presente dietilentrietilamina.

Olek, A., et al, *Nucleic Acids Res.* 24 (1996) 5064 – 5066 dan a conocer un procedimiento para la secuenciación de bases con bisulfito, en el cual se realiza un tratamiento con bisulfito y subsiguientemente, etapas de PCR en material embebido en perlas de agarosa. Se utiliza una solución de bisulfito 5 M, a un valor de pH de 5, a una temperatura de 50°C, durante un transcurso de tiempo de 4 horas, en el tratamiento de ADN con bisulfito.

Puede verse un análisis de la metilación del ADN, en Oakeley, E. J. *Pharmacol. Ther.* 84 (199), 389 – 400.

Se dan a conocer diferentes componentes adicionales, en la mezcla de bisulfito, en las documentos de patente internacional WO 01 / 98 528 y WO 02 / 31 186, o en Paulin, R. et al., *Nucleic Acids Res* 26 (1998) 5009 – 5010.

Los equipos a modo de “kit”, para realizar tratamientos con bisulfito, se encuentran comercialmente obtenibles en el mercado, de procedencia de la firma Intergen, y que se distribuyen, en la actualidad por parte de la firma Serologicals Corporation, Norcross, GA, EE.UU, por ejemplo el equipo de modificación, a modo de “kit”, denominado “CpGenome® ADN modification Kit” (http://www.Serologicals.com/products/int_prod/index.html).

Los procedimientos correspondientes al arte de la técnica anterior, para el tratamiento con bisulfito tienen desventajas. Así, por lo tanto, el problema a resolver por parte de la presente invención era el de proporcionar un procedimiento el cual supere las desventajas de los procedimientos correspondientes al arte de la técnica anterior.

Resumen de la invención

La presente invención proporciona un procedimiento para la conversión de una base de citosina, de una forma preferible, bases de citosina en un ácido nucleico, a una base de uracilo, de una forma preferible, bases de citosina, en donde, de una forma preferible, una base de 5-metil-citosina, de una forma preferible, bases de 5-metil-citosina, no se convierte de una forma significativa, que comprende las etapas de

a) incubar una solución que comprende el ácido nucleico durante un transcurso de tiempo de 1,5 a 3,5 horas a una temperatura comprendida dentro de unos márgenes comprendidos entre 70 y 90°C, en donde la concentración de bisulfito en la solución es de un valor comprendido dentro de unos márgenes situados entre 3 M y 6,25 M y en donde el valor de pH de la solución es de un valor comprendido dentro de unos márgenes situados entre 5,25 y 5,75, en donde el ácido nucleico se desamina e

b) incubar la solución que comprende el ácido nucleico desaminado, en condiciones alcalinas, a cuyo efecto el ácido nucleico desaminado se desulfona.

Adicionalmente, la memoria descriptiva divulga una solución con un valor de pH comprendido dentro de unos márgenes situados entre 5,4 y 5,6 y que comprende bisulfito en una concentración correspondiente a un valor situado entre 3 M y 6,25 M, usos de ésta y equipos a modo de “kit” que comprenden esta solución.

Tal y como es conocido por parte de una persona experta especializada en el arte de la técnica y en concordancia con la presente invención, el término "bisulfito" se utiliza de una forma intercambiable para "hidrogenosulfito".

En concordancia con la presente invención, el término "reacción de bisulfito", "tratamiento con bisulfito" o "procedimiento de bisulfito", significará una reacción para la conversión de una base de citosina, de una forma preferible, bases de citosina, en un ácido nucleico, a una base de uracilo, de una forma preferible, bases de uracilo, en presencia de iones de bisulfito, en donde, de una forma preferible, una base de 5-metil-citosina, de una forma preferible, bases de 5-metil-citosina, no se convierte de una forma significativa. Esta reacción para la detección de citosinas metiladas, se describe en detalle, por parte de Frommer et al., según se cita anteriormente, arriba, y por parte de Grigg y Clark, según se cita también arriba. La reacción de bisulfito, contiene una etapa de desaminación y de desulfonación, que pueden llevarse a cabo de una forma separada o simultáneamente (véase la figura 1; Grigg y Clark, según se cita anteriormente, arriba). La afirmación de que, las bases de 5-metil-citosina, no se convierten de una forma significativa, debe únicamente tomar en consideración el hecho de que no puede excluirse que un pequeño porcentaje de bases de 5-metil-citosina, se convierta en uracilo, a pesar de que se pretenda convertir únicamente y exclusivamente las bases de citosina (no metiladas) (Frommer et al., según se cita anteriormente, arriba). La persona experta especializada en el arte de la técnica, sabe como realizar la reacción de bisulfito, por ejemplo, haciendo referencia a Frommer et al., según se cita anteriormente, arriba, o a Grigg y Clark, citado anteriormente arriba, los cuales dan a conocer los parámetros principales de la reacción de bisulfito. A raíz de los trabajos de Grunau et al., citados anteriormente, arriba, se sabe, por parte de la persona experta en el arte especializado de la técnica correspondiente a este sector, el hecho de que son posibles variaciones del procedimiento de bisulfito. En resumen, en la etapa de desaminación, se emplea un tampón que contiene iones de bisulfito, opcionalmente, agentes caotrópicos y, opcionalmente, reactivos adicionales, tales como un alcohol, o estabilizadores, tales como la hidroquinona y el valor de pH se encuentra dentro de unos márgenes ácidos. La concentración de bisulfito, se encuentra comprendida dentro de unos márgenes situados entre 0,1 M y 6 M de bisulfito, de una forma preferible, entre 1 M y 5,5 M. la concentración del agente caotrópico, es de un valor comprendido dentro de unos márgenes situados entre 1 M y 8 M, en donde, de una forma preferible, se utilizan sales de guanidino, el valor de pH, se encuentra situado dentro de unos márgenes correspondientes a la zona ácida, de una forma preferible, dentro de unos márgenes situados entre unos valores de 4,5 y 6,5, la temperatura, es de un valor comprendido dentro de unos márgenes situados entre 0°C y 90°C, de una forma preferible, dentro de unos márgenes situados entre la temperatura ambiente (25°C) y 90°C y, el tiempo de reacción, se encuentra comprendido dentro de unos márgenes situados entre 30 minutos y 24 horas o 48 horas, o incluso de un tiempo mayor, pero, de una forma preferible, entre 1 hora y 24 horas. La etapa de desulfonación, se realiza mediante la adición de una solución o tampón alcalino, por ejemplo, una solución que contiene únicamente un hidróxido, por ejemplo, hidróxido sódico, o una solución que contiene etanol, cloruro sódico e hidróxido sódico (por ejemplo, 38% EtOH, 100 mM NaCl, 200 mM NaOH), e incubando a la temperatura ambiente, o a temperaturas elevadas, durante un transcurso de tiempo de varios minutos, de una forma preferible, entre 5 minutos y 60 minutos.

El procedimiento en concordancia con la presente invención, permite un tiempo de reacción relativamente corto de la reacción de bisulfito, proporcionando la posibilidad de realizar un ensayo de ADN en un transcurso de tiempo que se encuentra dentro de un día de trabajo. Un parámetro para hacer la reacción más rápida es la temperatura. Para hacer decrecer el proceso de degradación de ADN, es ventajoso un reducido valor de pH. Mediante la utilización de una solución de bisulfito 5 M de una valor de pH de 5,5 a una temperatura de 80°C, es posible un tiempo de reacción de por ejemplo, un transcurso de tiempo comprendido dentro de unos márgenes situados entre 120 y 180 minutos. Adicionalmente, además, la reacción bajo las condiciones en concordancia con la presente invención, es más específica para citosina, comparada con 5-metilcitosina, con condiciones estándar, después de un transcurso de tiempo de 16 horas. Son posibles los aditivos para la estabilización del reactivo de bisulfito, como la hidroquinona.

Descripción detallada de la invención

La presente invención, se refiere a un procedimiento para la conversión de una base de citosina, de una forma preferible, bases de citosinas, en un ácido nucleico, a una base de uracilo, de una forma preferible, bases de uracilo, en donde, de una forma preferible, una base de 5-metil-citosina, de una forma preferible, bases de 5-metil-citosina, no se convierte de una forma significativa, que comprende las etapas de

a) incubar una solución que comprende el ácido nucleico, durante un transcurso de tiempo de 1,5 a 3,5 horas, a una temperatura comprendida dentro de unos márgenes comprendidos entre 70 y 90°C, en donde, la concentración de bisulfito, en la solución, es de un valor comprendido dentro de unos márgenes situados entre 3 M y 6,25 M, y en donde, el valor de pH de la solución, es de un valor comprendido dentro de unos márgenes situados entre 5,25 y 5,75, en donde, el ácido nucleico, se desamina, y

b) incubar la solución que comprende el ácido nucleico desaminado, en condiciones alcalinas, a cuyo efecto, el ácido nucleico desaminado, se desulfona.

En una forma preferida de presentación de la presente invención, el procedimiento, puede comprender adicionalmente la etapa de desalinizar la solución que comprende el ácido nucleico desaminado y desulfonado. Esto puede lograrse, por ejemplo, mediante ultrafiltración, filtración de gel, precipitación, tal y como se conoce por parte de la persona especializada en el arte de la técnica, o mediante el ligado de las partículas magnéticas de vidrio, tal y como se describe en el documento de patente internacional WO 96 / 41 811.

En una forma preferida de presentación, la temperatura, en el procedimiento en concordancia con la presente invención, es la correspondiente a un valor comprendido dentro de unos márgenes situados entre 75 y 85°C. En otra forma preferida de presentación de la invención, la concentración de bisulfito, se encuentra comprendida dentro de unos márgenes situados entre 3,2 M y 6 M, de una forma preferible, entre 4,75 M y 5,5 M. En otra forma preferida de presentación de la invención, el período de tiempo, se encuentra comprendido entre 1,75 y 3 horas. En otra forma preferida de la invención, el período de tiempo, se encuentra comprendido entre 2 y 3 horas, de una forma preferible, entre 2 y 2,5 horas. En la forma mayormente preferida de la invención, en la etapa a), la temperatura, es un valor de 80°C, la concentración de bisulfito, es de 5 M, el valor de pH de la solución, es de 5,5 y, el período de tiempo, de una forma preferible, se encuentra comprendido entre 2 y 2,5 horas, o 3 horas, de una forma mayormente preferible, 2 horas.

El procedimiento, de una forma preferible, se realiza en solución, siendo también factible el hecho de que, el procedimiento en concordancia con la presente invención, se realice mientras el ácido nucleico se encuentra en una forma ligada a una fase sólida, es decir, que éste se encuentra unido a una fase sólida, en condiciones apropiadas. La fase sólida, puede ser un óxido de silicio, de una forma preferible, en forma de lana o fibras de vidrio, o partículas magnéticas de vidrio, tal y como se encuentra descrito en los documentos de patente internacional WO 96 / 41 811, WO 00 / 32 762 y WO 01 / 37 291. El procedimiento principal de realización de tratamiento con bisulfito, mientras que, el ácido nucleico se encuentra unido a la fase sólida, se describe, por ejemplo, en las solicitudes de patente europea con los números EP 02 019.097.1 y EP 028 114.3

La persona experta, especializada en arte de la técnica correspondiente a este sector, sabe cómo realizar la reacción de bisulfito, por ejemplo, haciendo referencia a los trabajos de Frommer et al., citados anteriormente, más arriba, a los trabajos de Grigg y Clark, citados anteriormente, arriba, y los trabajos de Grunau et al, citados anteriormente, arriba, los cuales dan a conocer los parámetros principales de la reacción de bisulfito.

En una forma de la invención, el ácido nucleico, es ácido desoxirribonucleico (ADN), de una forma particular, ADN genómico o ácido nucleico, el cual se encuentra en el genoma del organismo, y se transmite a los descendientes, como una información necesaria para la supervivencia. La frase, se utiliza para distinguir entre otros tipos de ADN, tal y como se encuentra en los plásmidos. La fuente del ácido nucleico, puede ser eucariótica o procariótica, de una forma preferible, procedente de vertebrados, particularmente, de mamíferos, de una forma mayormente preferida, de animales o humanos.

En una forma de presentación de la invención, el ácido nucleico, se obtiene a partir de una muestra biológica, utilizando fases sólidas, tal y como se describe anteriormente, arriba, y procedimientos conocidos por parte de persona experta del arte especializado correspondiente a este sector. La muestra biológica, comprende células procedentes de organismos multicelulares, tales como, por ejemplo, células humanas y animales, tales como leucocitos, y compuestos químicos de bajo y de alto peso molecular, inmunológicamente activos, tales como los haptenos, antígenos, anticuerpos y ácidos nucleicos, plasma sanguíneo, fluido cerebral, esputo, excrementos, especímenes de biopsia, médula ósea, enjuagues orales, suero sanguíneo, tejidos, orina, o mezclas de éstos. En una forma preferida de presentación de la invención, la muestra biológica, es un fluido procedente del cuerpo humano o animal. La muestra biológica, puede ser sangre, plasma sanguíneo, suero sanguíneo, tejido u orina. La muestra biológica que comprende el ácido nucleico, se lisa, para crear una mezcla de compuestos biológicos que comprende ácidos nucleicos, y otros componentes. Los procedimientos para la lisis biológica de muestras, son conocidos por parte de los expertos en el arte especializado de la técnica, y pueden ser de naturaleza química, enzimática o física. Es asimismo aplicable una combinación de estos procedimientos. Así, por ejemplo, la lisis, puede realizarse utilizando ultrasonidos, alta presión, fuerzas de cizallamiento, álcalis, detergentes o soluciones salinas caotrópicas, o proteasas o lipasas. Para el procedimientos de lisis, con objeto de obtener ácidos nucleicos, se hace especial referencia a Sambrook, J., et al., en "Molecular Cloning: a Laboratory Manual", - Clonación molecular: un laboratorio manual,- (1989), eds. J. Sambrook., E. F. Fritsch y T. Maniatis, Cold Spring Harbour Laboratory Press, Cold Spring Harbour, NY; y Ausubel, F., et al., en "Current protocols en molecular biology", - Protocolos actuales en biología molecular" (1994), eds. F. Ausubel, R. Brent and K. R. E. Wiley & Sons, New York. A continuación, los ácidos nucleicos, se aíslan de la mezcla de lisis, utilizando los procedimientos conocidos por parte de las personas expertas en el arte especializado de la técnica, por ejemplo, utilizando fases sólidas, tales como las partículas magnéticas de vidrio (documento de patente internacional WO 96 / 41 811) y, a continuación, éstos pueden someterse a los procedimientos en concordancia con la presente invención, a saber el tratamiento de bisulfito en concordancia con la presente invención. Para lisar las células, pueden también utilizarse agentes caotrópicos, con objeto de preparar una mezcla entre ácidos nucleicos y otras sustancias biológicas (véase, por ejemplo, Sambrook et al., (1989) o la patente europea EP 0 389 063). A continuación, puede añadirse un material

que comprenda vidrio o sílice, y resulta un efecto de purificación, procedente del comportamiento de ADN o RNA, para unirse al material con una superficie de vidrio, bajo estas condiciones, por ejemplo, en presencia de ciertas concentraciones de agente caotrópico, altas concentraciones de disolventes orgánicos o en condiciones ácidas. Para este propósito, puede también utilizarse la captura específica de secuencia.

En una forma preferida de presentación de la presente invención, el ácido nucleico, se amplifica, después de las etapas del procedimiento en concordancia con la invención, con la reacción en cadena de la polimerasa (Polymerasa Chain Reaction) (PCR : EP 0 201 184; EP - A - 0 200 322; US 4.683.202). El procedimiento de amplificación, puede ser también el correspondiente a la Ligasa Chain Reaction, - Reacción en cadena de la ligasa - (LCR : Wu, D. Y. y Wallace, R. B., Genomics 4 (1989) 560 - 569; y Barany, F., Proc. Natl. Acad. Sci. USA 88 (1991) 189 - 193), Polimerasa Ligasa Chain Reaction, - Reacción en cadena de la polimerasa - ligasa -, (Barany, F., PCR Methods Appl. 1 (1991) 5 - 16), Gap-LCR (Publicación de patente internacional PCT nº WO 90 / 01 069), Repair Chain Reaction, - Reacción en cadena de reparación -, (publicación de la solicitud de patente europea nº EP - A - 0 439 182), 3SR (Kwoh, D. Y. et al., Proc. Natl. Acad. Sci. USA 86 (1989) 1173 - 1177; Guatelli, J. C., et al., Proc. Natl. Acad. Sci. USA 87 (1990) 1874 - 1878; Publicación de patente internacional PCT nº WO 92 / 0 880 A), y NASBA (patente estadounidense US nº 5.130.238). Adicionalmente, además, hay la Amplificación de desplazamiento de hebra (SDA - [del inglés, Strand displacement amplification] -), Amplificación mediada por transcripción (TMA - [del inglés, Transcription mediated amplification] -), y Qy-amplification (amplificación Qy (para una revisión, véase, por ejemplo, Whelen, A.C. y Persing, D.H., Annu. Rev. Microbiol. 50 (1996); Abramson, R.D., y Myers, T.W., Curr. Opin. Biotechnol. 4 (1993) 41 - 47). Los procedimientos de amplificación particularmente preferidos, en concordancia con la presente invención, son el procedimiento de PCR específico de metilación (MSP - [del inglés, Metilation specific PCE method] -), dado a conocer en la patente estadounidense US 5.786.146, el cual combina el tratamiento de bisulfito y la PCR específica de alelos (véanse, por ejemplo, las patentes estadounidenses US 5.137.806, US 5.595.890 y US 5.639.611).

En una forma preferida de presentación, el procedimiento, puede comprender adicionalmente la etapa de detectar el ácido nucleico amplificado. El ácido nucleico amplificado, puede determinarse o detectarse por mediación de procedimientos analíticos estándar, conocidos por parte de la persona experta en el arte especializado de la técnica, y que se describen, por ejemplo, por parte de Sambrook, J. et al., en "Molecular Cloning: A laboratory Manual", - Clonación molecular: Un manual de laboratorio -, (1989, eds. J. Sambrook, E. F. Fritsch y T. Maniatis, Cold Spring Harbor Laboratory Press, Cold Spring Harbor, NY. Lottpeich y Zorbas, en "Bioanalitik" (1998), eds. L. a. Zorbas, Spektrum Akademischer Verlag, Heidelberg, Berlín, Alemania, o por parte de Ausubel, F. et al., en "Current protocols in molecular Biology", - Protocolos actuales en biología molecular (1994), eds. F. Ausubel, R. Brent y K. R. E., Wiley & Sons Verlag, New York. Puede también haber otras etapas adicionales de purificación, antes de que se detecte el ácido nucleico diana, por ejemplo, una etapa de purificación. Los procedimientos de detección, pueden incluir, pero no de una forma limitativa en cuento a éstos, al enlazado o intercalado de colorantes específicos, tales como el bromuro de etidio, el cual se intercala al interior del ADN de doble hebra, y cambia su fluorescencia después de ello. Los ácidos nucleicos purificados, pueden también separarse mediante procedimientos electroforéticos, opcionalmente, después de digestión de restricción, y visualizarse posteriormente. Existen, también, ensayos basados en sondas, los cuales explotan la hibridación de oligonucleótidos a secuencias específicas, y la subsiguiente detección del híbrido. Es también posible, el secuenciar el ácido nucleico, después de etapas adicionales, conocidas por parte de la persona experta en el arte especializado de la técnica de este sector. Otros procedimientos, aplican una diversidad de secuencias de ácidos nucleicos, a un chip de silicio, al cual se enlazan sondas específicas y proporcionan una señal, cuando se enlaza una secuencia complementaria.

En una forma particularmente preferida de presentación de la presente invención, el ácido nucleico, se detecta procediendo a medir la intensidad de luz fluorescente, durante la amplificación. Este procedimiento, supone el control de la fluorescencia a tiempo real. Un procedimiento particularmente preferido que explota la amplificación y detección simultáneas, procediendo a medir la intensidad de luz fluorescente, es el TaqMan®, dado a conocer en la publicación de patente internacional WO 92 / 02 638, y las correspondientes patentes estadounidenses US 5.210.015, US 5.804.375, US 5,487.972. Este procedimiento, explota la actividad exonucleasa de una polimerasa, para generar una señal. De una forma detallada, el ácido nucleico, se detecta mediante un procedimiento que comprende contactar la muestra con un oligonucleótido, que contiene una secuencia complementaria, a una región del ácido nucleico diana, y oligonucleótido marcado, que contiene una secuencia complementaria a la segunda región de la misma hebra del ácido nucleico, pero que no incluye la secuencia de ácido nucleico definida por el primer oligonucleótido, para crear una mezcla de dúplex, durante las condiciones de hibridación, en donde, los dúplex, comprenden el ácido nucleico reasociado al primer oligonucleótido y al oligonucleótido marcado, de tal forma que, el extremo 3', del primer oligonucleótido, es adyacente al extremo 5' del oligonucleótido marcado. A continuación, esta mezcla, se trata con una polimerasa de ácido nucléico dependiente de un molde, que tiene actividad nucleasa 5' a 3', bajo unas condiciones suficientes como para permitir que, la actividad nucleasa 5' a 3' de la polimerasa, segmente el oligonucleótido reasociado, marcado, y libere fragmentos marcados. La señal generada por la hidrólisis del oligonucleótido marcado, se detecta y / o se mide. La tecnología TaqMan®, elimina la necesidad de que se forme y que sea detectable un complejo de reacción de enlace de fase sólida. En términos más generales, la reacción de amplificación y / o detección del procedimiento en concordancia con la presente invención, es un

ensayo de fase de solución homogénea. Otros procedimientos apropiados, son los formatos utilizados en el instrumento denominado "LightCycler® instrument" (véase, por ejemplo, la patente estadounidense US 6.174.670). Es particularmente preferido, el uso del tratamiento de bisulfito, amplificación con cebadores específicos de metilación, o sin ellos, en presencia de una sonda específica de metilación, y detección de fluorescencia a tiempo real, tal y como se describe en la patente estadounidense US 6.331.393.

En una forma preferida de presentación de la presente invención, el procedimiento, está automatizado, es decir que, el procedimiento, se lleva a cabo según un proceso automático, según se describe, por ejemplo, en la publicación de patente internacional WO 99 / 16781. Un proceso automatizado, significa el hecho de que, las etapas del proceso, son apropiadas para llevarse a cabo con un aparato o una máquina con capacidad de operar con un reducido control o influencia exterior, o sin control o influencia exterior, por parte de un ser humano. Un procedimiento automatizado, significa el hecho de que, las etapas del procedimiento automatizado, se llevan a cabo con un aparato o máquina capaz de operar con un reducido control o influencia exterior, o sin control o influencia exterior, por parte de un ser humano. Únicamente las etapas de preparación para el procedimiento, deben realizarse manualmente, por ejemplo, los recipientes de almacenaje, deben llenarse y colocarse en su lugar es decir, la elección de las muestras, debe realizarse por parte de un ser humano y etapas adicionales conocidas por parte de la persona experta especializada en el arte de la técnica correspondiente a este sector, por ejemplo, por ejemplo, la operación de la computadora de control. El aparato o máquina, puede, por ejemplo, añadir líquidos automáticamente, mezclar las muestras o llevar a cabo las etapas de incubación, a unas temperaturas específicas. De una forma típica, tal tipo de máquina o aparato, es un robot controlado por computadora, la cual lleva a cabo un programa, en el cual, las etapas individuales y comandos, se encuentran especificados. En una forma preferida de presentación de la presente invención, el procedimiento, es en un formato de alta capacidad de carga o caudal volumétrico, es decir que, los procedimientos automatizados, se llevan a cabo en un formato de alta capacidad de carga o caudal volumétrico, lo cual significa el hecho de que, los procedimientos y la máquina o aparatos utilizados, se optimizan para una alta capacidad de carga o caudal volumétrico de muestras, en un corto transcurso de tiempo.

De una forma preferible, el procedimiento en concordancia con la presente invención, se utiliza en diagnósticos, para análisis de diagnósticos o para bioanalíticas, o para el rastreo de tejido o fluidos procedentes del cuerpo humano o incluso de cuerpos de animales, para la presencia de ciertos modelos patrón de metilación. Adicionalmente, además, el procedimiento en concordancia con la presente invención, se utiliza para incrementar la velocidad, la exactitud o sensibilidad de la detección de sitios de metilación en ácidos nucleicos.

La memoria descriptiva también divulga una solución con un valor de pH comprendido dentro de unos márgenes situados entre 3 M y 6,25 M, en una reacción que se usa a una temperatura de reacción comprendida dentro de unos márgenes situados entre 70 y 90°C, en donde, una base de citosina, de una forma preferible, bases de citosina, en un ácido nucleico, se convierten en una base de uracilo, de una forma preferible, bases de uracilo, en presencia de iones de bisulfito, en donde, de una forma preferible, una base de 5-metil-citosina, de una forma preferible, bases de 5-metil-citosina, no se convierte de una forma significativa. De una forma preferible, la concentración de bisulfito, es de un valor comprendido dentro de unos márgenes situados entre 3,2 M y 6 M, de una forma preferible, entre 4,75 M y 5,5 M. Más preferiblemente el valor de pH de la solución, es de 5,5 y, la concentración de bisulfito, es de 5 M. La solución, puede también contener hidroquinona, para la estabilización. La solución es preferiblemente una solución acuosa. De una forma preferible, la temperatura de reacción, se encuentra comprendida dentro de unos márgenes situados entre 75 y 85°C.

La memoria descriptiva divulga de manera adicional un equipo, a modo de "kit" que comprende una solución como la citada anteriormente. La solución, tiene un valor de pH comprendido dentro de unos márgenes situados entre 5,25 y 5,75, de una forma más preferible, entre 5,4 y 5,6, y comprende bisulfito, en una concentración correspondiente a unos valores situados entre 3 M y 6,25 M. De una forma preferible, la concentración de bisulfito, es de un valor comprendido dentro de unos márgenes situados entre 3,5 M y 6 M, de una forma preferible, entre 4,75 M y 5,5 M. La solución, puede contener opcionalmente hidroquinona. Más preferiblemente, el valor de pH de la solución, es de 5,5 y, la concentración de bisulfito, es de 5 M. Tales tipos de equipos a modo de "kits", conocidos en el arte especializado de la técnica, comprenden adicionalmente elementos de plástico, los cuales pueden utilizarse durante el procedimiento de bisulfito, tales como, por ejemplo, placas de microtitulación, en el formato de 96 o 384 pocillos, o tubos de reacción fabricados, por ejemplo, por parte de la firma Eppendorf, Hamburg, Alemania. El equipo a modo de "kit", puede comprender, adicionalmente, una solución de lavado, la cual es apropiada para la etapa de lavado de la fase sólida, de una forma particular, la lana o membrana de vidrio, o la partículas de vidrio magnéticas. A menudo, la solución de lavado, se encuentra provista como una solución a granel, la cual debe diluirse antes de su uso. El equipo a modo de "kit", puede comprender adicionalmente un eluyente, es decir, una solución o un tampón (por ejemplo, TE, 10 mM Tris, 1 mM EDTA, pH 8,0), o agua pura, para eluir el ADN o RNA enlazados a la fase sólida. Adicionalmente, además, pueden encontrarse presentes reactivos adicionales, los cuales contienen tampones apropiados para su uso en la presente invención. De una forma preferible, el equipo a modo de "kit" en concordancia con la presente invención, se utiliza para una reacción, en donde, una base de citosina, de una forma preferible, bases de citosina, en un ácido nucleico, se convierten a una base de uracilo, de una forma preferible, bases de

uracilo, en presencia de iones de bisulfito, en donde, de una forma preferible, una base de 5-metil-citosina, de una forma preferible, bases de 5-metil-citosina, no se convierten de una forma significativa.

La memoria descriptiva divulga una solución con un valor de pH comprendido entre 4,5 y 5,6 y que comprende bisulfito en una concentración comprendida dentro de unos márgenes situados entre 3,5 M y 6,25 M. La solución, contiene opcionalmente hidroquinona u otros radicales secuestrantes. De una forma preferible, la concentración de bisulfito, es la correspondiente a un valor comprendido dentro de unos márgenes situados entre 3,75 M y 6 M, de una forma preferible, entre 4,75 M y 5,5 M. Más preferiblemente el valor de pH de la solución, es de 5,5 y, la concentración de bisulfito, es de 5 M.

Los siguientes ejemplos, referencias, listados de secuencias y figuras, se proporcionan con objeto de ayudar en la comprensión de la presente invención, cuyo ámbito real, se presenta en las reivindicaciones anexas.

Descripción de las figuras

Figura 1: Las etapas del procedimiento de bisulfito

Figuras 2 a 14: Perfiles de HPLC de las mezclas de reacción, después de ciertos periodos de tiempo indicados en los ejemplos.

1 Ejemplos

1.1 Condiciones optimizadas de comparación con condiciones estándar, utilizando un sistema modelo (oligonucleótido) y análisis mediante HPLC

1.1.1 Procedimiento

1.1.1.1 Composición de los reactivos

Valor pH del reactivo bisulfito 5,0 / 50°C: ("Standard")	1,9 g Na ₂ S ₂ O ₅ 2 ml agua Millipore 0,7 ml 2M NaOH 0,5 ml 1M Hridroquinona (opcional) Adición de agua Millipore a un volumen de 4 ml.
---	---

Valor pH del reactivo bisulfito 5,5 / 80°C: ("Standard")	1,9 g Na ₂ S ₂ O ₅ 1 ml agua Millipore 2 ml 2M NaOH 0,5 ml 1M Hridroquinona (opcional) Adición de agua Millipore a un volumen de 4 ml.
---	---

Puede añadirse hidroquinona, opcionalmente, no es necesario si el reactivo se prepara de forma fresca, (inmediatamente antes), para el experimento.

Secuencias:

Los oligonucleótidos, se sintetizan utilizando procedimientos estándar automatizados de fase sólida, aplicando la química de la fosforoamidita.

Secuencia GDTP1:

SEC ID N°: 1: 5'-d (GAGGGGCGCCTGGAGTCCC)-3' (hebra sentido)
SEC ID N°: 2: 5'-d (GGGACTCCAGGGCGCCCCTC)-3' (hebra antisentido)
SEC ID N°: 3: 5'-d (GAGGGGUGUUUTGGAGTUUU)-3' (hebra sentido C convertida a U (producto))
SEC ID N°: 4: 5'-d (GGGAUTUUAGGGUGUUUUUTU)-3' (hebra antisentido C convertida a U (producto))

C o C^{Me} en la posición central de T₁₀:

SEC ID N°: 5: 5'-d(T₅CT₅)-3'
SEC ID N°: 6: 5'-d(T₅C^{Me}T₅)-3'
SEC ID N°: 7: 5'-d(T₅UT₅)-3'
SEC ID N°: 8: 5'-d(T₁₁)-3'

1.1.1.2 Condiciones de reacción

Se procede a disolver aproximadamente 5 nmol de un oligonucleótido de hebra individual o 5 nmol de cada hebra de un oligonucleótido de doble hebra, en 20 µl de agua Millipore y, a continuación, se añaden 200 µl de reactivo bisulfito. A continuación de ello, el tubo de reacción, se emplaza un mezclador térmico (50°C u 80°C; 500 revoluciones por minuto). Después de un transcurso de tiempo de $t = x$ horas, se para la reacción, mediante la adición de 500 µl de NaOH 2,5 M (desulfonación). Después de un transcurso de tiempo de 30 minutos, a la temperatura ambiente, la mezcla, se desaliniza sobre una columna de Sephadex G25. Se evapora el oligonucleótido que contiene la fracción, y se disuelve en 200 µl de agua Millipore a ser analizada mediante HPLC.

1.1.1.3 Evaluación

HPLC analítica: columna: Dionex DNA Pac PA-100 SEL
 tampón A: 0,01 M NaOH, 0,2 M NaCl
 tampón B: 0,01 M NaOH, 1 M NaCl
 gradiente: 50 – 100% B en 25 minutos

Evaluación de datos: Se procede a comparar los cromatogramas de HPLC, mediante HPLC-área% del pico del producto, a $t = 0$ x, y se muestran en las figuras 2 a 12.

1.1.2 Resultados

1.1.2.1 Cinética de la reacción GSTP1 ds, a $T = 80^\circ\text{C}$, $\text{pH} = 5,5$

Se procedió a realizar una doble determinación, en concordancia con el protocolo estándar descrito anteriormente, arriba, con las secuencias de GSTP1 correspondientes a la SEC ID N°: 1, la cual es la hebra sentido, y la SEC ID N°: 2, la cual la hebra antisentido, y se calculan los valores medios.

T (minutos)	HPLC-áreaC%	Figura
10	0	2
30	27,0	3
60	77,5	4
90	87,5	5
120	89,9	6
150	90,4	7
180	88,6	8

1.1.2.2 Cinética de la reacción GSTP1 ds, a $T = 50^\circ\text{C}$, $\text{pH} = 5,0$ (Condiciones estándar)

Se procedió a realizar una doble determinación, en concordancia con el protocolo estándar descrito anteriormente, arriba, con las secuencias de GSTP1 correspondientes a la SEC ID N°: 1, la cual es la hebra sentido, y la SEC ID N°: 2, la cual la hebra antisentido, y se calculan los valores medios.

T (horas)	HPLC-áreaC%	Figura
1	15,6	9
2	41,2	10
4	72,5	
8	89,4	11
16	91,8	12
20	85,0	

1.1.2.3 Especificidad de la reacción de bisulfito T5CMeT5 a una $T = 80^\circ\text{C}$, $\text{pH} = 5,5$ (condiciones optimizadas) comparado a las condiciones "estándar" a una $T = 50^\circ\text{C}$, $\text{pH} = 5,5$

Con objeto de evaluar la especificidad de la reacción de bisulfito, se procedió a evaluar el oligonucleótido 5'-T₅C^{Me}T₅-3' (SEC ID N°: 6), bajo las condiciones indicadas. Los resultados obtenidos, son los siguientes: 5 M bisulfito $\text{pH} = 5,0$ / $T = 50^\circ\text{C}$ / $t = 16$ horas (condiciones estándar) (véase la figura 13, para un cromatograma a título de ejemplo):

Muestra	HPLC-área% T ₅ C ^{Me} T ₅	HPLC-área% T ₁₁	Factor de relación HPLC-área% T ₁₁ / T ₅ C ^{Me} T ₅
1	82,4	5,20	0,0630
2	83,3	5,11	0,0614
3	80,2	5,52	0,0688

4	80,5	5,92	0,0735
Valor medio	81,6	5,44	0,0667

5 M bisulfito pH 5,5 / T = 50°C / t = 2 horas (condiciones optimizadas) (véase la figura 13, para un cromatograma a título de ejemplo):

Muestra	HPLC-área% T ₅ C ^{Me} T ₅	HPLC-área% T ₁₁	Factor de relación HPLC-área% T ₁₁ / T ₅ C ^{Me} T ₅
1	89,9	2,65	0,0295
2	89,5	2,46	0,0275
3	90,2	2,24	0,0248
4	89,7	2,88	0,0322
Valor medio	89,8	2,56	0,0285

1.1.3 Conclusiones

Las condiciones en concordancia con la presente invención, conducen a un rendimiento productivo del producto, similar, después de un tiempo de reacción de 2 horas, como condiciones estándar, después de un transcurso de tiempo de 8 – 16 horas. La especificidad de la reacción de bisulfito, es significativamente mayor, para las condiciones en concordancia con la invención, después de un transcurso de tiempo de 2 horas, comparado a las “condiciones estándar”, después de un transcurso de tiempo de 16 horas.

1.2 Comparación de ciertas condiciones del procedimiento de bisulfito, utilizando PCR de ADN genómico tratado con bisulfito

1.2.1 General

El hecho de que, la reacción de bisulfito, ha trabajado y convertido las citosinas no metiladas a uracilo, puede también demostrarse mediante una reacción en cadena de la polimerasa, en donde se utilizan cebadores, los cuales son específicos a un región de la secuencia de ácido nucleico, en donde, las citosinas no metiladas, se han convertido en uracilos, es decir, la base adenina, en el cebador, es opuesta al uracilo, siendo el producto de la reacción de bisulfito, procedente de citosinas no metiladas. En caso de una conversión incompleta, el cebador, no podría hibridar a esta región, puesto que habría citosinas que no se aparejarían a las bases de adenina en el cebador. Esto tendría el efecto de que no se obtendría producto de PCR.

Un procedimiento mejorado para realizar reacciones en cadena de la polimerasa, rápidas, es el que se da a conocer en la patente estadounidense US 6.174.670 y que se utiliza en el equipo consistente en el instrumento “lightCycler® instrument (Roche, Mannheim, Alemania). En este procedimiento, dos sondas marcadas, pueden entrar en cercana proximidad, de una forma dependiente del producto de amplificación, de tal forma que, dos marcadores, pueden realizar la transferencia de energía de fluorescencia (FRET – [del inglés, fluorescent energy transfer] -). La cantidad de producto de amplificación, se correlaciona con la intensidad de la luz emitida a ciertas longitudes de onda. Este procedimiento específico de PCR, puede por lo tanto utilizarse para analizar si se ha obtenido una conversión completa de citosinas no metiladas, o si ésta no se ha obtenido, mediante, por ejemplo, procediendo a analizar la región del promotor del gen de la glutation-S-transferasa π (véase, a dicho efecto, la patente estadounidense US 5.552.277, código de acceso al banco de genes Genbank M24485, y Morrow et al. (1985) Gene 75, 3 – 11), utilizando sondas y cebadores apropiados. No obstante, la persona experta en el arte especializado de la técnica, conoce el hecho de que pueden también utilizarse otros procedimientos para esta evaluación. Las mediciones de fluorescencia, se encuentran normalizadas, procediendo a dividir entre una medición de fluorescencia inicial, es decir, la fluorescencia de fondo, obtenida durante un ciclo temprano, en la reacción, mientras que, las mediciones de la fluorescencia entre los ciclos, parece ser relativamente constante. El número de ciclos elegido para la medición de la fluorescencia inicial, es la misma para todas las reacciones comparadas, de tal forma que, todas las mediciones, representan incrementos relativos al mismo ciclo de reacción. En los ciclos tempranos de una amplificación de reacción en cadena de la polimerasa, en número de moléculas diana, puede describirse mediante la ecuación geométrica $N_j = N_0 \times (1 + E)^j$, en donde, N_0 = número de moléculas diana en el inicio de la reacción, N_j = número de moléculas diana en el completado del ciclo j-th, E = la eficacia de la amplificación ($0 \leq E \leq 1$). Durante esta fase de crecimiento geométrico de la amplificación, el número de ciclos requerido para alcanzar un valor de umbral particular (valor C_T o punto de cruzamiento), es inversamente proporcional al logaritmo $(1 + E)$. Así, de este modo, el valor C_T , representa una medida de la eficacia de la reacción, la cual permite comparaciones entre reacciones. Un decrecimiento de valor C_T , lo cual significa el hecho de que, la reacción ha alcanzado el valor del umbral en pocos ciclos, indica un incremento de la eficacia de la reacción. Puesto que el incremento en la amplificación del producto se gobierna, procediendo a medir el incremento en la fluorescencia de la reacción, el C_T , se define aquí, en este caso, como el número de ciclos de amplificación llevado a cabo, hasta que la fluorescencia haya excedido un nivel de fluorescencia arbitrario (AFL). El AFL, se eligió en un valor próximo al nivel de fluorescencia de la línea de base, pero por encima de la región de las fluctuaciones aleatorias en la fluorescencia medida, de tal forma que, la cinética

de la reacción, se midiera durante la fase de crecimiento geométrico de la amplificación. La acumulación del producto amplificado, en ciclos tardíos, inhibe la reacción y, eventualmente, conduce a un altiplanicie o plató de la reacción. Para todas las reacciones, se eligió un valor AFL de 1,5. Puesto que, la amplificación por PCR, consiste en ciclos discretos y que, las mediciones de fluorescencia, se llevan a cabo una vez por ciclo, la fluorescencia medida, se incrementa, de una forma típica, desde un valor por debajo al AFL, hasta un valor por encima del AFL, en un ciclo individual. Con objeto de mejorar la precisión de las mediciones, un número “exacto” de ciclos, para alcanzar el valor umbral de AFL, referido, en este caso, como el valor C_T o punto de cruzamiento, se calculó mediante la interpolación de mediciones de fluorescencia, entre ciclos.

1.2.2 Procedimientos

1.2.2.1 Desnaturalización de ADN

Se procedió a mezclar 100 µl de una dilución ADN metilada (de la firma Intergen, distribuido por la firma Serologicals Corporation, Norcross, GA, USA; Cat S 7821) (la dilución, correspondía a 100 ng / ensayo, aplicada en un marco de fondo de 1000 ng ADN humano, Roche Cat. 1691112; 4 replicados por procedimiento), y 12 µl de NaOH 2M, y se procedió a incubar, durante un transcurso de tiempo de 15 minutos, a una temperatura de 37°C.

1.2.2.2 Desaminación de ADN

Se procedió a mezclar 112 µl de ADN desnaturalizado con 200 µl de reactivo bisulfito (disulfito sódico 2,5 M, hidroquinona 135 mM, pH 5,1), y se procedió a incubar, durante un transcurso de tiempo de 20 horas, a una temperatura de 50°C (“condiciones estándar”).

Se procedió a mezclar 112 µl de ADN desnaturalizado con 200 µl de reactivo bisulfito (disulfito sódico 2,5 M, hidroquinona 135 mM, pH 5,1), y se procedió a incubar, durante un transcurso de tiempo de 2 horas, a una temperatura de 80°C (“PROCEDIMIENTO BIS”)

1.2.2.3 Procesado, utilizando partículas magnéticas de vidrio (MGPs)

Se procede a mezclar 312 µl de ADN desaminada (procedente de ambos procedimientos, respectivamente), con 600 µl de tampón de enlace (Equipo a modo de kit de aislamiento, del tipo “MagNa Pure DNA Isolation Kit I” Roche Cat. N° 3 003 990) y 75 µl de solución de partículas de vidrio (Equipo a modo de kit de aislamiento, del tipo “MagNa Pure DNA Isolation Kit I”) y se incuba durante un transcurso de tiempo de 15 minutos a la temperatura ambiente, mediante un régimen de agitación continua, con objeto de enlazar el ácido nucleico al MGPs, en concordancia con el procedimiento descrito en las solicitudes de patente europea números EP 02019097.1 o EP 02028114.3. A continuación de ello, las partículas de vidrio magnéticas (MGPs), se lavan tres veces, con 1 ml de etanol al 70%. Se realiza una separación libre de enlace, en un separador magnético (Roche Cat. 1641794). A continuación de ello, tiene lugar la desulfonación, procediendo a añadir 250 µl de EtOH al 38% / 100 mM NaCl / 200 mM NaOH al ADN enlazado a las MGPs; la mezcla, se incuba durante un transcurso de tiempo de 5 minutos, a la temperatura ambiente, mediante régimen de agitación. A continuación de ello, se procede a lavar las MGPs, dos veces, con etanol al 90%. Con objeto de desprenderse de los restos de etanol, las MGPs, se lavaron en unas condiciones correspondientes a un tiempo de 15 minutos / 60°C de temperatura, en un mezclador térmico, con tapa de cobertura abierta. A continuación de ello, el ADN, se eluye con 50 µl 10 mM tris / 0,1 mM EDTA pH 7,5 (15 minutos / 60°C). Se utilizan 10 µl de ADN eluido, para subsiguientes análisis de PCR.

1.2.2.4 Detección del ADN tratado con bisulfito, mediante la utilización de PCR específica en el instrumento del tipo “LightCycler® instrument”, en formato de sonda de hibridación (hyprobe-format)

1.2.4.1 Composición de la mezcla maestra

Sonda de hibridación maestra de ADN, para ciclador, del tipo “Light Cyclyer® FastSart ADN Master hibridation Probe 1x” (Roche 2239272), 2 mM $MgCl_2$, cebador avanzado 0,5 µM, Cebador invertido 0,5 µM, sonda donante 250 nM, sonda aceptante 250 nM, molde 10 µl, volumen total de PCR 20 µl.

1.2.2.4.2 Condiciones de PCR

Desnaturalización 10 minutos / 95°C

55 ciclos 95°C / 10 segundos
 95°C / 10 segundos – adquisición de señal
 72°C / 10 segundos – tiempo de gradiente
 de temperatura 20°C / seg.

Se procedió a procesar muestras, en paralelo, en la misma pasada, en el instrumento LightCycler®.

1.2.2.5 Resultados

Nº de ejemplo	Procedimiento BIS	Valor Ct	Valor medio Ct
1	"estándar"	30,08	
2	"estándar"	30,07	
3	"estándar"	30,13	
4	"estándar"	30,13	30,10
5	"Procedimiento BIS"	29,11	
6	"Procedimiento BIS"	30,14	
7	"Procedimiento BIS"	30,14	
8	"Procedimiento BIS"	29,58	29,74

5 Los puntos de cruzamiento, muestran que, el "procedimiento BIS" en concordancia con la presente invención, es ligeramente más sensible que el procedimiento "estándar".

1.2.3 Ejemplo: Variación de la temperatura y tiempo del procedimiento de bisulfito en concordancia con la invención

10 Los experimentos que se facilitan a continuación, se realizaron utilizando el ajuste experimental del ejemplo en 1.2.1, a cuyo efecto, la temperatura y el tiempo de incubación, se variaron, y se midieron los valores ct indicados.

Muestra	Tiempo de incubación [minutos]	Valor Ct	Temperatura	Valores Ct medios
1	180	28,56	80°C	28,35
2	180	28,15	80°C	
3	180	28,03	80°C	
4	180	28,64	80°C	
5	150	28,86	80°C	28,57
6	150	28,64	80°C	
7	150	28,08	80°C	
8	150	28,71	80°C	
9	120	28,94	80°C	28,94
10	120	29,02	80°C	
11	120	28,77	80°C	
12	120	29,04	80°C	
13	90	29,76	80°C	29,67
14	90	29,76	80°C	
15	90	29,60	80°C	
16	90	29,57	80°C	
17	60	30,06	95°C	30,86
18	60	29,86	95°C	
19	60	33,54	95°C	
20	60	30,01	95°C	

15 El experimento, muestra el hecho de que, la extensión del tiempo de incubación a 3 horas, no es crítico, mientras que, la reducción del tiempo de incubación, a 90 minutos, tiene como resultado una pequeña pérdida de sensibilidad. Resulta una mayor pérdida de sensibilidad, cuando el tiempo de incubación, se acorta a 60 minutos, pero, la temperatura de incubación, se eleva a un nivel de 95°C.

Lista de referencias

- 20 Abramson, R. D., y Myers, T.W., Curr. Opin. Biotechnol. 4 (1993) 41-47
 Ausubel, F., et al., in "Current protocols in molecular biology" (1994), eds. F. Ausubel, R. Brent y K. R.E., Wiley & Sons, New York
 Barany, F., PCR Meth. Appl. 1 (1991) 5-16
 25 Barany, F., Proc. Natl. Acad. Sci. USA 88 (1991) 189-193
 Clark, S.J., et al., Nucl. Acids Res. 22 (1994) 2990-2997
 EP 0 201 184
 EP 0 389 063
 EP 02 019 097
 30 EP 02 028 114
 EP-A 0 439 182
 EP-A-0 200 362

- Feil, R., et al., Nucl. Acids Res. 22 (1994) 695-696
 Frommer, M., et al., Proc. Natl. Acad. Sci. USA 89 (1992) 1827-1831
 Grigg, G., y Clark, S., Bioessays 16 (1994) 431-436
 Grigg, G.W., DNA Seq. 6 (1996) 189-198
 5 Grunau, C., et al., Nucl. Acids Res. 29 (2001) e65-5
 Guatelli, J. C., et al., Proc. Natl. Acad. Sci. USA 87 (1990) 1874-1878
 Hayatsu, H., et al., Biochem. 9 (1970) 2858-2865
 Hayatsu, H., et al., J. Am. Chem. Soc. 92 (1970) 724-726
 Komiyama, M., y Oshima, S., Tetrahedron Lett. 35 (1994) 8185-8188
 10 Kwoh, D. Y., et al., Proc. Natl. Acad. Sci. USA 86 (1989) 1173-1177
 Lottspeich y Zorbas, en "Bioanalytik" (1998), eds. L. a. Zorbas, Spektrum Akademischer Verlag, Heidelberg, Berlin, Alemania
 Oakeley, E. J., Pharmacol. Ther. 84 (1999) 389-400
 Olek, A., et al., Nucl. Acids Res. 24 (1996) 5064-5066
 15 Paulin, R., et al., Nucl. Acids Res. 26 (1998) 5009-5010
 Raizis, A.M., et al., Anal. Biochem. 226 (1995) 161-166
 Sambrook, J., et al., en "Molecular Cloning: A Laboratory Manual" (1989), eds. J. Sambrook, E. F. Fritsch y T. Maniatis, Cold Spring Harbor Laboratory Press, Cold Spring Harbor, NY
 Shapiro et al., JACS 92 (1970) 422-424
 20 Slae y Shapiro, J. Org. Chem. 43 (1978) 4197-4200
 Tasheva, E.S., y Roufa, D.J., Mol. Cell. Biol. 14 (1994) 5636-5644
 US 4.683.202
 US 5.130.238
 US 5.137.806
 25 US 5.210.015
 US 5.487.972
 US 5.595.890
 US 5.639.611
 US 5.786.146
 30 US 5.804.375
 US 6.174.670
 US 6.331.393
 Wang, R.Y., et al., Nucl. Acids Res. 8 (1980) 4777-4790
 Whelen, A.C., y Persing, D.H., Annu. Rev. Microbiol. 50 (1996) 349-373
 35 WO 00/32762
 WO 01/37291
 WO 01/98528
 WO 02/31186
- 40 Listado de secuencias
- <110> Roche Diagnostics GMBH
 F. Hoffmann – La Roche AG
- 45 <120> Procedimiento mejorado para tratamiento con bisulfito
- <130> 21581 WO
- <140>
 50 <141>
- <150> EP 03001854.3
 <151> 29-01-2003
- 55 <150> EP 030100120.0
 <151> 02-05-2003
- <160> 8
- 60 <170> PatentIn Ver. 2.1
 <210> 1
 <211> 20
 <212> ADN
 <213> Secuencia artificial

<220>
 <223> Descripción de Secuencia Artificial: secuencia sentido

5 <400> 1
 gaggggcgcc ctggagtccc 20

10 <210> 1
 <211> 20
 <212> ADN
 <213> Secuencia artificial

15 <220>
 <223> Descripción de Secuencia Artificial: secuencia antisentido

<400> 2

20 gggactccag ggcgcccctc 20

25 <210> 3
 <211> 20
 <212> ADN
 <213> Secuencia artificial

30 <220>
 <223> Descripción de Secuencia Artificial: secuencia sentido, c convertida a n, n denota desoxiuracilo

<400> 3
 gagggngnntggagtnnn 20

35 <210> 4
 <211> 20
 <212> ADN
 <213> Secuencia artificial

40 <220>
 <223> Descripción de Secuencia Artificial: secuencia antisentido, c convertida a n, n denota desoxiuracilo

<400> 4
 gggantnnag ggngnnnntrn 20

45 <210> 5
 <211> 11
 <212> ADN
 <213> Secuencia artificial

50 <220>
 <223> Descripción de Secuencia Artificial: oligonucleótido sintetizado

<400> 5
 ttttctttt t 11

55 <210> 6
 <211> 11
 <212> ADN
 <213> Secuencia artificial

60 <220>
 <223> Descripción de Secuencia Artificial: oligonucleótido sintetizado, c en la posición 6, se encuentra metilado

<400> 6

	ttttctttt t	11
5	<210> 7 <211> 11 <212> ADN <213> Secuencia artificial	
10	<220> <223> Descripción de Secuencia Artificial: oligonucleótido sintetizado, c convertido a n, n, denota desoxiuracilo <400> 7	
15	ttttntttt t	11
20	<210> 8 <211> 11 <212> ADN <213> Secuencia artificial	
25	<220> <223> Descripción de Secuencia Artificial: oligonucleótido sintetizado <400> 8 tttttttt t	

REIVINDICACIONES

1. Procedimiento para la conversión de una base de citosina, en un ácido nucleico, a una base de uracilo, que comprende las etapas de
5 a) incubar una solución que comprende el ácido nucleico, durante un período de tiempo de 1,5 a 3,5 horas, a una temperatura comprendida dentro de unos márgenes comprendidos entre 70 y 90°C, en donde, la concentración de bisulfito, en la solución, es de un valor comprendido dentro de unos márgenes situados entre 3 M y 6,25 M, y en donde, el valor de pH de la solución, es de un valor comprendido dentro de unos márgenes situados entre
10 5,25 y 5,75, en donde, el ácido nucleico, se desamina, y
 b) incubar la solución que comprende el ácido nucleico desaminado, en condiciones alcalinas, a cuyo efecto, el ácido nucleico desaminado, se desulfona.
2. Procedimiento, según la reivindicación 1, caracterizado por el hecho de que, en la etapa a), la temperatura, es de
15 valor comprendido entre 75 y 85°C.
3. Procedimiento, según una cualquiera de las reivindicaciones 1 o 2, caracterizado por el hecho de que, la concentración de bisulfito, es de un valor comprendido entre 3,2 M y 6 M.
- 20 4. Procedimiento, según una cualquiera de las reivindicaciones 1 a 3, caracterizado por el hecho de que el periodo de tiempo se encuentra comprendido entre 1,75 horas y 3 horas.
5. Procedimiento, según una cualquiera de las reivindicaciones 1 a 4, caracterizado por el hecho de que, el período de tiempo, se encuentra comprendido entre 2 horas y 3 horas.
25 6. Procedimiento, según una cualquiera de las reivindicaciones 1 a 5, caracterizado por el hecho de que, en la etapa a), la temperatura, es de 80°C, la concentración de bisulfito, es 5 M, el valor de pH de la solución, es de 5,5 y, el período de tiempo, se encuentra comprendido entre 2 y 3 horas.

Fig. 1

REACCION DE CITOSINAS, EN ACIDOS NUCLEICOS, CON BISULFITO

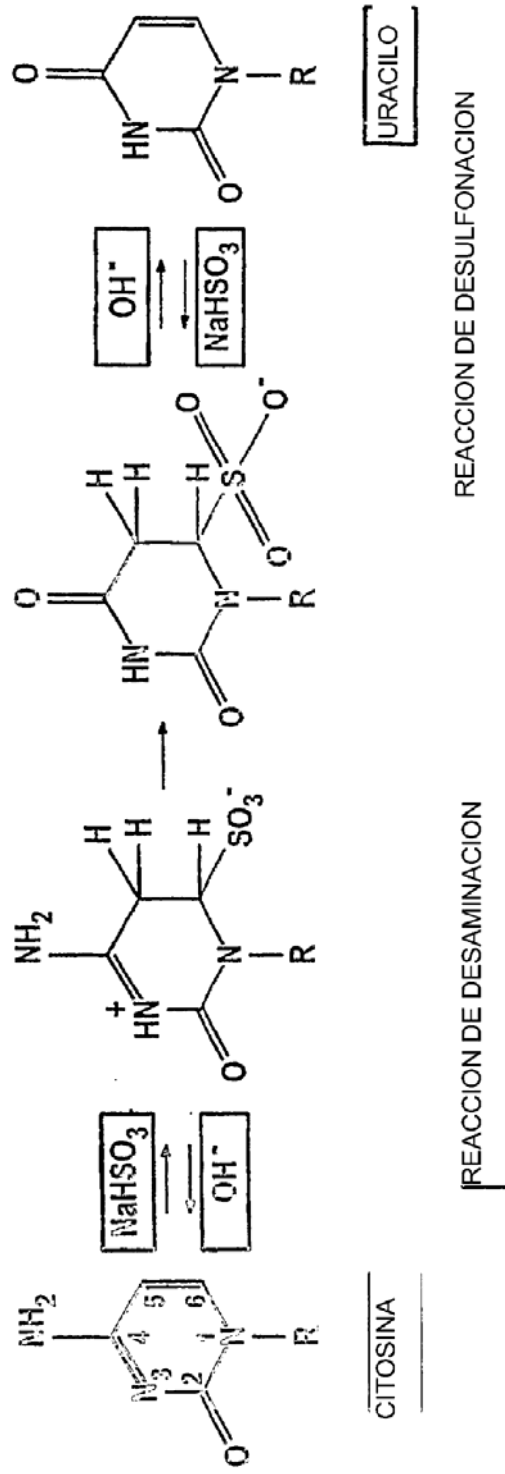


Fig. 2

ANALISTA: Gerhard

MUESTRA: ID: 2-5,5-80°C-10min-GSTP1 ds

Vial: C03

VOLUMEN DE INYECCION:40

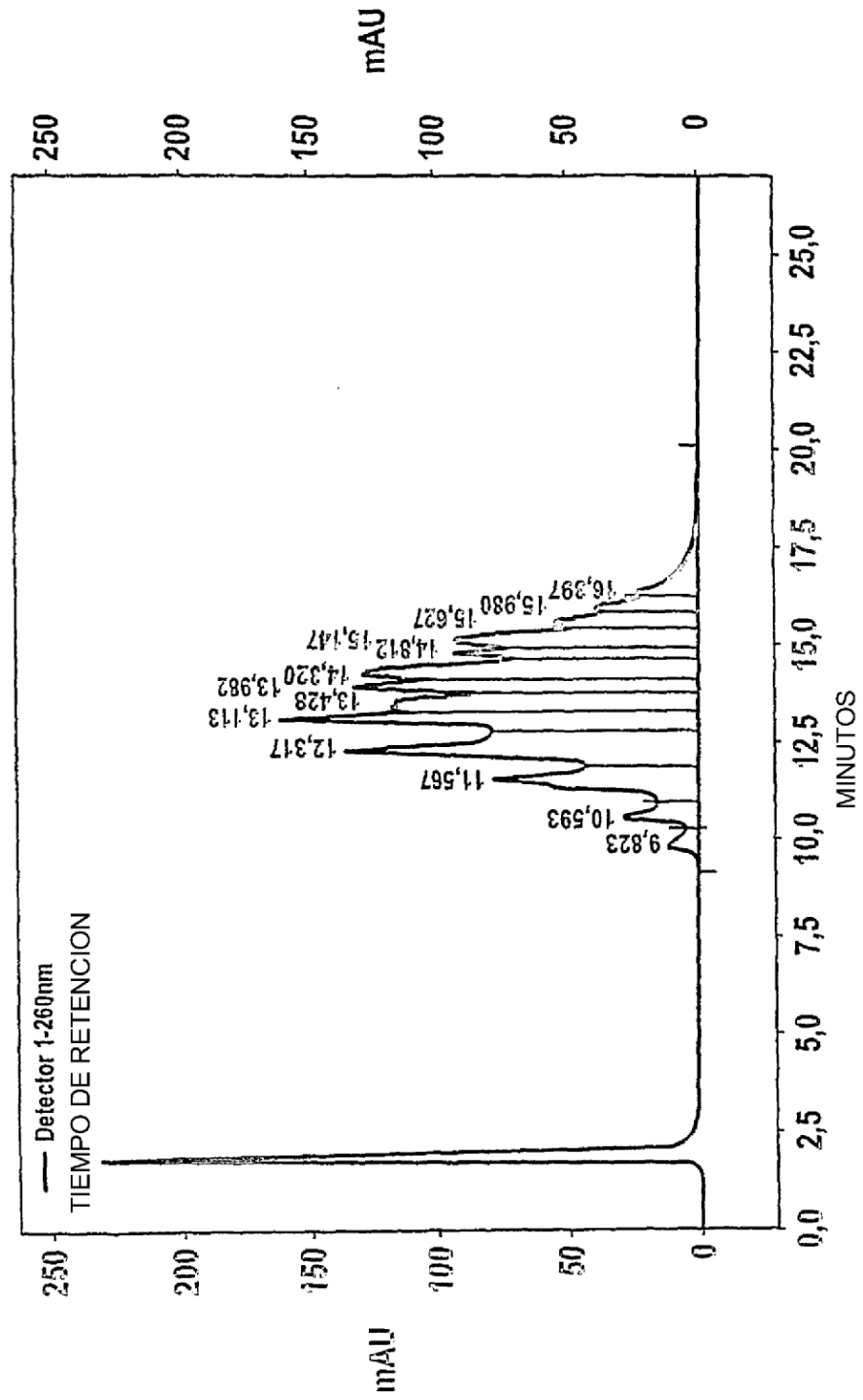


Fig. 3

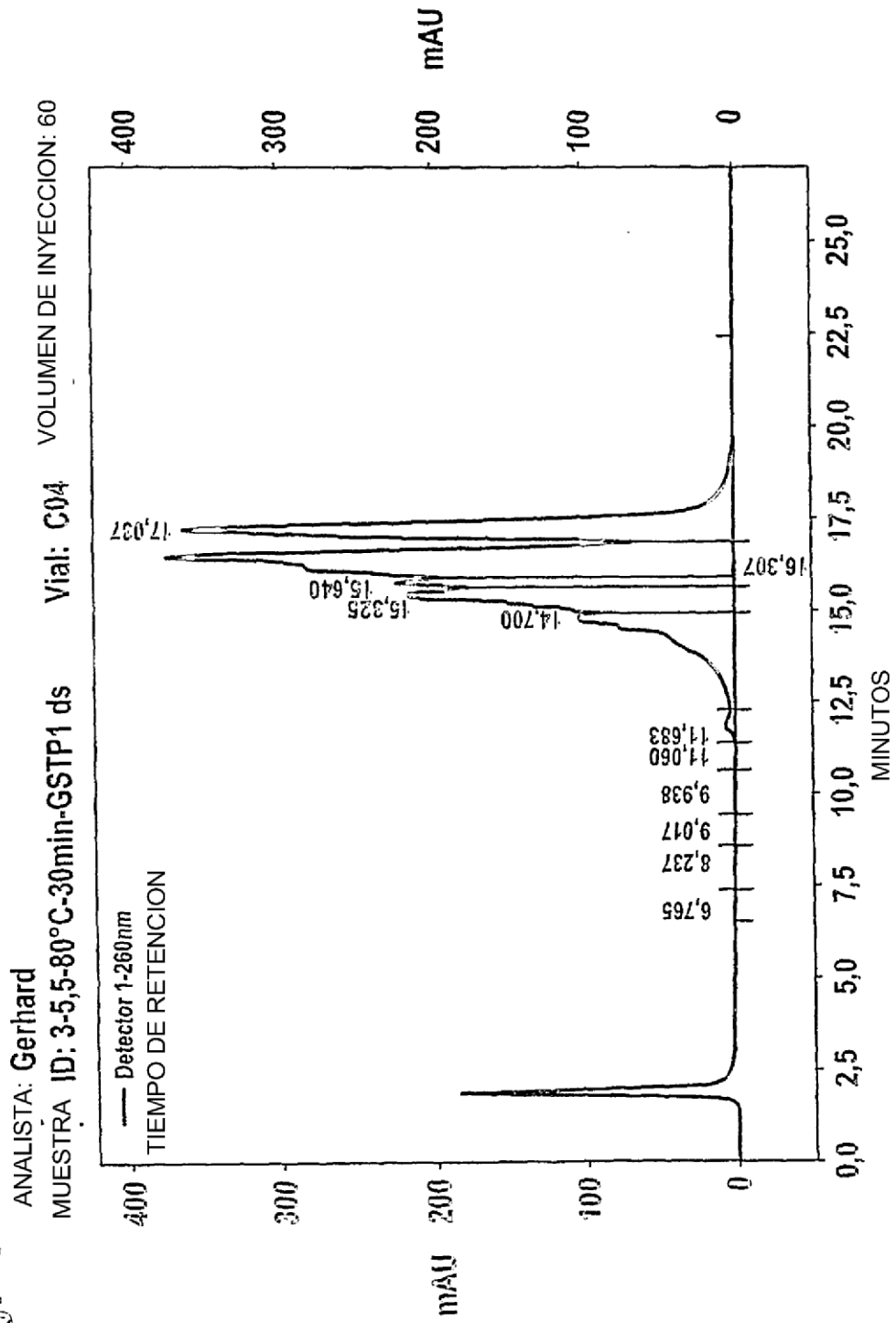


Fig. 4

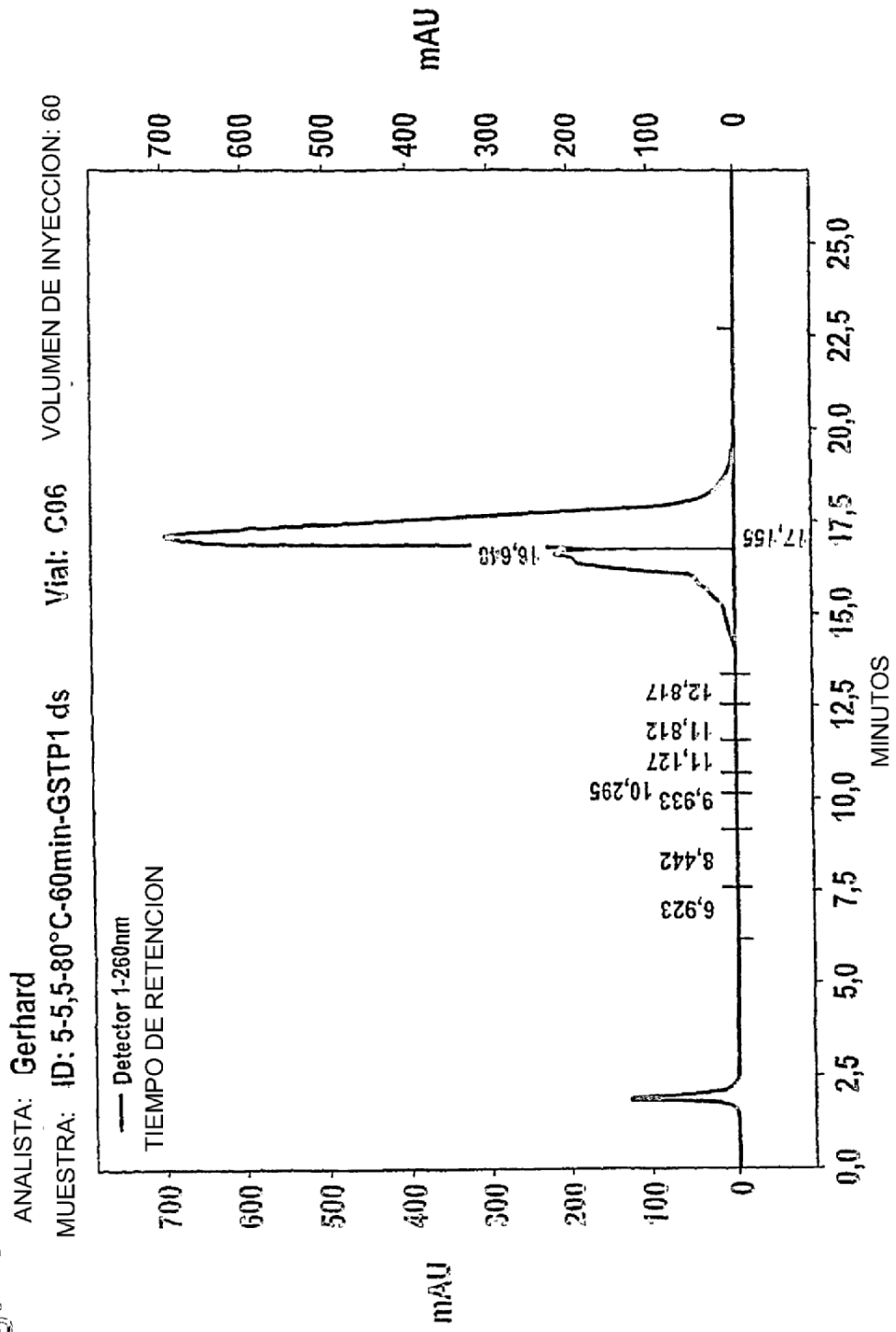


Fig. 5

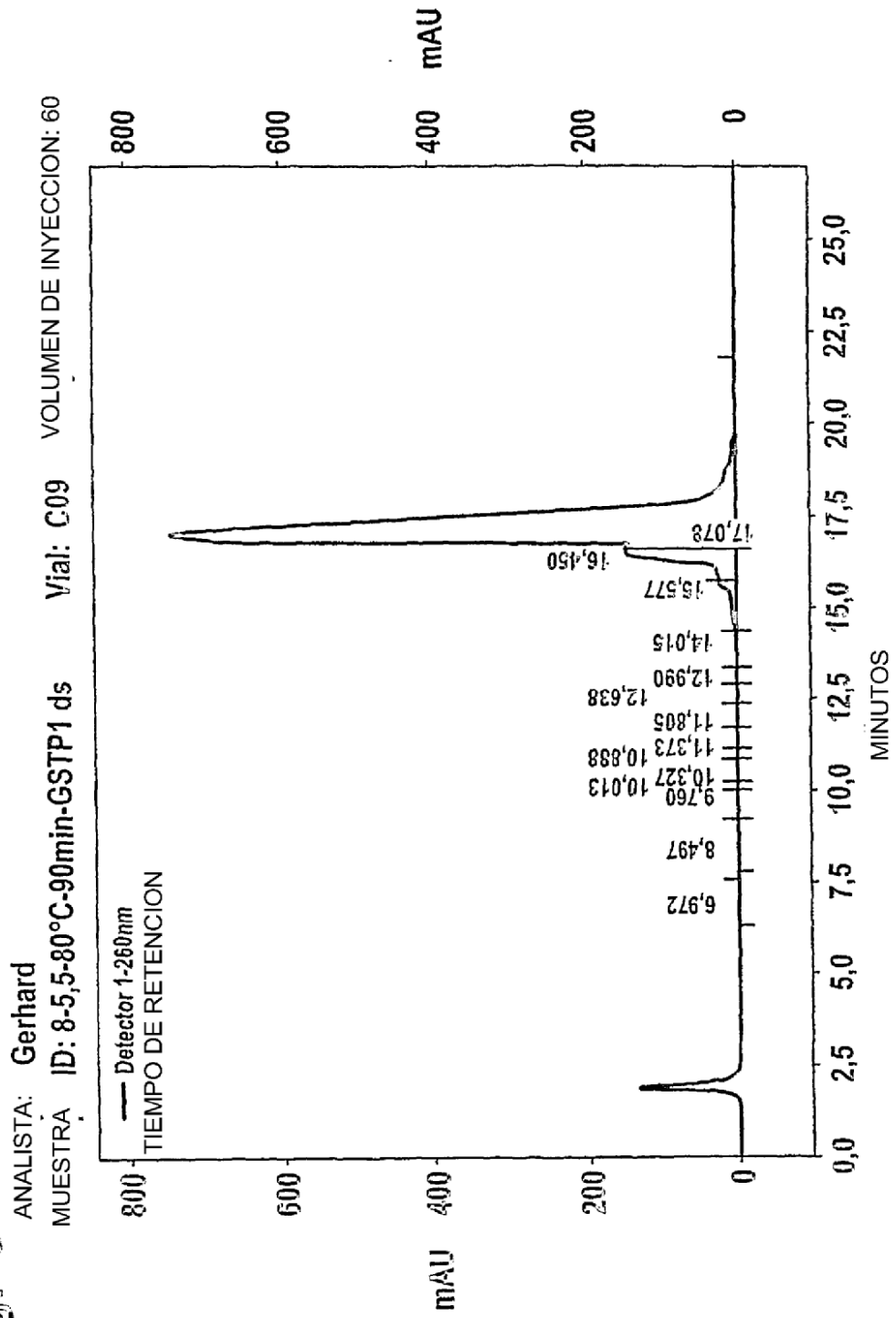


Fig. 6

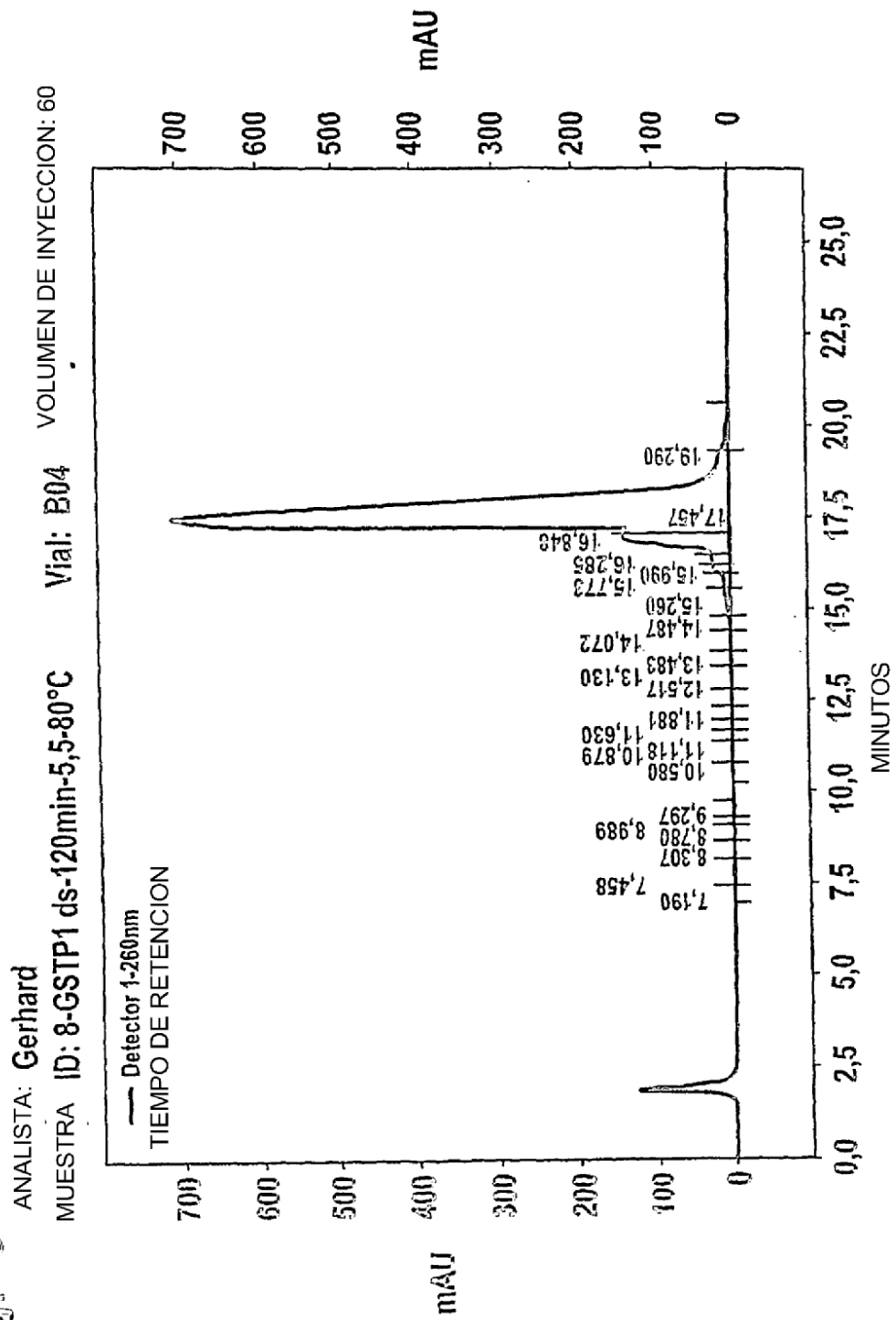


Fig. 7

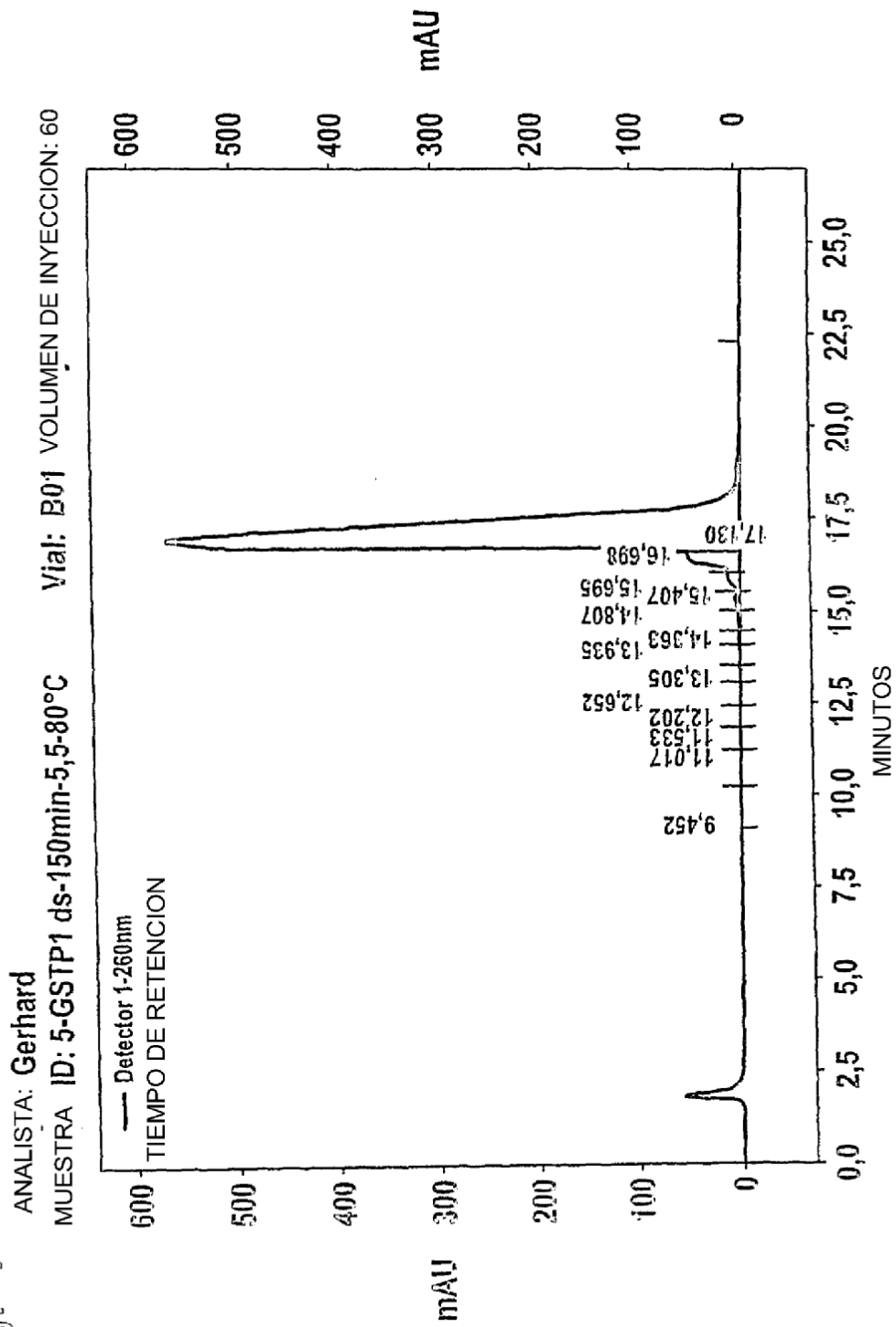


Fig. 8

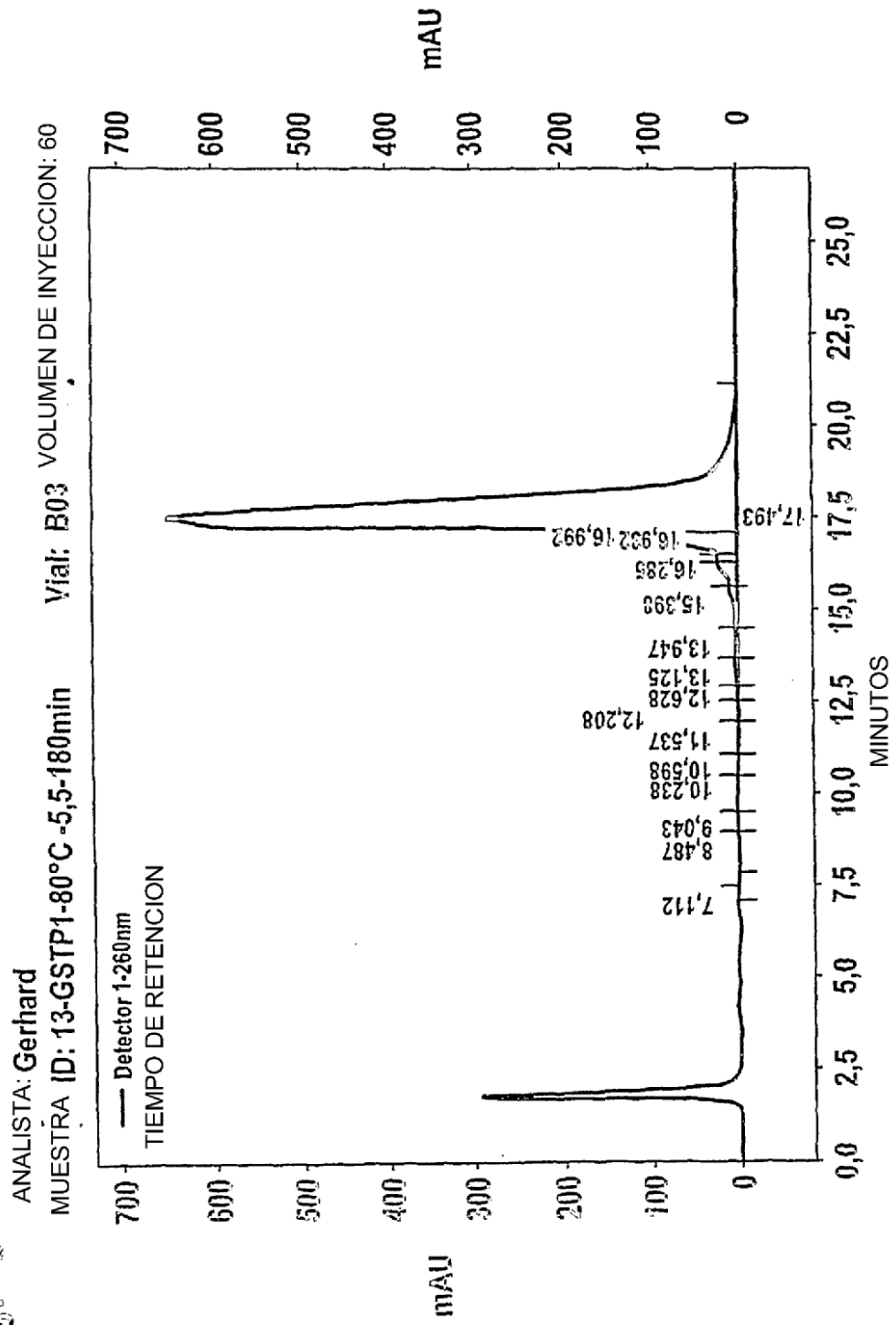


Fig. 9

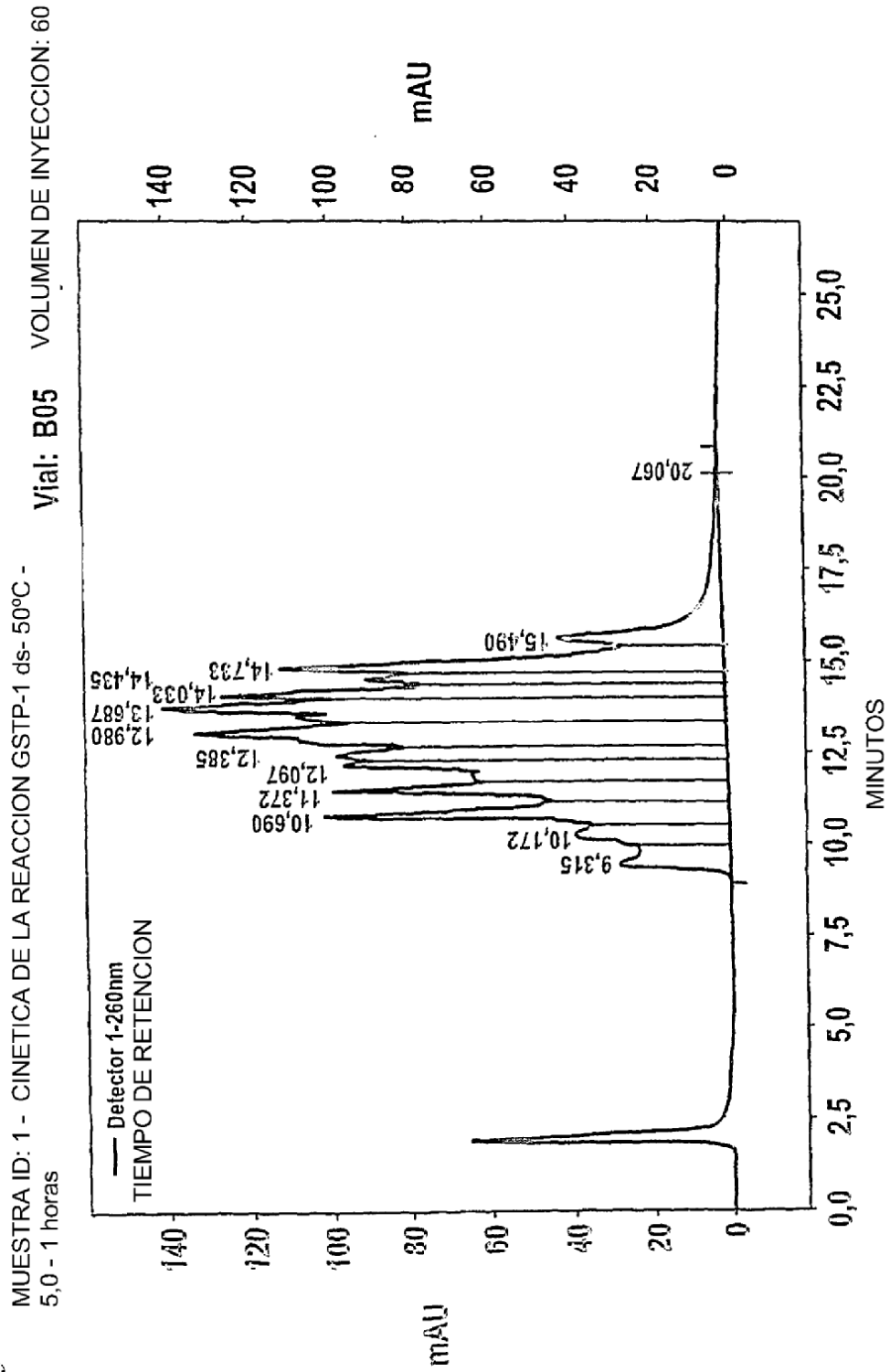


Fig. 10

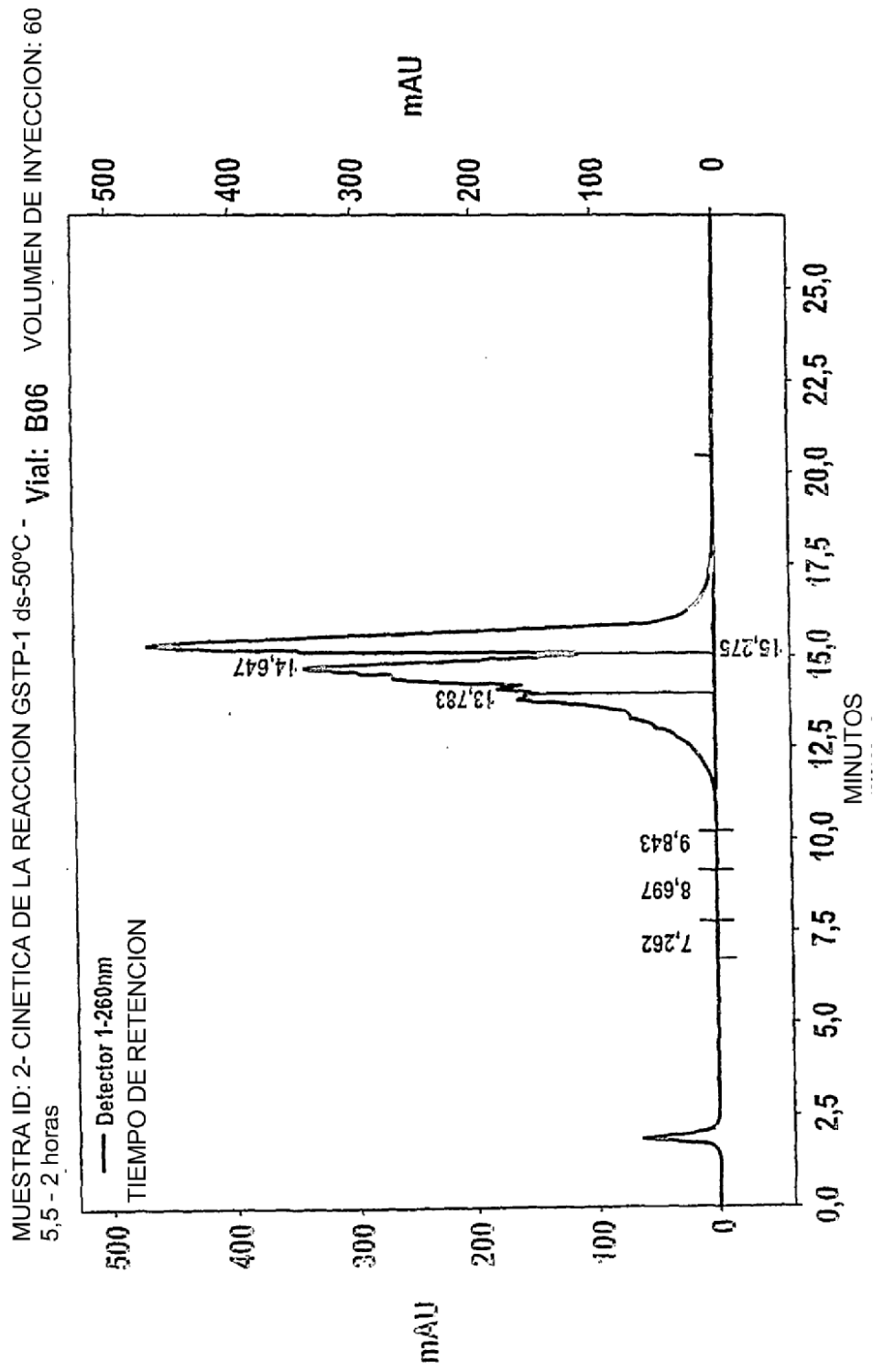


Fig. 11

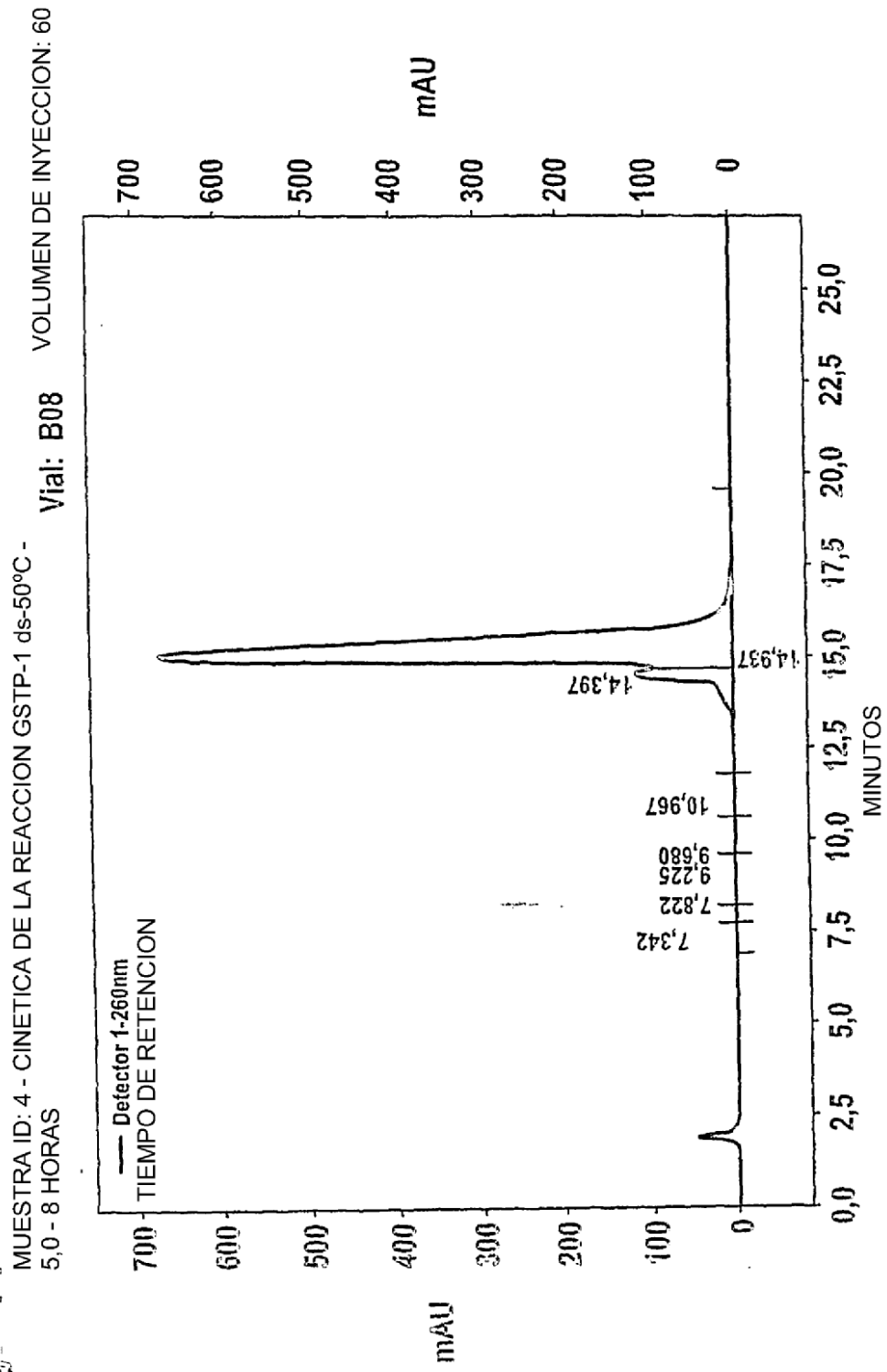


Fig. 12

ANALISTA: Gerhard

MUESTRA ID: B-GSPP1-50°C-16h-ph 5,0 Vial: B02 VOLUMEN DE INYECCION: 60

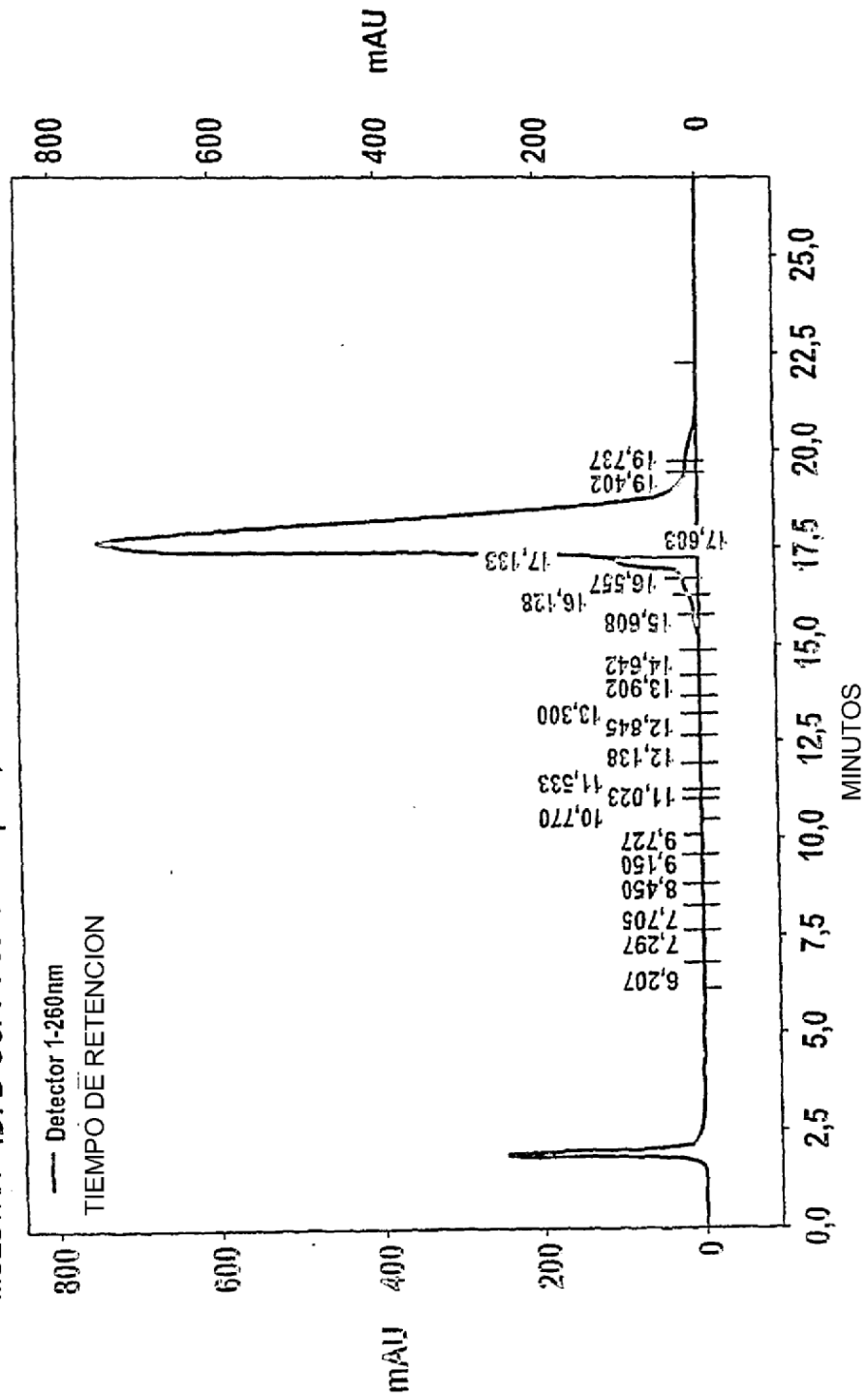


Fig. 13

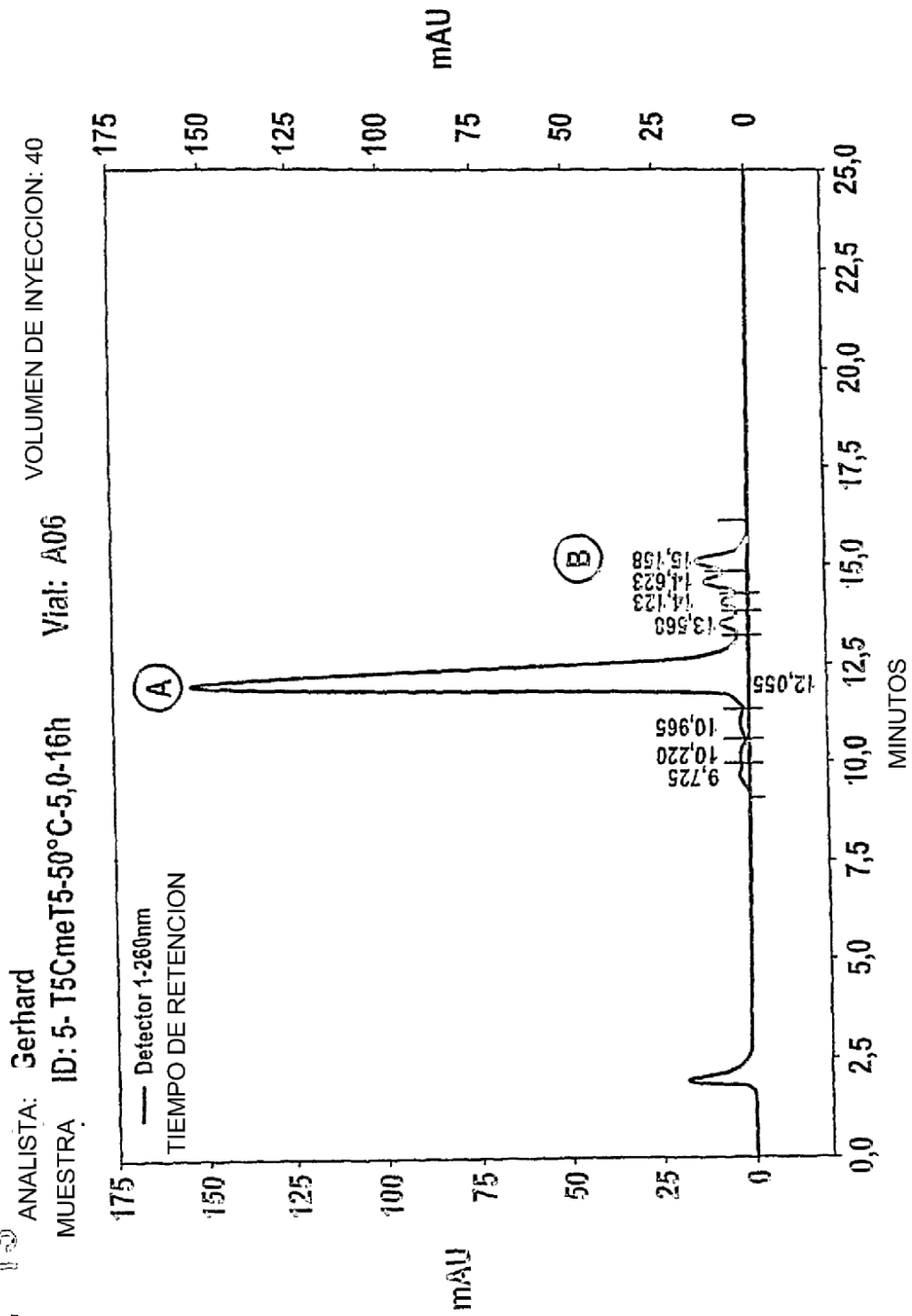


Fig. 14

ANALISTA: Gerhard

MUESTRA ID: 1-T5CmeT5-80°C-5,5-2h

Vial: A02 VOLUMEN DE INYECCION: 40

