

19



OFICINA ESPAÑOLA DE
PATENTES Y MARCAS

ESPAÑA



11 Número de publicación: **2 432 025**

51 Int. Cl.:

C12Q 1/68 (2006.01)

12

TRADUCCIÓN DE PATENTE EUROPEA

T3

96 Fecha de presentación y número de la solicitud europea: **11.10.2004 E 10177538 (5)**

97 Fecha y número de publicación de la concesión europea: **24.07.2013 EP 2292797**

54 Título: **Conversión mejorada de ADN con bisulfito**

30 Prioridad:

09.10.2003 DE 10347396

09.10.2003 DE 10347397

09.10.2003 DE 10347400

09.10.2003 DE 10347399

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

29.11.2013

73 Titular/es:

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

72 Inventor/es:

**BERLIN, KURT;
CARDON, KAREN y
BALLHAUSE, MATTHIAS**

74 Agente/Representante:

CAPITAN GARCÍA, Nuria

ES 2 432 025 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

Conversión mejorada de ADN con bisulfito

Antecedentes de la invención

5 La presente invención se refiere a un procedimiento para la detección de mutaciones de citosina en el ADN. La 5-metilcitosina es la base covalentemente modificada más frecuente en el ADN de las células eucarióticas. Por ejemplo, desempeña un papel en la regulación de la transcripción, en la impresión genética y en la tumorigénesis (para una revisión: Millar y col.: Five not four: History and significance of the fifth base. En: S. Beck y A. Olek, eds.: The Epigenome. Wiley-VCH Verlag Weinheim 2003, S. 3 20). Por tanto, la identificación de 5-metilcitosina como componente de la información genética es de un interés considerable. No obstante, las posiciones de 5-metilcitosina
10 no se pueden identificar mediante secuenciación porque la 5-metilcitosina tiene el mismo comportamiento de pares de bases que la citosina. Además, en el caso de una amplificación por PCR, la información epigenética, portada por las 5-metilcitosinas, se pierde completamente.

Los procedimientos habituales para el análisis de la metilación operan esencialmente de acuerdo con dos principios diferentes. O se utilizan enzimas de restricción específicas de metilación o se realiza una conversión química selectiva de citosinas no metiladas en uracilo (tratamiento con bisulfito). A continuación, el ADN enzimática o químicamente pre-tratado se amplifica y se puede analizar de diferentes modos (para revisión: Fraga y Esteller: DNA Methylation: A Profile of Methods and Applications. Biotechniques 33:632-649, Sept. 2002) WO 02/072880 pp. 1 ff).

Dado que el uso de enzimas específicas de metilación está restringido a ciertas secuencias que contienen sitios de restricción reconocidos por dichas enzimas, para la mayoría de las aplicaciones se realiza un tratamiento con bisulfito (para revisión: documento US 10/311.611). De acuerdo con la invención, una "reacción con bisulfito", "tratamiento con bisulfito" o "procedimiento con bisulfito" deberá querer decir una reacción para la conversión de bases de citosina en un ácido nucleico en bases de uracilo en presencia de iones bisulfito según la cual las bases de 5-metilcitosina no se convierten significativamente. La reacción con bisulfito contiene una etapa de desaminación y una etapa de desulfonación que se pueden realizar por separado o simultáneamente (en el documento EP 1394172A1 se describen otros detalles y se muestra un esquema de reacción). Hay varios documentos que abordan aspectos específicos de la reacción con bisulfito, incluidos Hayatsu y col., Biochemistry 9 (1970) 2858 28659; Siae y Shapiro, J.Org. Chem. 43 (1978) 4197-4200; Paulin y col., Nucl. Acid Res. 26 (1998) 5009-5010; Raizis y col., Anal Biochem. 226 (1995), 161-1666; Wang y col. Nucleic Acids Res. 8 (1980) 4777-4790. Estos documentos se resumen en el documento EP 1394172A1.

30 Normalmente, el tratamiento con bisulfito se realiza del siguiente modo: El ADN genómico se aísla, fragmenta mecánica o enzimáticamente, desnatura con NaOH, convierte varias horas mediante una solución concentrada de bisulfito y, por último, desulfona y desala (p. ej.: Frommer y col.: A genomic sequencing protocol that yields a positive display of 5-methylcytosine residues in individual DNA strands. Proc Natl Acad Sci USA. 1992 Mar 1; 89(5):1827-31).

35 En los últimos tiempos se han desarrollado varias mejoras técnicas de los procedimientos con bisulfito. El procedimiento con perlas de agarosa incorpora el ADN que se va a investigar en una matriz de agarosa, a través de la cual se previene la difusión y renaturalización del ADN (el bisulfito sólo reacciona con ADN monocatenario) y todas las etapas de precipitación y purificación se sustituyen con diálisis rápida (Olek A. y col. A modified and improved method for bisulphite based cytosine methylation analysis, Nucl. Acid Res. 1996, 24, 5064-5066). En la solicitud de patente WO 01/98528 (= DB 100 29 915; = solicitud de EE.UU. 10/311.661) se describe una conversión con bisulfito en la que la muestra de ADN se incuba con una solución de bisulfito de un intervalo de concentraciones entre 0,1 mol/l a 6 mol/l en presencia de un reactivo de desnaturalización y/o un disolvente y al menos un secuestrante. En dicha solicitud de patente se describen varios reactivos desnaturalizantes y secuestrantes adecuados (documento incorporado al presente documento por referencia en su totalidad). En la solicitud de patente
45 WO 03/038121 (=DE 101 54 317; =10/416,624) se desvela un procedimiento en el que el ADN a analizar está unido a una superficie sólida durante el tratamiento con bisulfito. En consecuencia se facilitan las etapas de purificación y lavado. Más mejoras se describen en las solicitudes de patente EP1394173A1 y EP1394172A1.

No obstante, un problema básico del tratamiento con bisulfito consiste en el hecho de que son necesarios tiempos de reacción largos con el fin de garantizar una conversión completa y de excluir resultados falsos positivos. Sin embargo, simultáneamente, esto conduce a una degradación del ADN debido a los tiempos de reacción prolongados. De hecho, temperaturas de reacción más elevadas conducen a una tasa de conversión superior, y también a una degradación más intensa del ADN. Recientemente se han investigado sistemáticamente las interacciones entre temperatura, tiempo de reacción, tasas de conversión y degradación De este modo se ha podido mostrar que los índices de conversión más elevados se alcanzaron a temperaturas de 55°C (con tiempos de reacción entre 4 y 18 horas) y a 95 °C (con un tiempo de reacción de una hora). No obstante, un problema serio es la degradación del ADN durante este procedimiento. A una temperatura de reacción de 55 °C, el 84-96% del ADN se descompone. A 95°C la degradación es, de hecho, incluso mayor (Grunau y col. Bisulfite genomic sequencing: systematic investigation of critical experimental parameters. Nucleic Acids Res. 2001 Jul 1; 29(13):E65-5). Por tanto, la mayoría de los autores usan temperaturas de reacción de aproximadamente 50 °C (véase Frommer y col., loc. cit.

1992, p. 1827; Olek y col., loc. cit. 1996, p. 5065; Raizis y col.: A bisulfite method of 5-methylcytosine mapping that minimizes template degradation. Anal Biochem. 1995 Mar 20; 226(1):161-6, 162).

Además del elevado índice de degradación del ADN existe otro problema en los procedimientos convencionales con bisulfito, que consiste en el hecho de que todavía no se ha descrito un potente procedimiento de purificación para ADN convertido. Muchos autores usan precipitaciones (véase Grunau y col., loc. cit.). También se ha descrito una purificación mediante superficies de unión a ADN (véase: Kawakami y col.: Hypermethylated APC DNA in plasma and prognosis of patients with esophageal adenocarcinoma. Journal of the National Cancer Institute, Vol. 92, N.º. 22, 2000, pp. 1805-11). No obstante, el rendimiento de estas purificaciones es limitado.

Debido a las elevadas pérdidas del tratamiento con bisulfito convencional, el uso de estos procedimientos supone un problema en las investigaciones en las que la cantidad de ADN a analizar es limitada. No obstante, un campo del análisis de la metilación particularmente interesante reside en el diagnóstico de las enfermedades cancerosas u otros trastornos asociados con una variación en el estado de la metilación por medio del análisis del ADN de los fluidos corporales, por ejemplo de sangre u orina. Sin embargo, en los fluidos corporales el ADN sólo está presente a concentraciones bajas, por lo que la aplicabilidad del análisis de la metilación está limitada por el bajo rendimiento del tratamiento convencional con bisulfito.

En consecuencia, sobre la base de la particular importancia del análisis de la metilación de la citosina y según las desventajas descritas de la metodología convencional, existe una gran necesidad de mejores procedimientos de la conversión con bisulfito.

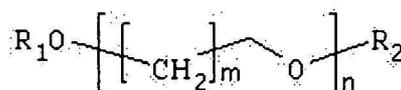
La invención está caracterizada por las reivindicaciones adjuntas. Por otra parte en la actualidad se ha descubierto que la adición de ciertos disolventes desnaturizantes incrementa el índice de conversión de la reacción con bisulfito de un modo inesperado y sorprendente. De forma simultánea se reduce el tiempo de reacción necesario y, en consecuencia, el índice de degradación. Aunque el uso de disolventes desnaturizantes ya se conoce en la técnica actual, el experto en la técnica no esperaba que los disolventes seleccionados en esta invención causaran un efecto tan fuerte. Además de un índice de conversión claramente mejorado y de la reducción del índice de degradación, el uso de dicho disolvente conduce a otra ventaja importante. Normalmente, el tratamiento con bisulfito se realiza en presencia de concentraciones elevadas de bisulfito (Fraga and Esteller recomiendan una concentración final de 5 mol/l; véase anteriormente, pág. 642, segundo párrafo). No obstante, una concentración tan elevada de sales produce una degradación alta y conduce a problemas en las posteriores purificación y amplificación. Otra ventaja del uso de compuestos de n-alquilenglicol como agente desnaturizante de acuerdo con la presente invención en comparación con los disolventes desnaturizantes ya conocidos es su mayor solubilidad en agua. Como consecuencia, los compuestos de reacción, incluidos los secuestrantes, son aplicables en un intervalo de concentración más amplio. A través de la combinación de nuevos disolventes con condiciones de reacción optimizadas y nuevos procedimientos de purificación se puede mejorar más la eficacia de la conversión. Se hace posible un análisis sensible de la metilación del ADN en tejidos o fluidos corporales.

35 Descripción

Una realización de la presente invención es un procedimiento para la conversión de ADN con bisulfito, en el que se hace reaccionar ADN genómico aislado con un reactivo de bisulfito, caracterizado porque la reacción se realiza a una temperatura en el intervalo de 0-80°C, y porque la temperatura de la reacción aumenta hasta un intervalo de 85-100°C brevemente durante el curso de la conversión (termopicos), llegando a ser el número de incrementos de temperatura de corta duración (termopicos) de 1 a 10.

Una forma de realización preferente de la presente invención es un procedimiento para una conversión de ADN con bisulfito, en el que el ADN se hace reaccionar con un reactivo bisulfito, que se caracteriza además **porque** dicha reacción se realiza en presencia de un compuesto del grupo de dioxano, uno de sus derivados y un éter cíclico alifático similar.

Otra forma de realización de la presente invención es un procedimiento para una conversión de ADN con bisulfito, en el que el ADN se hace reaccionar con un reactivo bisulfito, que se caracteriza porque dicha reacción se realiza en presencia de un compuesto de la fórmula siguiente:



n = 1-35000

50 m = 1-3

R₁ = H, Me, Et, Pr, Bu

R₂ = H, Me, Et, Pr, Bu

Por tanto, se prefieren los compuestos de n-alquilenglicol, particularmente sus dialquiléteres y especialmente éter dimetilico de dietilenglicol (DME).

5 Para ambas formas de realización, el ADN a investigar puede proceder de diferentes fuentes en función del objetivo diagnóstico o científico. Para investigaciones diagnósticas, las muestras de tejido se usan, preferentemente, como material inicial, pero también se pueden usar fluidos corporales, particularmente suero o plasma. También es posible usar ADN de esputo, heces, orina o líquido cefalorraquídeo. Preferentemente, el ADN se aísla de muestras biológicas. El ADN se extrae de acuerdo con procedimientos estándar, de sangre, por ejemplo con el uso del kit de extracción de ADN Qiagen UltraSens. El experto en la técnica conoce otros procedimientos para purificar ADN.

10 Posteriormente, el ADN aislado se puede fragmentar mediante, por ejemplo, reacción con enzimas de restricción. El experto en la técnica conoce las condiciones de la reacción y las enzimas empleadas y se obtienen de, por ejemplo, los protocolos suministrados por los fabricantes.

15 La conversión con bisulfito puede producirse de acuerdo con los protocolos conocidos indicados en lo que antecede. La reacción puede tener lugar en solución, además de también en ADN unido a una fase sólida. Preferentemente se usa disulfito sódico (=bisulfito sódico/metasulfito sódico), ya que es más soluble en agua que el sulfito sódico. La relación entre la sal bisulfito en solución acuosa u los aniones de sulfito de hidrógeno necesaria para la conversión de citosina es desproporcionada. Cuando la concentración de bisulfito se trata más adelante, se refiere a la concentración de sulfito de hidrógeno y aniones sulfito en la solución de la reacción. Para el procedimiento de acuerdo con la invención, son posibles los intervalos de concentración de 0,1 a 6 mol/l (véase anteriormente).
20 Particularmente se prefiere un intervalo de concentración de 1 a 6 mol/l y más particularmente preferente de 2-4 mol/l. No obstante, cuando se usa dioxano, la concentración máxima de bisulfito que se puede usar es menor (véase más adelante). Al seleccionar la concentración de bisulfito se debe considerar que una concentración elevada de bisulfito conduce a una alta conversión y también a un índice de descomposición alto debido al pH menor.

25 El dioxano se puede utilizar en diferentes concentraciones. Preferentemente, la concentración de dioxano asciende a 10-35% (vol/vol), particularmente preferente es de 20 a 30%, y más particularmente preferente es de 22 a 28%, especialmente 25%. Una concentración de dioxano superior al 35% supone un problema, ya que ello tiene como resultado una formación de dos fases dentro de la solución de reacción. En formas de reacción particularmente preferentes con una concentración de dioxano de 22-28%, la concentración final preferente de bisulfito asciende a 3,3 a 3,6 mol/l y en la forma de realización más particularmente preferente con una concentración de dioxano del 25% asciende a 3,5 mol/l (véase Ejemplos).
30

Los compuestos de n-alquilenglicol de acuerdo con la invención se pueden utilizar en un intervalo de concentraciones diferente. El DME se usa, preferentemente, en concentraciones entre 1-35% (vol/vol). Ésta es, preferentemente, entre el 5 y el 25%, y más preferentemente es del 10% de DME.

35 Los secuestrantes preferentes utilizados de acuerdo con la divulgación son derivados de cromano por ejemplo ácido 2-carboxílico de 6-hidroxi-2,5,7,8-tetrametilcromano (también conocido como: Trolox-C™). En la solicitud de patente WO 01/98528 (= DE 100 29 915; = solicitud de EE.UU 10/311,661) se enumeran otros secuestrantes.

40 La conversión con bisulfito se puede realizar en un amplio intervalo de temperaturas de 0 a 95°C (véase lo que antecede). No obstante, dado que a temperaturas más elevadas los índices tanto de conversión como de descomposición del ADN aumenta, en una forma de realización preferente la temperatura de reacción se encuentra entre 30-70°C. Particularmente preferente es un intervalo entre 45-60°C, más particularmente preferente entre 50-55°C. El tiempo de reacción óptimo del tratamiento con bisulfito depende de la temperatura de reacción. Normalmente, el tiempo de reacción asciende a entre 1 y 18 horas (véase: Grunau y col. 2001, loc. cit.). Habitualmente, el tiempo de reacción es de 4-6 horas para una temperatura de reacción de 50°C.

45 En una forma de realización particularmente preferente del procedimiento de acuerdo con la invención, la conversión con bisulfito se realiza a temperaturas de reacción suaves, en el que la temperatura de reacción se incrementa claramente durante un tiempo breve al menos una vez durante el curso de la conversión. De este modo, la eficacia de la conversión con bisulfito puede aumentarse claramente de forma sorprendente. Los incrementos de temperatura de corta duración se denominan en lo sucesivo "termopicos". La temperatura de reacción "estándar" fuera de los termopicos se indica como la temperatura de reacción básica. La temperatura de reacción básica
50 asciende a entre 0y 80°C, preferentemente entre 30-70°C, más preferentemente a 45-55°C, tal y como se ha descrito en lo que antecede. La temperatura de reacción durante un termopico aumenta a más de 85°C en al menos un termopico. El número óptimo de termopicos es una función de la temperatura de reacción básica. Cuanto mayor es el número óptimo de termopicos, menor es la temperatura de reacción básica. En cada caso es necesario al menos un termopico. Y, por otro lado, en principio se puede concebir cualquier número de termopicos. Por supuesto,
55 debe tenerse en cuenta que con un número grande de incrementos de temperatura, el índice de descomposición del ADN también aumenta y ya no queda garantizada una conversión óptima. Por tanto, el número preferente de termopicos es entre 1 y 10 termopicos cada vez, en función de la temperatura de reacción básica. Por tanto, se

prefiere un número de dos a 5 termopicos. Los termopicos incrementan la temperatura de reacción preferentemente a 85-100°C, particularmente preferente a 92-98°C y más preferentemente a 94°C-96°C.

5 El tiempo de duración de los termopicos también depende del volumen del lote de la reacción. Debe garantizarse que la temperatura se incrementa uniformemente por toda la solución de la reacción total. Para un lote de reacción de 20 µl, al usar un termociclador se prefiere una duración entre 15 segundos y 1,5 minutos, especialmente una duración entre 20 y 50 segundos. En una forma de realización preferente particular la duración es de 30 segundos. Trabajando con un volumen de 100 µl, el intervalo preferente se encuentra entre 30 segundos y 5 minutos, especialmente entre 1 y 3 minutos. Particularmente preferentes son 1,5 minutos. Para un volumen de 600 µl se prefiere una duración de 1 a 6 minutos, especialmente entre 2y 4 minutos. Particularmente preferente es una duración de 3 minutos. Un experto en la técnica podrá fácilmente determinar duraciones adecuadas de los termopicos en relación con varios volúmenes de reacción.

15 El uso descrito en lo que antecede de los termopicos conduce a índices de conversión significativamente mejores en la reacción de conversión con bisulfito, incluso cuando no se utilizan los disolventes desnaturalizantes descritos en lo que antecede. De acuerdo con la invención, en el presente documento un procedimiento para la conversión de ADN con bisulfito se caracteriza porque la temperatura de reacción básica asciende a 0°C a 80°C y porque la temperatura de reacción aumenta durante un tiempo breve a más de 85°C al menos una vez durante el curso de la conversión. El material inicial se puede procesar como se ha descrito en lo que antecede.

20 Los intervalos de temperatura preferentes, el número de termopicos y su duración corresponden a los intervalos indicados en lo que antecede. En consecuencia, la temperatura de reacción básica asciende a entre 0 y 80°C, preferentemente entre 30-70 °C, más preferentemente a 45-55°C. La temperatura de la reacción aumenta a más de 85°C en al menos un termopico. El número preferente de termopicos es entre 1 y 10 termopicos, en función de la temperatura de reacción básica. Particularmente preferentes son de dos a cinco termopicos. Durante los termopicos la temperatura de reacción aumenta preferentemente a 85-100°C, particularmente preferente a 92-98°C y más preferentemente a 94°C-96°C.

25 El tiempo de duración de los incrementos de temperatura también depende del volumen del lote de la reacción (véase en lo que antecede).

30 Una vez completada la conversión con bisulfito, el ADN se desulfona y purifica. Para este fin se conocen diferentes procedimientos (p. ej., véase: el documento DE 101 54 317 A1 = documento US 10/416,624; Grunau y col. 2001, loc. cit.). Normalmente, la solución de la reacción se trata primero con hidróxido sódico. Posteriormente se llevan a cabo una neutralización y precipitación en alcohol del ADN. En una realización preferente de las realizaciones anteriormente descritas de acuerdo con la invención, la purificación se realiza por medio de una filtración en gel, por ejemplo con columnas Sephadex-G25. La sal bisulfito se puede separar de manera muy eficaz de esta forma, sin la necesidad de etapas de lavado adicionales. En una segunda realización preferente, la purificación se realiza mediante superficies de unión a ADN, por ejemplo mediante purificación con resina Wizard DNA de Promega (véase: Kawakami y col., loc. cit.). Una tercera realización preferente utiliza partículas magnéticas para la purificación, por ejemplo con la ayuda del proceso Magna-Pure. Estos procedimientos de purificación llevan a resultados particularmente buenos en combinación con los compuestos de n-alkilenglicol de acuerdo con la invención, en particular con DME. La purificación se realiza de acuerdo con las instrucciones del fabricante. Los expertos en la técnica conocerán que se puede conseguir un rendimiento aun mayor variando las instrucciones del fabricante usando experimentos convencionales. Por consiguiente, los protocolos optimizados son también parte de la presente invención. Los expertos en la técnica conocerán otras instrucciones técnicas para purificar ácidos nucleicos mediante filtración en gel, superficies de unión a ADN y partículas magnéticas y se proporcionan, por ejemplo, en las instrucciones del fabricante. En una realización más particularmente preferente, la purificación se realiza por medio de una ultrafiltración. Tal procedimiento posee varias ventajas técnicas y tiene como resultado una purificación sorprendentemente exitosa del ADN convertido. El índice de recuperación del ADN convertido es muy elevado (>85%, véase el Ejemplo 6). Esto es cierto tanto para ADN de alto peso molecular como para ADN fragmentado, como el que se encuentra en, por ejemplo, los fluidos corporales. En contraste con ello, los procedimientos convencionales para aislar ADN tratado con bisulfito sólo conducen a un índice de recuperación de aproximadamente el 25%. La ultrafiltración también posee otras ventajas. Por ejemplo, la purificación es muy flexible con respecto al volumen de las muestras que se vayan a usar. Además, las sales de bisulfito se pueden eliminar casi completamente. Además, se puede realizar una desulfonación en la membrana del filtro, que adicionalmente tiene como resultado un ahorro de tiempo. El experto en la técnica conoce diferentes sistemas de ultrafiltración comercialmente disponibles que se pueden usar para el procedimiento de acuerdo con la invención. En una forma de realización preferente se usan columnas de Millipore Microcon™. Por tanto, la purificación se puede llevar a cabo de acuerdo con un protocolo modificado del fabricante. Para este fin, la solución de reacción con bisulfito se mezcla con agua y se carga en la membrana de ultrafiltración. Posteriormente, la solución de reacción se centrifuga durante aproximadamente 15 minutos y después se lava con 1 x tampón TE. En este tratamiento el ADN permanece en la membrana. A continuación se realiza la desulfonación. Para este fin, se añaden 0,2 mol/l de Nang y el ADN se incubaba durante 10 minutos. A continuación se realiza otra centrifugación (10 minutos), seguida por una etapa de lavado con 1 x tampón TE. Posteriormente se eluye el ADN. Para este fin, la membrana se mezcla con 50 µl de 1 x tampón TE caliente (50°C) durante 10 minutos. Se vuelca la membrana de acuerdo con las instrucciones del

fabricante y se realiza otra centrifugación, por medio de la cual el ADN se elimina de la membrana. En este momento se puede usar el eluato directamente para las reacciones de detección que se pretenden realizar. El experto en la técnica conoce que otros procedimientos pueden estar indicados con otros sistemas de ultrafiltración y que también se puede obtener un buen rendimiento variando las condiciones indicadas en lo que antecede. Las formas de realización correspondientes también forman parte de esta invención.

El uso descrito en lo que antecede también facilita una purificación claramente mejor del ADN convertido con bisulfito cuando no se utilizan los disolventes de desnaturalización descritos en lo que antecede o cuando la conversión se realiza sin termopicos. Por tanto, de acuerdo con la invención se caracteriza un procedimiento para la conversión de ADN con bisulfito en el que la purificación del ADN convertido tiene lugar por medio de ultrafiltración. Por tanto, el material inicial se puede procesar como se ha descrito en lo que antecede. También se pueden utilizar termopicos. Los intervalos de temperatura preferentes, el número de termopicos y su duración corresponden a los intervalos indicados en lo que antecede (véase anteriormente). Asimismo, la ultrafiltración se realiza preferentemente como se ha descrito en lo que antecede. En consecuencia, se pueden utilizar diferentes sistemas de ultrafiltración. En una forma de realización preferente se usan columnas de Millipore Microcon™. Preferentemente, la purificación se realiza como se ha descrito en lo que antecede de acuerdo con un protocolo modificado del fabricante. El experto en la técnica conoce que otros procedimientos pueden estar indicados con otros sistemas de ultrafiltración y que también se puede obtener un rendimiento todavía mejor variando las condiciones indicadas en lo que antecede.

El ADN que se ha convertido y purificado a través de las diferentes formas de realización descritas en lo que antecede se puede analizar ahora de diferentes modos. Es particularmente preferente amplificar el ADN primero por medio de una reacción en cadena de la polimerasa. Por tanto, se puede asegurar una amplificación selectiva del ADN metilado o no metilado a través de diferentes procedimientos, por ejemplo mediante el procedimiento denominado "HeavyMethyl" (para revisión: Cottrell y col.; A real-time PCR assay for DNA-methylation using methylation-specific blockers. Nucleic Acids Res. 2004 Jan 13;32(1):e10. Documento WO 02/072880.) o la denominada "PCR sensible a metilación" "MSP"; véase: Herman y col.: Methylation-specific PCR: a novel PCR assay for methylation status of CpG islands. Proc Natl Acad Sci U S A. 1996 Sep 3;93(18):9821-6). Los amplificadores obtenidos pueden detectarse a través de procedimientos convencionales, por ejemplo a través de reacciones de extensión del cebador ("MsSNuPE"; véase, por ejemplo: Documento DE 100 10 280= documento US 10/220,090) o a través de hibridación con matrices oligoméricas (véase, por ejemplo: Adorjan y col., Tumour class prediction and discovery by microarray-based DNA methylation analysis. Nucleic Acids Res. 2002 Mar 1;30(5):e21). En otra forma de realización particularmente preferente, los amplificadores se analizan con el uso de variantes de PCR en tiempo real (véase: Documento US 6.331.393 "Methyl Light"). Por tanto, variantes preferentes son los procedimientos "Taqman" y "Lightcycler"

Los procedimientos divulgados en el presente documento se usan preferentemente para el diagnóstico y/o pronóstico de acontecimientos adversos para pacientes o individuos, según los cuales estos acontecimientos adversos pertenecen a al menos una de las categorías siguientes: interacciones farmacológicas indeseadas; enfermedades cancerosas; malfunciones, daños o enfermedades del SNC; síntomas de agresividad o alteraciones de la conducta; consecuencias clínicas, psicológicas y sociales del daño cerebral; alteraciones psicóticas y trastornos de la personalidad; demencia y/o síndromes asociados; enfermedades, malfunción y daños cardiovasculares; malfunción, daños o enfermedad del tracto gastrointestinal; malfunción, daños o enfermedad del sistema respiratorio; lesión, inflamación, infección, inmunidad y/o convalecencia; malfunción, daños o enfermedad del cuerpo como anomalía en el proceso del desarrollo; malfunción, daño o enfermedad de la piel, los músculos o el tejido conjuntivo o de los huesos; malfunción, daños o enfermedad endocrina y metabólica; dolores de cabeza o malfunción sexual.

El nuevo procedimiento también sirve de un modo particularmente preferente para distinguir tipos de células, tejidos o para investigar la diferenciación celular.

El nuevo procedimiento también sirve de un modo particularmente preferente para analizar la respuesta de un paciente a un tratamiento farmacológico.

También se divulga un kit, que contiene un reactivo que contiene bisulfito, reactivos o disolventes desnaturalizantes, además de secuestrantes, cebadores para la producción de los amplificadores así como, opcionalmente, un tubo de ultrafiltración o instrucciones para realizar un ensayo.

Ejemplos

Los ejemplos siguientes explican la invención.

Ejemplo 1:

Conducción automática de la reacción con bisulfito

En el presente ejemplo se describe la aplicación del procedimiento para detectar el estado de metilación de las citosinas en el gen del factor VIII de una muestra de ADN genómico, que se trata con una endonucleasa de restricción de acuerdo con las instrucciones del fabricante. El procedimiento se basa en el uso de un sistema de

pipeteado automático (MWG RoboSeq 4204) con cuatro adaptadores separados verticalmente móviles para puntas de pipeta intercambiables con el fin de excluir contaminaciones cruzadas. El sistema de pipeteado posibilita el pipeteado de 100 µl [alícuotas] con un error inferior a ± 2 µl. La placa operativa del sistema de pipeteado automático está equipada con seis gradillas para puntas de pipeteado y ocho posiciones de pipeteado, dos de las cuales pueden enfriarse, una gradilla para reactivos que se puede enfriar, un sistema de aplicación para 10 placas de microtitulación, una estación de lavado de puntas de pipetas y un dispositivo para separar las puntas de pipeta del adaptador.

El sistema de pipeteado automático está conectado a un ordenador a través de una interfaz en serie y está controlado por un programa de software que permite la programación libre de todas las etapas del pipeteado necesarias para la aplicación del procedimiento.

En la primera etapa del procedimiento, un alícuota de la muestra de ADN se pipetea a mano en una de las 96 posiciones seleccionables libremente de una placa de microtitulación. Después, la placa de microtitulación se calienta posteriormente hasta 96°C con el uso de un Eppendorf MasterCycler para desnaturar la muestra de ADN pretratada. Después, la placa de microtitulación se transfiere al sistema de pipeteado automático. Los alícuotas de un agente desnaturante (dioxano) se pipetea una solución 3,3M de hidrógeno sulfito de sodio y una solución de un secuestrante en el agente desnaturado una después de la otra de un modo controlado por el programa desde la gradilla para reactivos a todas las posiciones que contienen ADN. A continuación, la placa de microtitulación se incubaba en el Eppendorf Mastercycler, de modo que todos los residuos de citosina sin metilar en la muestra de ADN se convierten en un aducto de bisulfito con la acción del hidrógeno sulfito de sodio.

Después del tratamiento con bisulfito, la placa de microtitulación se transfiere desde el termociclador al sistema de pipeteado automático. Después se coloca una segunda placa de microtitulación del mismo tipo. Se transfieren un tampón Tris-HCl básico (pH 9,5) en primer lugar y después un alícuota del ADN tratado con bisulfito a las correspondientes posiciones de la segunda placa de microtitulación en todas las cámaras cuyas posiciones equivalentes de la primera placa de microtitulación contienen una muestra de ADN tratada con bisulfito. Los aductos de bisulfito de los residuos de citosina sin metilar se convierten en residuos de uracilo en la solución básica.

La amplificación dirigida de una hebra (la hebra sentido en el presente ejemplo) del ADN tratado con bisulfito se realiza mediante reacción en cadena de la polimerasa (PCR). Se usa un par de cebadores de tipo 1 (AGG GAG TTT TTT TTA GGG AAT AGA GGG A (SEC ID N° 1) y TAA TCC CAA AAC CTC TCC ACT ACA ACA A (SEC ID N° 2) que permiten la amplificación específica de una hebra de ADN tratada con éxito con bisulfito, pero no una hebra de ADN, cuyos residuos de citosina sin metilar no se habían convertido en residuos de uracilo o se habían convertido de forma incompleta. Una tercera placa de microtitulación del mismo tipo se coloca en el sistema de pipeteado automático para la reacción de PCR. En todas las cámaras, cuyas posiciones equivalentes en la primera placa de microtitulación contienen una muestra de ADN tratada con bisulfito, primero se pipetea automáticamente un alícuota de una solución madre que contiene un tampón de PCR, una ADN polimerasa y un cebador de tipo 1. Después, un alícuota del ADN diluido tratado con bisulfito se transfiere automáticamente de cada posición de la segunda placa de microtitulación a la posición correspondiente de la tercera placa de microtitulación, antes de que ésta última se transfiera al ciclador para realizar la reacción de PCR. El producto de la PCR se identifica mediante electroforesis en gel de agarosa y posterior tinción con bromuro de etidio (Fig. 1). La Figura 1 muestra la imagen del gel de una hebra de ADN tratada con bisulfito amplificada mediante PCR (izquierda: marcador de peso molecular, derecha: producto de la PCR).

Ejemplo 2: Conversión optimizada con bisulfito mediante la adición de dioxano para la detección de ADN en muestras de plasma

Se mostrará que el procedimiento optimizado con bisulfito posibilita un análisis sensible de metilación para ADN obtenido de fluidos corporales. Para este fin se mezcló 1 ml de plasma humano con una cantidad específica de ADN humano. El ADN se aisló de las muestras de plasma mediante el procedimiento Magna Pure (Roche) de acuerdo con las instrucciones del fabricante. Los 100 µl del eluato resultantes de la purificación se utilizaron completamente en la siguiente reacción con bisulfito. Como control se efectuó la conversión de acuerdo con un procedimiento estándar (Frommer y col., loc. cit.). El procedimiento para el procedimiento de acuerdo con la invención fue el siguiente: El eluato se mezcló con 354 µl de la solución de bisulfito (5,89 mol/l) y 146 µl de dioxano que contiene un secuestrante de radicales (ácido 2-carboxílico de 6-hidroxi-2,5,7,8-tetrametilcromano, 98,6 mg en 2,5 ml de dioxano).

La mezcla de reacción se desnaturizó durante 3 min a 99°C y después se incubó con el siguiente programa de temperaturas durante un total de 5 horas: 30 min 50 °C; un termopico (99,9 °C) durante 3 minutos; 1,5 h 50°C; un termopico (99,9°C) durante 3 minutos; 3 h 50°C. Las mezclas de reacción tanto del control como del procedimiento de acuerdo con la invención se purificaron después mediante ultrafiltración con una columna Millipore Microcon™. La purificación se realizó esencialmente de acuerdo con las instrucciones del fabricante. Para este fin, la mezcla de reacción se mezcló con 300 µl de agua, se cargó en la membrana de ultrafiltración, se centrifugó durante 15 minutos y después se lavó con 1 x tampón TE. En este tratamiento el ADN permanece en la membrana. A continuación se realiza la desulfonación. Para este fin, se añadieron 0,2 mol/l y se incubaron durante 10 minutos. A continuación se realizó una centrifugación (10 minutos), seguida por una etapa de lavado con 1 x tampón TE. Después de esto se

eluyó el ADN. Para este fin, la membrana se mezcló con 50 µl de 1 x tampón TE caliente (50°C) durante 10 minutos. La membrana se volcó de acuerdo con las instrucciones del fabricante. Posteriormente se realizó otra centrifugación con lo que el ADN se eliminó de la membrana. Para la siguiente PCR en tiempo real Lightcycler se utilizaron 10 µl del eluato. Se analizó una región del gen de la beta-actina humana (véase Miyamoto: Nucleotide sequence of the human beta-actin promoter 5' flanking region; Nucleic Acids Res. 15 (21), 9095 (1987)). Se usaron los siguientes cebador y sondas: Cebador directo: TGG TGA TGG AGG AGG TTT AGT AAG T (SEC ID 3); cebador inverso: AAC CAA TAA AAC CTA CTC CTC CCT TAA (SEQ ID 4); sonda donante: TTG TGA ATT TGT GTT TGT TAT TGT GTG TTG-flou (SEC ID 5); sonda aceptora: LC Red640-TGG TGG TTA TTT TTT TTA TTA GGT TGT GGT-Phos (SEC ID 6).

La amplificación se realizó por medio de un ensayo específico con bisulfito. Las señales fluorescentes se detectaron y calcularon con el software Lightcycle. La cantidad de ADN convertido y aislado pudo cuantificarse mediante una comparación con curvas de calibración. El procedimiento optimizado produjo una concentración de ADN de 133,21 ng/100 µl, mientras que el procedimiento convencional condujo a una concentración de 41,03 ng/100 µl. El procedimiento de acuerdo con la invención posibilitó un rendimiento tres veces superior al obtenido con el procedimiento convencional.

Ejemplo 3: Conversión optimizada con bisulfito mediante la adición de DME para la detección de ADN en muestras de plasma

Se mostrará que el procedimiento optimizado con bisulfito posibilita un análisis sensible de metilación para ADN obtenido de fluidos corporales. Para este fin se mezcló 1 ml de plasma humano con una cantidad específica de ADN humano. El ADN se aisló de las muestras de plasma mediante el procedimiento Magna Pure (Roche) de acuerdo con las instrucciones del fabricante. Los 100 µl del eluato resultantes de la purificación se utilizaron completamente en la siguiente reacción con bisulfito. Como control se efectuó la conversión de acuerdo con un procedimiento estándar (Frommer y col., loc. cit.). El procedimiento para el procedimiento de acuerdo con la invención fue el siguiente: El eluato se mezcló con 354 µl de la solución de bisulfito (5,89 mol/l) y 46 µl de DME que contiene un secuestrante de radicales (ácido 2-carboxílico de 6-hidroxi-2,5,7,8-tetrametilcromano, 98,6 mg en 787 µl de DME). La mezcla de reacción se desnaturalizó durante 3 minutos a 90°C y posteriormente se incubó con el siguiente programa de temperaturas durante un total de 5 h. 30 min 50 °C; un termopico (99,9 °C) durante 3 minutos; 1,5 h 50°C; un termopico (99,9°C) durante 3 minutos; 3 h 50°C. Las mezclas de reacción tanto del control como del procedimiento de acuerdo con la invención se purificaron después mediante ultrafiltración con una columna Millipore Microcon™. La purificación se realizó esencialmente de acuerdo con las instrucciones del fabricante. Para este fin, la mezcla de reacción se mezcló con 300 µl de agua, se cargó en la membrana de ultrafiltración, se centrifugó durante 15 minutos y después se lavó con 1 x tampón TE. En este tratamiento el ADN permanece en la membrana. A continuación se realiza la desulfonación. Para este fin, se añadieron 0,2 mol/l y se incubaron durante 10 minutos. A continuación se realizó una centrifugación (10 minutos), seguida por una etapa de lavado con 1 x tampón TE. Después de esto se eluyó el ADN. Para este fin, la membrana se mezcló con 50 µl de 1 x tampón TE caliente (50°C) durante 10 minutos. La membrana se volcó de acuerdo con las instrucciones del fabricante. Posteriormente se realizó otra centrifugación por medio de la cual el ADN se eliminó de la membrana. Para la siguiente PCR en tiempo real Lightcycler se utilizaron 10 µl del eluato. Una región del gen de la beta-actina humana se analizó usando los cebadores y las sondas descritos en el ejemplo 2. La amplificación se realizó por medio de un ensayo específico con bisulfito. Los resultados calculados por el software Lightcycler se muestran en la Figura 2. Las curvas de la izquierda corresponden al procedimiento optimizado, mientras que las curvas de la derecha corresponden al procedimiento convencional. Se muestra que el procedimiento optimizado produce una señal fluorescente significativa, incluso con un número pequeño de ciclos. Por tanto, el rendimiento de ADN es superior que el obtenido con el procedimiento convencional. La cantidad de ADN se puede cuantificar mediante una comparación con curvas de calibración. El procedimiento optimizado produjo una concentración de ADN de 133,27 ng/100 µl, mientras que el procedimiento convencional condujo a una concentración de 41,03 ng/100 µl. El procedimiento de acuerdo con la invención posibilitó un rendimiento tres veces superior al obtenido con el procedimiento convencional.

Ejemplo 4

Conversión con bisulfito con ayuda de termopicos

A 1 µl de ADN humano altamente puro digerido con Mssl (Promega; 160 ng) se añadieron 2 µl de ddH₂O. Las muestras se desnaturalizaron durante 10 minutos a 96°C. Después se añadieron aproximadamente 10 µl de solución de bisulfito (5,85 mol/l) y 7 µl de una mezcla de secuestrante de radicales/dioxano (5 µl de dioxano más 2 µl de secuestrante). Después de esto, se extrajo la primera muestra (valor 0 h) y se colocó en hielo. La mezcla de reacción se incubó durante 30 segundos a 96°C y después durante 59,5 minutos a 50°C. La segunda muestra (valor de 1 h) se extrajo y se colocó en hielo. La tercera muestra (valor de 2 h) se incubó una vez más durante 30 segundos a 96 °C y durante 59,5 minutos a 50 °C. Posteriormente, esta muestra también se colocó en hielo. La cuarta muestra (valor de 3 h) se incubó una vez más durante 30 segundos a 96 °C y durante 59,5 minutos a 50 °C y posteriormente también se enfrió. A las muestras se añadieron 30 µl de ddH₂O. La mezcla de reacción se purificó mediante columnas G25 Sephadex. El eluato se mezcló con 50 µl de Tris-HCl 100 mmol/l (pH 9,5) y se desulfonó a

96°C durante 20 minutos. Para cada reacción de PCR se usaron 2 µl de esta solución. Dos fragmentos específicos de bisulfito, dos fragmentos no específicos y un fragmento genómico se amplificaron cada vez en la PCR. Los fragmentos específicos de bisulfito se amplifican con más intensidad, le más lejos que ha progresado la conversión con bisulfito. Los fragmentos no específicos se amplifican con independencia de la conversión con bisulfito y proporcionan una indicación de la degradación del ADN. El fragmento genómico sólo se amplifica en la medida en la que todavía hay presente ADN genómico que no se ha convertido. Por tanto, la amplificación del ADN genómico es una medida de una conversión incompleta con bisulfito. Los amplificadores separados en genes de agarosa se pueden apreciar en la Figura 3. Se muestra que en el procedimiento de acuerdo con la invención una gran parte del ADN se ha convertido incluso después de una hora. El ADN genómico ya no se puede detectar después de tres horas como máximo, es decir, la conversión con bisulfito es completa. En el tratamiento con bisulfito convencional, los valores correspondientes se producen, como muy pronto, tras 5 horas (véase más adelante).

Ejemplo 5

Comparación del tratamiento con bisulfito con termopicos con el tratamiento con bisulfito sin termopicos

Las muestras que se trataron como en el ejemplo 4 se incubaron con un tiempo de reacción de 3 ó 5 horas con dos termopicos. Los controles se hicieron reaccionar sin termopicos. La purificación y la PCR se realizaron como se ha descrito en lo que antecede. Se amplificaron dos fragmentos específicos de bisulfito. Uno de los fragmentos era rico en citosina. Por tanto, fue necesario un tiempo de reacción relativamente largo con el fin de conseguir una conversión completa. En contraste con ello, el otro fragmento fue pobre en citosina y, por tanto, completamente convertido después de relativamente poco tiempo. Los resultados de las amplificaciones se muestran en la Figura 4. La conversión convencional con bisulfito se puede apreciar en las figuras de la izquierda, mientras que la conversión optimizada con termopicos se puede apreciar en las figuras de la derecha. El fragmento rico en citosina se representa en la izquierda todas las veces, mientras que el fragmento pobre en citosina se representa en la derecha. Se muestra que el procedimiento de acuerdo con la invención posibilita una detección más sensible. Por tanto, el fragmento rico en citosina puede detectarse claramente incluso después de 3 horas con un tratamiento con termopico, mientras que no se puede detectar con el procedimiento convencional incluso después de 5 horas de tiempo de reacción.

Ejemplo 6: Índice de recuperación de ADN en el procedimiento de acuerdo con la invención

Se mostrará que el procedimiento de acuerdo con la invención posibilita una conversión y purificación con bisulfito muy eficaz. Para este fin se disolvieron diferentes cantidades de M13-ADN y ADN humano en 100 µl de agua. Las soluciones de ADN se mezclaron con 354 µl de la solución de bisulfito (5,89 mol/l) y 146 µl de dioxano que contiene un secuestrante de radicales (ácido 2-carboxílico de 6-hidroxi-2,5,7,8-tetrametilcromano, 98,6 mg en 2,5 ml de dioxano). La mezcla de reacción se desnaturalizó durante 3 minutos a 9°C y posteriormente se incubó con el siguiente programa de temperaturas durante un total de 5 h: 30 minutos a 50°C; un termopico (99,9°C) durante 3 minutos; 3 horas 50°C. Posteriormente las mezclas de reacción se purificaron mediante ultrafiltración a través de una columna Millipore Microcon™. La purificación se realizó esencialmente de acuerdo con las instrucciones del fabricante. Para este fin, la mezcla de reacción se mezcló con 300 µl de agua, se cargó en la membrana de ultrafiltración, se centrifugó durante 15 minutos y después se lavó con 1 x tampón TE. En este tratamiento el ADN permanece en la membrana. A continuación se realiza la desulfonación. Para este fin, se añadieron 0,2 mol/l y se incubaron durante 10 minutos. A continuación se realizó una centrifugación (10 minutos), seguida por una etapa de lavado con 1 x tampón TE. Después de esto se eluyó el ADN. Para este fin, la membrana se mezcló con 50 µl de 1 x tampón TE caliente (50°C) durante 10 minutos. La membrana se volcó de acuerdo con las instrucciones del fabricante. Posteriormente se realizó otra centrifugación por medio de la cual el ADN se eliminó de la membrana. Las concentraciones de ADN se determinaron después fluorométricamente (verde oliva). Los datos se muestran en la Tabla 1. El índice de recuperación de ADN asciende a al menos el 75%. En los procedimientos conocidos para la conversión y purificación con bisulfito de ADN, los índices de recuperación, en contraste, se encuentran por debajo del 25%.

TABLA 1:

Cantidad utilizada de ADN en ng	M13 ADN tras ultrafiltración	ADN monocatenario humano tras ultrafiltración
6000	no determinada	108,5%
4000	no determinada	87,1%
2000	86,91%	84,8%
1000	90,54%	81,51%
200	92,69%	91,59%
100	96,77%	74,23%

Breve descripción de las figuras

La Fig. 1 muestra el resultado del ejemplo 1. Se muestra el patrón en gel de una hebra de ADN tratada con bisulfito amplificada con PCR (izquierda: marcador de peso molecular, derecha: producto de la PCR).

5 La Fig.2 muestra los resultados del Ejemplo 3 (uso de DME). El ADN se aisló de muestras de plasma, se trató con bisulfito y se amplificó mediante una PCR Lightcycler. En el eje Y se muestra la señal fluorescente medida en cada ciclo. En el eje X se indica el número de ciclos. Las curvas del procedimiento de acuerdo con la invención se muestran en la izquierda y las del procedimiento convencional se muestran en la derecha. Se muestra que el procedimiento optimizado produce una señal fluorescente significativa, incluso con un número
10 pequeño de ciclos. El rendimiento de ADN es superior que el obtenido con el procedimiento convencional.

La Fig. 3 muestra los resultados del ejemplo 4. Se muestra el gel resultante de una electroforesis tras una amplificación mediante PCR. Dos fragmentos específicos de bisulfito, dos fragmentos no específicos y un fragmento genómico se amplificaron cada vez. La figura superior muestra el valor cero (tiempo de reacción = 0 horas). La segunda figura de la parte superior muestra la reacción con un termopico y durante una hora de tiempo de reacción total. La tercera figura de la parte superior corresponde a la reacción con dos termopicos y dos horas de tiempo de reacción total. La figura más inferior muestra una reacción con tres termopicos y tres horas de tiempo de reacción. Una gran parte del ADN se convierte incluso después de una hora con el procedimiento de acuerdo con la invención (segunda figura desde arriba). Como máximo después de tres horas el ADN genómico ya no se puede detectar (figura más inferior).

20 La Fig. 4 muestra los resultados del ejemplo 5. Se muestra la electroforesis en gel tras una amplificación mediante PCR. Se amplificaron dos fragmentos diferentes específicos de bisulfito. Las figuras de la izquierda muestran el tratamiento con bisulfito convencional, mientras que las de la derecha muestran el procedimiento de acuerdo con la invención. En la parte superior se muestra un tiempo de reacción de 3 horas y en la parte inferior se muestra un tiempo de reacción de 5 horas. Una detección claramente más sensible es posible con el procedimiento de acuerdo con la invención (termopicos). Por tanto, el fragmento mostrado en la calle izquierda se puede detectar tras 3 horas de tiempo de reacción, mientras que el fragmento del procedimiento convencional todavía no se puede detectar incluso después de 5 horas de incubación.

Listado de secuencias

<110> **Epigenómica AG**

<120> **Procedimiento para la detección de metilaciones de citosina**

<160> 6

<210> 1

<211> 28
 <212> ADN
 <213> Secuencia artificial

 <220>
 <223> cebador

 <400> 1
 agggagtttt ttttagggaa tagagga 28

 <210> 2
 <211> 28
 <212> ADN
 <213> Secuencia artificial

 <220>
 <223> cebador

 <400> 2
 taatcccaaa acctctcac tacaaca 28

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

 <220>
 <223> cebador

 <400> 3
 tggatgatga ggaggttag taagt 25

 <210> 4
 <211> 27
 <212> ADN
 <213> Secuencia artificial

 <220>
 <223> cebador

 <400> 4
 aaccaataaa acctactcct ccctaa 27

 <210> 5
 <211> 30
 <212> ADN
 <213> Secuencia artificial

 <220>
 <223> sonda de detección

 <400> 5
 ttgtgaattt gtgttgta ttgtgttg 30

 <210> 6
 <211> 30
 <212> ADN
 <213> Secuencia artificial

<220>

<223> sonda de detección

<400> 6

tggtggttat ttttttatt aggttggt 30

REIVINDICACIONES

- 5 1. Un procedimiento para la conversión de ADN con bisulfito, en el que se hace reaccionar ADN genómico aislado con un reactivo de bisulfito, **caracterizado porque** la reacción se realiza a una temperatura en el intervalo de 0-80°C, y porque la temperatura de la reacción aumenta hasta un intervalo de 85-100°C brevemente durante el curso de la conversión (termopicos), llegando a ser el número de incrementos de temperatura de corta duración (termopicos) de 1 a 10.
2. El procedimiento de acuerdo con la reivindicación 1, **caracterizado** además **porque** el número de incrementos de la temperatura de duración breve (termopicos) asciende de 2 a 5.
- 10 3. El procedimiento de acuerdo con la reivindicación 1, **caracterizado** además **porque** durante los incrementos de la temperatura de duración breve (termopicos) la temperatura de reacción aumenta a 85 a 100 °C, o a 90 a 98 °C., alternativamente.
4. El procedimiento de acuerdo con la reivindicación 1, **caracterizado** además **porque** el ADN convertido se purifica a través de partículas magnéticas, filtración de gel, superficies de unión a ADN o ultrafiltración.
- 15 5. El procedimiento de acuerdo con la reivindicación 1, **caracterizado** además **porque** el ADN convertido se analiza mediante uno de los siguientes procedimientos: MSP, Heavy Methyl, MsSNuPE, Methyl Light.
6. El procedimiento de acuerdo con la reivindicación 1, **caracterizado porque** además se investiga ADN de muestras de tejido o de fluidos corporales.
7. Uso de un procedimiento de acuerdo con la reivindicación 1 para el diagnóstico y/o pronóstico de acontecimientos adversos para pacientes o individuos, según los cuales estos acontecimientos adversos pertenecen a al menos una de las categorías siguientes: interacciones farmacológicas indeseadas; enfermedades cancerosas; malfunciones, daños o enfermedades del SNC; síntomas de agresividad o alteraciones de la conducta; consecuencias clínicas, psicológicas y sociales del daño cerebral; alteraciones psicóticas y trastornos de la personalidad; demencia y/o síndromes asociados; enfermedades, malfunción y daños cardiovasculares; malfunción, daños o enfermedad del tracto gastrointestinal; malfunción, daños o enfermedad del sistema respiratorio; lesión, inflamación, infección, inmunidad y/o convalecencia; malfunción, daños o enfermedad del cuerpo como anomalía en el proceso del desarrollo; malfunción, daño o enfermedad de la piel, los músculos o el tejido conjuntivo o de los huesos; malfunción, daños o enfermedad endocrina y metabólica; dolores de cabeza o malfunción sexual.
- 20 8. Uso de un procedimiento de acuerdo con la reivindicación 1 para distinguir tipos de células o tejidos o para investigar la diferenciación celular.
9. El procedimiento de acuerdo con la reivindicación 1, **caracterizado** además **porque** dicha reacción se lleva a cabo en presencia de un compuesto del grupo de dioxano, uno de sus derivados y un éter cíclico alifático similar.
- 30 10. Un procedimiento de acuerdo con la reivindicación 1, **caracterizado** además **porque** dicha reacción se lleva a cabo en presencia de un compuesto con la fórmula siguiente:



n = 1-35000

40 m = 1-3

R₁ = H, Me, Et, Pr, Bu

R₂ = H, Me, Et, Pr, Bu

45

Fig. 1

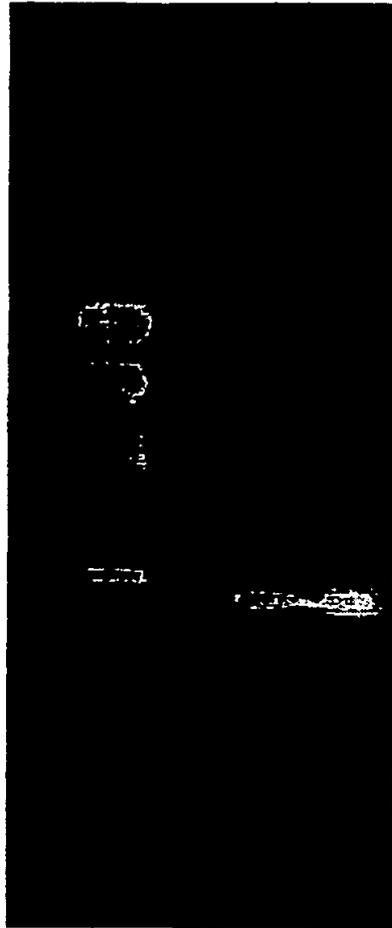


Fig. 2

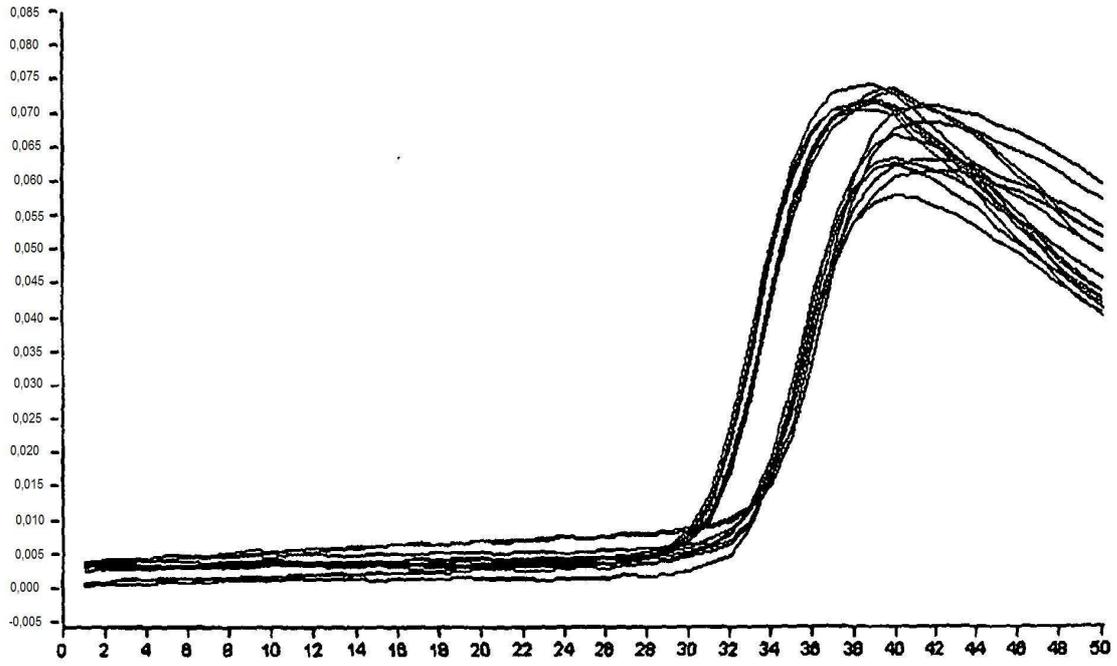


Fig. 3



0h



1h

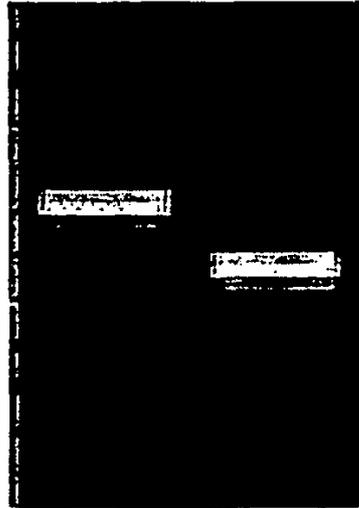
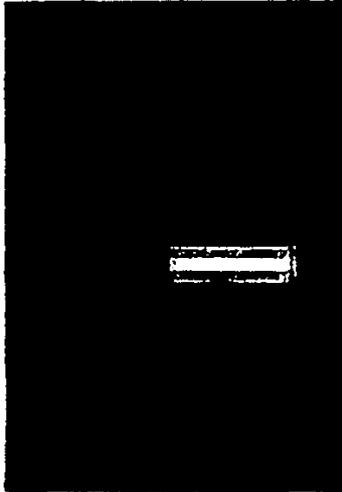


2h

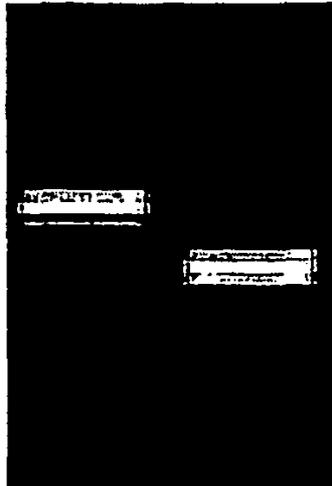
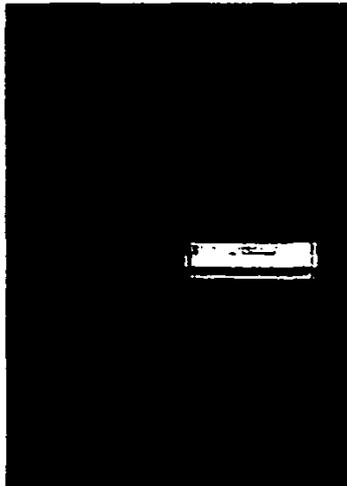


3h

Fig. 4



3h



5h