



19



OFICINA ESPAÑOLA DE  
PATENTES Y MARCAS

ESPAÑA

11 Número de publicación: **2 287 049**

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

12

TRADUCCIÓN DE PATENTE EUROPEA

T3

86 Número de solicitud europea: **00993178 .3**

86 Fecha de presentación : **24.11.2000**

87 Número de publicación de la solicitud: **1232287**

87 Fecha de publicación de la solicitud: **21.08.2002**

54 Título: **Agrupación de oligómeros, con oligómeros de ANP y/o de ADN sobre una superficie.**

30 Prioridad: **25.11.1999 DE 199 57 827**

45 Fecha de publicación de la mención BOPI:  
**16.12.2007**

45 Fecha de la publicación del folleto de la patente:  
**16.12.2007**

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

72 Inventor/es: **Berlin, Kurt**

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

**ES 2 287 049 T3**

**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

Agrupación de oligómeros, con oligómeros de ANP y/o de ADN sobre una superficie.

5 El invento se refiere a una agrupación de oligómeros, con oligómeros de ANP (ácidos nucleicos peptídicos) y/o de ADN (ácidos desoxirribonucleicos) sobre una superficie.

10 Los planos de observación, bien estudiados después de los desarrollos metodológicos de los últimos años en la biología molecular, son los genes propiamente dichos, la traducción de estos genes en ARN (ácidos ribonucleicos) y las proteínas que resultan a partir de éstos. Cuando se conecta un cierto gen en el transcurso del desarrollo de un individuo, y cómo se regulan la activación y la inhibición de determinados genes en células y tejidos determinadas/os, se pueden correlacionar con la magnitud y el carácter de la metilación de los genes y respectivamente del genoma. Por consiguiente, es evidente la suposición de que ciertos estados patógenos se exteriorizan en un modelo modificado de metilación de genes individuales o del genoma.

15 La 5-metilcitosina es la base modificada covalentemente más frecuente en los ADN de células eucarióticas. Ella desempeña por ejemplo un cierto cometido en la regulación de la transcripción, en la impresión genómica y en la génesis de tumores. La identificación de una 5-metilcitosina como parte componente de una información genética presenta por lo tanto un considerable interés. Las posiciones con 5-metilcitosina no se pueden identificar sin embargo mediante secuenciación, puesto que la 5-metilcitosina tiene el mismo comportamiento de apareamiento de bases que la citosina. Además de esto, en el caso de una amplificación por PCR (reacción en cadena de una polimerasa) se pierde totalmente la información epigenética, que llevan las 5-metilcitosinas.

20 La modificación de la base genómica citosina para dar 5'-metilcitosina constituye el parámetro epigenético más importante y mejor investigado hasta hoy en día. A pesar de todo, existen hasta hoy en día ciertamente unos métodos, que comprenden determinar genotipos de células e individuos, pero todavía no hay ningún enfoque (punto de partida) comparable para generar y evaluar también en gran medida información epigenotípica.

25 Un método relativamente nuevo, y que entretanto se está aplicando con la mayor frecuencia, para la investigación de los ADN en cuanto a la existencia de 5-metilcitosina, se basa en la reacción específica de un bisulfito con citosina, que después de una subsiguiente hidrólisis en condiciones alcalinas es transformada en uracilo, que en su comportamiento de apareamiento de bases se corresponde con la timidina. Por el contrario, la 5-metilcitosina no es modificada en estas condiciones. Por consiguiente, el ADN original es transformado de tal manera que la metilcitosina, que originalmente no puede ser diferenciada de la citosina por medio de su comportamiento de hibridación, ahora puede ser detectada, mediante técnicas "normales" de biología molecular, como la citosina que ha quedado únicamente, por ejemplo mediante amplificación e hibridación o secuenciación. Todas estas técnicas se basan en un apareamiento de bases, que ahora se puede aprovechar totalmente. El estado de la técnica, en lo que concierne a la sensibilidad, es definido mediante un procedimiento, que encierra el ADN a investigar en una matriz de agarosa, de esta manera impide la difusión y la renaturalización del ADN (el bisulfito reacciona solamente en un ADN monocatenario) y reemplaza a todas las etapas de precipitación y purificación por una diálisis rápida (Olek, A. y colaboradores, Nucl. Acids. Res. 1996, 24, 5064-5066). Con este método se pueden investigar células individuales, lo cual demuestra el potencial del método. No obstante, hasta ahora se investigan solamente regiones individuales con una longitud hasta de aproximadamente 3.000 pares de bases, y no es posible una investigación global de células en cuanto a millares de posibles sucesos de metilación. No obstante, tampoco este procedimiento puede analizar de una manera confiable fragmentos muy pequeños a partir de pequeñas cantidades de muestras. Éstos se pierden, a pesar de la protección contra la difusión por medio de la matriz.

30 Una recopilación acerca de las posibilidades adicionales conocidas de detectar 5-metilcitosinas, se puede tomar de los siguientes artículos de compendio: Rein, T., DePamphilis, M. L., Zorbas, H., Nucleic Acids Res. 26, 2255 (1998).

35 Existen fundamentalmente varias posibilidades de producir agrupaciones de oligómeros sobre las más diferentes superficies:

40 1. Todos los oligómeros son producidos de una manera habitual individualmente y en una cantidad relativamente grande en un tubo de ensayo, o respectivamente en las máquinas automáticas especiales de síntesis, y después de esto se aplican con pipeta (se pipetea) individualmente sobre los soportes. Para esto se utilizan usualmente robots automáticos de alta precisión para micropipetear. La ventaja de este procedimiento consiste en que él se basa ampliamente en métodos y aparatos clásicos ya optimizados. De esta manera se pueden producir agrupaciones de ADN cualitativamente de alto nivel con oligómeros muy puros, lo cual tiene una influencia extremadamente positiva sobre la sensibilidad y la confiabilidad de la detección, que se pueden conseguir con la agrupación. La gran desventaja del procedimiento consiste en que es enormemente costoso y complicado, y por lo tanto caro. Esto es válido en medida especial para la síntesis de los oligómeros individuales.

45 2. Los oligómeros son sintetizados directamente por adición con pipeta (pipeteo) en pequeñas cantidades directamente sobre el sustrato. Sobre cada punto de la retícula se constituye la cadena de oligómeros allí prevista en una modalidad de nucleobase por nucleobase. Para el pipeteo se utiliza, de manera similar a como en el procedimiento 1), un robot especializado para micropipetear o, p.ej., un dispositivo que contiene

canales para la aportación de eslabones de síntesis individuales en los respectivos puntos o sitios de la agrupación (documento de solicitud de patente europea EP-A 0915897). El procedimiento químico de síntesis es fundamentalmente el mismo que en el caso de la síntesis habitual de oligómeros en máquinas automáticas de síntesis. La diferencia consiste en que todos los oligómeros, independientemente de su número, son producidos al mismo tiempo por una única instalación automática, directamente en el sitio previsto para la determinación. Las etapas de trabajo separadas en el caso del método 1), síntesis de oligómeros y micropipeteo, se reúnen entonces en una única etapa de trabajo. El gasto en aparatos y en trabajo manual es reducido considerablemente en comparación con el método 1).

3. Los oligómeros, igual que en el caso del método 2) se sintetizan directamente sobre el sustrato, pero la fijación deliberada de las nucleobases correctas a los puntos correctos de la retícula se realiza sin embargo mediante una técnica fotolitográfica totalmente paralela, que procede de la fabricación de semiconductores, en lugar de etapas de pipeteo secuenciales, exactamente en sitio deseado. El procedimiento se basa en el hecho de que con una luz de una determinada longitud de onda se pueden eliminar deliberadamente los grupos protectores 5'-OH de oligonucleótidos. Mediante apropiados modelos locales de irradiación se puede hacer por consiguiente que los extremos de oligonucleótidos sean capaces de reaccionar exactamente en aquellos puntos de la retícula, a los cuales en la siguiente etapa se quiere fijar un nuevo eslabón de nucleótido. En el caso de una mojadura total de la superficie de la agrupación con una solución de eslabones de nucleótidos, una nucleobase se fija por consiguiente solamente en los sitios previamente iluminados (irradiados), todos los sitios no iluminados permanecen inalterados. Los modelos locales de iluminación se generan colocando entre el sustrato y la fuente de luz una máscara microfotográfica de blanco y negro, que cubre a todos los sitios de la retícula, que no deben ser hechos capaces de reaccionar. La prolongación por una nucleobase de las cadenas de oligómeros a todos los puntos de la retícula se realiza por consiguiente de la siguiente manera: Con ayuda de una primera máscara se iluminan exactamente aquellos puntos de la retícula que deben ser ampliados por la primera de las 4 especies posibles de nucleobases (p.ej. la C). Después de esto la agrupación es mojada con una solución del correspondiente eslabón de nucleótido, después de lo cual se prolongan por esta base solamente los puntos iluminados. Puesto que los eslabones de nucleótidos fijados de nuevas todavía disponen en su totalidad de un grupo protector, ellos no reaccionarán adicionalmente en las siguientes etapas, hasta que sus grupos protectores sean separados mediante una iluminación adicional. Después de esta etapa de reacción, la agrupación es lavada. Seguidamente, con ayuda de una segunda máscara, se iluminan exactamente aquellos sitios de la retícula que deben ser ampliados por la segunda de las 4 posibles nucleobases (p.ej. la T). A continuación de esto, la agrupación es mojada de nuevo con una solución del correspondiente eslabón de nucleótido y los sitios iluminados son prolongados de esta manera por esta base. De una manera exactamente igual se procede para las dos nucleobases remanentes (las G y A). Para la prolongación de todos los oligómeros por una nucleobases se necesitan, como consecuencia de esto, cuatro etapas de iluminación y por consiguiente 4 fotomáscaras.

Este método, a causa del alto paralelismo en el tratamiento, es muy rápido y eficiente, y además de esto es bien apropiado para conseguir unas densidades muy altas de retículas, a causa de la alta precisión que se puede conseguir con una fotolitografía.

Una recopilación acerca del estado de la técnica en la producción de agrupaciones de oligómeros se puede tomar también de una edición especial de Nature, aparecida en Enero de 1999 (suplemento de Nature Genetics, volumen 21, Enero 1999) y de la bibliografía allí citada.

Las patentes, que se refieren de un modo general a la utilización de agrupaciones de oligómeros y al diseño fotolitográfico de máscaras, son p.ej. los documentos de patentes de los EE.UU. US-A 5.837.832, US-A 5.856.174, de solicitud de patente internacional WO-A 98/27430 y de patente de los EE.UU. US-A 5.856.101. Además, existen algunas patentes de sustancias y procedimientos, que restringen a los nucleósidos la utilización de grupos protectores inestables frente a luz, así p.ej. los documentos WO-A98/39348 y US-A 5.763.599.

Con el fin de inmovilizar a un ADN, existen diferentes procedimientos. El procedimiento más conocido es la fijación firme de un ADN, que está funcionalizado con biotina, a una superficie revestida con estreptavidina. La intensidad de fijación de este sistema corresponde a una fijación química covalente, sin ser de este tipo. Con el fin de poder fijar un ADN diana por un enlace covalente a una superficie químicamente preparada de modo previo, se necesita una funcionalidad correspondiente del ADN diana. Un ADN propiamente dicho no posee ninguna funcionalización, que sea apropiada. Existen diferentes variantes para introducir una funcionalización apropiada en un ADN diana. Dos funcionalizaciones fáciles de manipular son las de aminas y tioles alifáticas/os primarias/os. Tales aminas se hacen reaccionar cuantitativamente con ésteres de N-hidroxi-succinimida y los tioles reaccionan, en condiciones apropiadas, cuantitativamente con yoduros de alquilo. Una dificultad consiste en la introducción de una de tales funcionalizaciones en un ADN. La variante más sencilla es la introducción mediante un cebador de una PCR (reacción en cadena de la polimerasa). Las variantes mostradas usan unos cebadores modificados en 5' (con NH<sub>2</sub> y SH) y un engarzador bifuncional.

Un componente esencial de la inmovilización sobre una superficie es su constitución. Los sistemas que se han descrito hasta ahora están formados predominantemente por silicio o por un metal (perlas magnéticas). Un método adicional para la fijación de un ADN diana se basa en utilizar una corta secuencia de reconocimiento (p.ej. de 20 bases) en el ADN diana para la hibridación con un oligonucleótido inmovilizado en la superficie.

## ES 2 287 049 T3

Como sondas, que en una agrupación de oligómeros son fijadas sobre una superficie, entran en cuestión ciertos oligonucleótidos, pero se aconseja también cualquier modificación de ácidos nucleicos, p.ej. ácidos nucleicos peptídicos (ANP) (Nielsen, P.E., Buchardt, O., Egholm, M. y Berg, R.H. 1993. Peptide nucleic acids [Ácidos nucleicos peptídicos]. Patente de los EE.UU. 5.539.082; Buchardt, O., Egholm, M., Berg, R.H. y Nielsen, P.E. 1993. Peptide nucleic acids and their potential applications in biotechnology [Ácidos nucleicos peptídicos y sus aplicaciones potenciales en biotecnología. Trends in Biotechnology [Tendencias en biotecnología], 11: 384-386), fósforotioato-oligonucleótidos o metilfosfonato-oligonucleótidos. La especificidad de una sonda es muy esencial. Los ácidos nucleicos peptídicos tienen un entramado no cargado eléctricamente, que se diferencia al mismo tiempo en el sentido químico muy grandemente de la habitual estructura de fosfato de azúcar del entramado en ácidos nucleicos. El entramado de un ANP tiene una secuencia de amidas en lugar del entramado de fosfatos de azúcares de un ADN habitual. Un ANP se hibrida muy bien con una secuencia complementaria de un ADN. La temperatura de fusión de un híbrido de un ANP y un ADN es más alta que la del correspondiente híbrido de un ADN y otro ADN, y la dependencia con respecto de la hibridación de sales tamponadoras es relativamente pequeña.

La espectrometría de masas por desorción/ionización mediante láser, asistida por una matriz (MALDI, de Matrix Assisted Laser Desorption / Ionisation), es un nuevo desarrollo muy eficiente para el análisis de biomoléculas (Karas, M. y Hillenkamp, F. (1988), Laser desorption ionization of proteins with molecular masses exceeding 10.000 daltons [Ionización y desorción por láser de proteínas con unas masas moleculares que superan los 10.000 daltones]. Anal Chem. 60: 2299-2301). Una molécula de un analito es embebida en una matriz absorbente de la luz UV. Mediante un corto impulso de láser, la matriz es evaporada en vacío y el analito es transportado de esta manera sin fragmentar a la fase gaseosa. Una tensión eléctrica aplicada acelera a los iones en un tubo de vuelo exento de campo. A causa de sus diferentes masas, los iones son acelerados con diversa intensidad. Los iones más pequeños llegan al detector antes que los mayores, y el tiempo de vuelo es convertido por cálculo en la masa de los iones.

En el documento WO 93/25563 se describe la utilización de un soporte sólido para la detección de secuencias de ácidos nucleicos. En particular, se describe en este caso un procedimiento para determinar si una determinada secuencia de ADN o ARN está contenida en una muestra.

Además, en el documento WO 99/28498 se describe un procedimiento para la caracterización, la clasificación y la diferenciación de tejidos y de tipos de células, para la predicción del comportamiento de tejidos y de grupos de células y para la identificación de genes que se han modificado en su expresión, mediante un análisis de la metilación.

Además, en el documento WO 01/27317 se describe un procedimiento para la diferenciación de las modificaciones de la metilación en posición 5 de bases de citosina y de mutaciones de citosina a timina, y para la detección de polimorfismos de nucleótidos singulares (SNP's, de Single Nucleotide Polymorphisms) o mutaciones puntuales en un ADN genómico.

Es una misión del presente invento poner a disposición agrupaciones de oligómeros, que sean apropiadas especialmente para la detección de metilaciones de citosina.

El problema plantado por esta misión se resuelve conforme al invento mediante el recurso de que se proporciona una agrupación de oligómeros, con oligómeros de ANP (ácidos nucleicos peptídicos) y/o de ADN sobre una superficie, que comprende oligómeros a base en cada caso de entre 6 y 20 monómeros o nucleobases, abarcando éstas en cada caso por lo menos una secuencia de la fórmula general DDCGDD o de la fórmula general DDTGDD o de la fórmula general HHCGHH o de la fórmula general HHCAHH,

significando

H una de las bases adenina (A), citosina (C) o timina (T), y representando

D una de las bases adenina (A), guanina (G) o timina (T),

y estando correlacionado el sitio de los oligómeros sobre la superficie con la secuencia de los oligómeros.

Es preferido conforme al invento que por lo menos un 10% de los oligonucleótidos abarque una secuencia de la fórmula general DDCGDD o de la fórmula general DDTGDD o de la fórmula general HHCGHH o de la fórmula general HHCAHH.

Es preferido conforme al invento también que por lo menos un 25% de los oligonucleótidos abarque una secuencia de la fórmula general DDCGDD o de la fórmula general DDTGDD o de la fórmula general HHCGHH o de la fórmula general HHCAHH.

Es preferido conforme al invento también además que por lo menos un 50% de los oligonucleótidos abarque una secuencia de la fórmula general DDCGDD o de la fórmula general DDTGDD o de la fórmula general HHCGHH o de la fórmula general HHCAHH.

## ES 2 287 049 T3

Es preferido conforme al invento igualmente que por lo menos un 75% de los oligonucleótidos abarque una secuencia de la fórmula general DDCGDD o de la fórmula general DDTGDD o de la fórmula general HHC GHH o de la fórmula general HHCAHH.

5 Es preferido conforme al invento que la superficie sea plana y que los oligómeros estén dispuestos sobre ella en una retícula rectangular o hexagonal, que permita la asociación a unas coordenadas. Sin embargo, se pueden escoger también otras convenientes disposiciones geométricas, que ayuden a mejorar las posibilidades de automatización, tales como por ejemplo disposiciones circulares.

10 Es preferida una agrupación de oligómeros que comprende secuencias de la fórmula general DDCGDD y de la fórmula DDTGDD y de la fórmula general HHC GHH y de la fórmula general HHCAHH.

Es preferida especialmente una agrupación de oligómeros que comprende secuencias de la fórmula general DDCGDD y de la fórmula general DDTGDD o secuencias de la fórmula general HHC GHH y de la fórmula general  
15 HHCAHH.

Se prefiere en este contexto que esta agrupación comprenda por lo menos 100 diferente oligómeros.

Se prefiere conforme al invento una agrupación de oligómeros conforme al invento, que está caracterizada porque  
20 adaptándose a cada uno de los oligómeros, que comprende una secuencia CG, está inmovilizado un oligómero análogo, que se diferencia del mencionado oligómero solamente en el hecho de que él, en lugar de la secuencia CG, contiene una secuencia TG o sino una secuencia CA. Se prefiere además que la superficie sea de vidrio.

Se prefiere también que la superficie sea de un metal o de otro material conductivo. Se prefiere muy especialmente  
25 en este contexto que la superficie sea el objetivo (en inglés target) de un espectrómetro de masas MALDI.

El presente invento describe por consiguiente agrupaciones de oligómeros, que se pueden utilizar para la detección del estado de metilación de muestras de ADN genómico.

30 Un objeto adicional del presente invento es, por lo tanto, la utilización de una agrupación de oligómeros conforme al invento para la hibridación de fragmentos de ADN, después de una precedente amplificación.

Es especialmente preferido en este contexto que el ADN sea tratado antes de la amplificación con una solución de un bisulfito (o con una solución de un hidrógeno-sulfito o disulfito).  
35

Un objeto adicional del presente invento es también la utilización de una agrupación de oligómeros conforme al invento para la detección de metilaciones de citosina en un ADN genómico.

Es objeto del presente invento, por lo tanto, una disposición, preferiblemente en forma de una agrupación de  
40 oligómeros, de oligómeros de ANP (ácidos nucleicos peptídicos) o de ADN sobre una superficie, que comprende oligómeros a base en cada caso de entre 6 y 20 monómeros (o nucleobases), que a su vez comprenden secuencias de la fórmula general DDCGDD y/o de la fórmula general DDTGDD y/o de la fórmula general HHC GHH y/o de la fórmula general HHCAHH, permitiendo el sitio del oligómero sobre la superficie en cada caso sacar una conclusión acerca de su(s) secuencia(s). Las agrupaciones de oligómeros de este tipo son especialmente apropiadas para  
45 la detección de metilaciones de citosina en un ADN genómico. Las secuencias arriba expuestas se hibridan con diferente intensidad, dependiendo del estado de metilación del ADN, después de su previo tratamiento químico con un bisulfito.

Con el fin de poder asociar las señales, que parten de estas hibridaciones, mejor a las secuencias de oligómeros que  
50 se emplean, es especialmente preferido que la superficie sea plana y que los oligómeros estén dispuestos sobre ella en una retícula rectangular o hexagonal, que permita la asociación a unas coordenadas.

Es especialmente preferida una disposición de oligómeros de ANP (ácidos nucleicos peptídicos) o de ADN sobre una superficie, que comprende oligómeros a base en cada caso de entre 6 y 20 monómeros (o nucleobases), que  
55 comprende secuencias de la fórmula general DDCGDD y de la fórmula general DDTGDD y de la fórmula general HHC GHH y de la fórmula general HHCAHH, permitiendo el sitio del oligómero sobre la superficie en cada caso sacar una conclusión acerca de su(s) secuencia(s).

Es especialmente preferida una disposición de oligómeros de ANP (ácidos nucleicos peptídicos) o de ADN sobre una superficie, que comprende oligómeros a base en cada caso de entre 6 y 20 monómeros (o nucleobases) de la fórmula general DDCGDD y de la fórmula general DDTGDD, permitiendo el sitio de los oligómeros sobre la superficie en cada caso sacar una conclusión acerca de su(s) secuencia(s).  
60

Es especialmente preferida una disposición de oligómeros de ANP (ácidos nucleicos peptídicos) o de ADN sobre una superficie, que comprende oligómeros a base en cada caso de entre 6 y 20 monómeros (o nucleobases) de la fórmula general HHC GHH y de la fórmula general HHCAHH, permitiendo el sitio de los oligómeros sobre la superficie en cada caso sacar una conclusión acerca de su(s) secuencia(s).  
65

## ES 2 287 049 T3

Es especialmente preferido además que la disposición comprenda por lo menos 100 diferentes oligómeros, que en cada caso comprenden una de las secuencias DDCGDD, DDTGDD, HHCGHH o HHCAHH.

5 En una forma de realización especialmente preferida, la superficie de la disposición se compone de vidrio. En otra forma de realización preferida adicional, la superficie de la disposición se compone de un metal o de otro material conductor. En una forma de realización asimismo especialmente preferida, la disposición está caracterizada porque la superficie es el objetivo de un espectrómetro de masas MALDI.

10 Es objeto del presente invento, además, la utilización de una disposición de oligómeros de ANP (ácidos nucleicos peptídicos) o de ADN sobre una superficie, que comprende oligómeros a base en cada caso de entre 6 y 20 monómeros (o nucleobases), que a su vez comprenden secuencias de la fórmula general DDCGDD y/o de la fórmula general DDTGDD y/o de la fórmula general HHCGHH y/o de la fórmula general HHCAHH, permitiendo el sitio de los oligómeros sobre la superficie en cada caso sacar una conclusión acerca de su(s) secuencia(s), para la hibridación de fragmentos de ADN, que previamente habían sido amplificados.

15 Es especialmente preferido en este contexto el empleo de fragmentos de ADN, que habían sido producidos mediante la reacción en cadena de la polimerasa (PCR).

20 Es especialmente preferida además la utilización de una disposición de oligómeros de ANP (ácidos nucleicos peptídicos) o de ADN sobre una superficie, que comprende oligómeros a base en cada caso de entre 6 y 20 monómeros (o nucleobases), que a su vez comprenden secuencias de la fórmula general DDCGDD y/o de la fórmula general DDTGDD y/o de la fórmula general HHCGHH y/o de la fórmula general HHCAHH, permitiendo el sitio de los oligómeros sobre la superficie en cada caso sacar una conclusión acerca de su(s) secuencia(s), para la hibridación de un ADN, que previamente había sido tratado con una solución de un bisulfito (o de un hidrógeno-sulfito, o disulfito). De manera especialmente preferida, el ADN había sido amplificado.

30 Es especialmente preferida además la utilización de una disposición de oligómeros de ANP (ácidos nucleicos peptídicos) o de ADN sobre una superficie, que comprende oligómeros a base en cada caso de entre 6 y 20 monómeros (o nucleobases), que a su vez comprenden secuencias de la fórmula general DDCGDD y/o de la fórmula general DDTGDD y/o de la fórmula general HHCGHH y/o de la fórmula general HHCAHH, permitiendo el sitio de los oligómeros sobre la superficie sacar en cada caso una conclusión acerca de su(s) secuencia(s), para la detección de metilaciones de citosina en un ADN genómico.

35 En la Figura 1 se explica a modo de ejemplo la utilización conforme al invento de las agrupaciones de oligómeros conformes al invento para la detección de modelos de metilación de citosina en un ADN genómico.

En la Figura 1, las letras H, D y N tienen los siguientes significados:

40 H representa una de las bases adenina (A), citosina (C) o timina (T),

D representa una de las bases adenina (A), guanina (G) o timina (T), y

N significa una de las bases adenina (A), guanina (G), citosina (C) o timina (T).

45 Unas secuencias de ADN, que se diferencian solamente en la metilación de citosina, proporcionan, después del tratamiento con un bisulfito, una secuencia modificada de las nucleobases. La citosina metilada no es modificada por el tratamiento con un bisulfito, mientras que la citosina no metilada es transformada en timina. Esto conduce, después de la amplificación, a diferentes secuencias, que entonces se fijan a diferentes sitios de la agrupación de oligómeros, en los cuales están presentes secuencias complementarias. Por consiguiente, puesto que son conocidas las secuencias en la agrupación de oligómeros, es posible sacar una conclusión acerca de una metilación de la citosina existente en el ADN original.

55

60

65

REIVINDICACIONES

1. Agrupación de oligómeros, con oligómeros de ANP (ácidos nucleicos peptídicos) y/o de ADN sobre una superficie, que comprende oligómeros a base en cada caso de entre 6 y 20 monómeros o nucleobases, comprendiendo la agrupación de oligómeros por lo menos 100 diferentes oligómeros, y comprendiendo

a) por lo menos un 50% de los oligómeros unas secuencias de las fórmulas generales

DDCGDD y DDTGDD

o

b) por lo menos un 50% de los oligómeros unas secuencias de las fórmulas generales

HHCGHH y HHCAHH;

significando

H una de las bases adenina (A), citosina (C) o timina (T), y representando

D una de las bases adenina (A), guanina (G) o timina (T),

y estando correlacionado el sitio de los oligómeros sobre la superficie con la secuencia de los oligómeros.

2. Agrupación de oligómeros, con oligómeros de ANP (ácidos nucleicos peptídicos) y/o de ADN sobre una superficie, que comprende oligómeros a base en cada caso de entre 6 y 20 monómeros o nucleobases, comprendiendo la agrupación de oligómeros por lo menos 100 diferentes oligómeros y comprendiendo

a) por lo menos un 75% de los oligómeros unas secuencias de las fórmulas generales

DDCGDD y DDTGDD

o

b) por lo menos un 75% de los oligómeros unas secuencias de las fórmulas generales

HHCGHH y HHCAHH;

significando

H una de las bases adenina (A), citosina (C) o timina (T), y representando

D una de las bases adenina (A), guanina (G) o timina (T),

y estando correlacionado el sitio de los oligómeros sobre la superficie con la secuencia de los oligómeros.

3. Agrupación de oligómeros de acuerdo con la reivindicación 1 ó 2, **caracterizada** porque la superficie es plana y los oligómeros están dispuestos sobre ella en una retícula rectangular o hexagonal, que permite la asociación a unas coordenadas.

4. Agrupación de oligómeros de acuerdo con una de las precedentes reivindicaciones, **caracterizada** porque adaptándose a cada oligómero, que comprende una secuencia CG, está inmovilizado un oligómero análogo, que se diferencia del mencionado oligómero solamente en el hecho de que, en lugar de la secuencia CG, contiene una secuencia TG, o sino una secuencia CA.

5. Agrupación de oligómeros de acuerdo con una de las precedentes reivindicaciones, **caracterizada** porque la superficie es de vidrio.

6. Agrupación de oligómeros de acuerdo con la reivindicación 1 a 4, **caracterizada** porque la superficie es de un metal o de otro material conductivo.

7. Agrupación de oligómeros de acuerdo con la reivindicación 6, **caracterizada** porque la superficie es el objetivo de un espectrómetro de masas MALDI.

8. Utilización de una agrupación de oligómeros de acuerdo con la reivindicación 1, para la hibridación de fragmentos de ADN después de una precedente amplificación.

## ES 2 287 049 T3

9. Utilización de acuerdo con la reivindicación 8, **caracterizado** porque el ADN se trata antes de la amplificación con una solución de un bisulfito (o con una solución de un hidrógeno-sulfito o disulfito).

5 10. Utilización de una agrupación de oligómeros de acuerdo con una de las reivindicaciones precedentes para la detección de metilaciones de citosina en un ADN genómico.

10

15

20

25

30

35

40

45

50

55

60

65

**Fig. 1**

