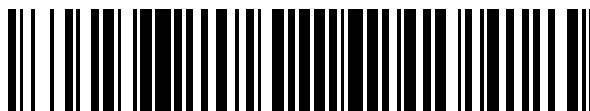


19



OFICINA ESPAÑOLA DE
PATENTES Y MARCAS

ESPAÑA



11 Número de publicación: **2 647 483**

51 Int. Cl.:

C12Q 1/68 (2006.01)

12

TRADUCCIÓN DE PATENTE EUROPEA

T3

96 Fecha de presentación y número de la solicitud europea: **31.03.2006 E 14167255 (0)**

97 Fecha y número de publicación de la concesión europea: **20.09.2017 EP 2803734**

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

30 Prioridad:

01.04.2005 EP 05090090
12.05.2005 EP 05090135

45 Fecha de publicación y mención en BOPI de la traducción de la patente:
21.12.2017

73 Titular/es:

EPIGENOMICS AG (100.0%)
Geneststrasse 5
10829 Berlin, DE

72 Inventor/es:

SCHWOPE, INA y
BALLHAUSE, MATTHIAS

74 Agente/Representante:

CURELL AGUILÁ, Mireia

ES 2 647 483 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 por bisulfito mejorada de ADN.

5 **Antecedentes de la invención**

La presente invención se refiere a un procedimiento para la detección de metilaciones de citosina en el ADN. La 5-metilcitosina es la base covalentemente modificada más frecuente en el ADN de las células eucariotas. Por ejemplo, ejerce un papel en la regulación de la transcripción, en la impronta genética y en la oncogénesis (véase: Millar *et al.*: Five not four: History and significance of the fifth base. En: S. Beck y A. Olek, eds.: The Epigenome. Wiley-VCH Verlag Weinheim, 2003, p. 3-20). Por lo tanto, la identificación de la 5-metilcitosina como componente de la información genética tiene un interés considerable. Sin embargo, las posiciones de la 5-metilcitosina no se pueden identificar por secuenciación, ya que la 5-metilcitosina presenta el mismo comportamiento de apareamiento de bases que la citosina. Además, si se lleva a cabo una amplificación por PCR, la información epigenética, que reside en las 5-metilcitosinas, se pierde por completo.

Los métodos habituales para el análisis de la metilación funcionan esencialmente según dos principios diferentes. Se utilizan enzimas de restricción específicas de metilación o una conversión química selectiva de las citosinas no metiladas a uracilo (tratamiento con bisulfito). A continuación, el ADN pretratado enzimáticamente o químicamente se amplifica y se puede analizar por diversos métodos (véase: Fraga y Esteller: DNA Methylation: A Profile of Methods and Applications. Biotechniques 33: 632-649, septiembre de 2002; WO 02/072880, p. 1 y siguientes).

Dado que la utilización de enzimas específicas de metilación está restringida a determinadas secuencias, que contienen sitios de restricción reconocidos por dichas enzimas, en la mayoría de las aplicaciones se lleva a cabo un tratamiento con bisulfito (véase: US 10/311.661).

Según la presente invención, "reacción con bisulfito", "tratamiento con bisulfito" o "método del bisulfito" se refieren a una reacción para la conversión de las bases de citosina presentes en un ácido nucleico en bases de uracilo en presencia de iones bisulfito, no convirtiéndose significativamente las bases de 5-metilcitosina. La reacción con bisulfito comprende una etapa de desaminación y una etapa de desulfonación que pueden llevarse a cabo por separado o simultáneamente (se describen más detalles y se muestra un esquema de reacción en el documento EP 1 394 172 A1). Existen diversos documentos que se refieren a aspectos específicos de la reacción con bisulfito, entre ellos Hayatsu *et al.*, Biochemistry 9 (1970) 2858-28659; Slae y Shapiro, J. Org. Chem. 43 (1978) 4197-4200; Paulin *et al.*, Nucl. Acids Res. 26 (1998) 5009-5010; Raizis *et al.*, Anal. Biochem. 226 (1995), 161-1666; Wang *et al.* Nucleic Acids Res. 8 (1980) 4777-4790. Estos documentos se resumen en el documento EP 1 394 172 A1.

Habitualmente, el tratamiento con bisulfito se lleva a cabo de la siguiente manera: el ADN genómico se aísla, se fragmenta mecánicamente o enzimáticamente, se desnaturaliza con NaOH, se convierte durante varias horas mediante una solución concentrada de bisulfito y, por último, se somete a desulfonación y desalación (por ejemplo: Frommer *et al.* A genomic sequencing protocol that yields a positive display of 5-methylcytosine residues in individual DNA strands. Proc Natl. Acad. Sci. USA, 1 de marzo de 1992; 89(5) :1827-31).

Recientemente, se han desarrollado una serie de mejoras técnicas en los métodos por bisulfito. El método de bolas de agarosa incorpora el ADN que se debe analizar en una matriz de agarosa, a través de la cual se impide la difusión y la renaturalización del ADN (el bisulfito sólo reacciona con el ADN monocatenario) y todas las etapas de precipitación y purificación se sustituyen por diálisis rápida (Olek A. *et al.*, A modified and improved method for bisulphite based cytosine methylation analysis, Nucl. Acids Res. 1996, 24, 5064-5066). En la solicitud de patente WO 01/98528 (= DE 100 29 915; = solicitud de patente US 10/311.661) se describe una conversión por bisulfito en la que la muestra de ADN se incuba con una solución de bisulfito con una concentración comprendida entre 0,1 mol/l y 6 mol/l en presencia de un reactivo y/o disolvente de desnaturalización y por lo menos un captador. En dicha solicitud de patente se describen diversos reactivos desnaturalizantes y captadores adecuados. En la solicitud de patente WO 03/038121 (= DE 101 54 317; = US 10/416.624) se describe un método en el que el ADN que se debe analizar está unido a una superficie sólida durante el tratamiento con bisulfito. En consecuencia, se facilitan las etapas de purificación y lavado. En las solicitudes de patente EP 1 394 173 A1 y EP 1 394 172 A1 se describen otras mejoras. La solicitud de patente PCT/EP2004/011715 (= DE 103 47 396.3; DE 103 47 397.1; DE 103 47 400.5; DE 103 47 399.8) describe un tratamiento con bisulfito mejorado mediante la utilización de dioxano o compuestos de n-alquilenglicol junto con un programa de temperatura especial y una etapa especial de purificación por ultrafiltración. En dicha solicitud de patente se describe una temperatura de reacción de 50°C durante 5 h (ejemplo 2).

Sin embargo, un problema básico del tratamiento con bisulfito consiste en el hecho de que son necesarios tiempos de reacción prolongados para asegurar la compleción de la conversión y excluir falsos positivos. Sin embargo, esto provoca a la vez la degradación del ADN debido a estos tiempos de reacción prolongados. Una temperatura de reacción más elevada da como resultado una mayor tasa de conversión, pero también una degradación más intensa del ADN. Recientemente se han investigado sistemáticamente las interacciones entre la temperatura, el tiempo de reacción, la tasa de conversión y la degradación. De esta manera se pudo poner de manifiesto que se alcanzan las mayores tasas de conversión a una temperatura de 55°C (con un tiempo de reacción comprendido entre 4 y 18

horas) y de 95°C (con un tiempo de reacción de una hora). Sin embargo, la degradación del ADN durante este procedimiento constituye un grave problema. Se describe el hecho de que, a una temperatura de reacción de 55°C, se descompone el 84-96% del ADN. A 95°C, la degradación es incluso mayor (Grunau *et al.*: Bisulfite genomic sequencing: systematic investigation of critical experimental parameters. *Nucleic Acids Res.* 1 de julio de 2001; 29(13):E65-5). En consecuencia, la mayoría de los autores aplican temperaturas de reacción de aproximadamente 50°C (véase: Frommer *et al.*, loc. cit. 1992, p. 1827; Olek *et al.*, loc. cit. 1996, p. 5065; Raizis *et al.*: A bisulfite method of 5-methylcytosine mapping that minimizes template degradation, *Anal Biochem.*, 20 de marzo de 1995; 226(1):161-6, 162). En la solicitud de patente WO 2004/067545 A1 (solicitante: Hoffmann-La Roche) se da a conocer un tratamiento con bisulfito mejorado en el que se aplica una temperatura de reacción comprendida entre 70°C y 90°C durante un período comprendido entre 1,5 horas y 3,5 horas.

Debido a las elevadas pérdidas del tratamiento convencional con bisulfito, resulta problemático aplicar estos métodos en investigaciones en las que la cantidad de ADN que se pretende analizar es limitada. Sin embargo, un campo particularmente interesante del análisis de metilación consiste en el diagnóstico de enfermedades cancerosas *et al.* trastornos asociados a un cambio en el estado de metilación mediante el análisis del ADN a partir de fluidos corporales, por ejemplo, la sangre o la orina. Aun así, el ADN está presente sólo en pequeñas concentraciones en dichos fluidos corporales, de modo que la aplicabilidad del análisis de metilación resulta limitada por el bajo rendimiento del tratamiento convencional con bisulfito.

En consecuencia, debido a la particular importancia del análisis de metilación de citosina y a las desventajas anteriormente descritas de la metodología convencional, existe una gran necesidad técnica de métodos mejorados de conversión por bisulfito.

Se ha descubierto que, en determinadas condiciones de reacción optimizadas, utilizando reactivos de desnaturalización, una temperatura de reacción > 50°C, en particular > 55°C, y un tiempo de reacción \geq 5 h, la tasa de conversión de la reacción con bisulfito aumenta de modo inesperado y sorprendente. Este hecho se pudo poner de manifiesto gracias a un nuevo método que permite la determinación exacta de la tasa de conversión del ADN. En una forma de realización preferida de la presente invención, se aplican determinadas combinaciones de tiempo y temperatura (60°C/5 h y 55°C/7 h). Habitualmente, la conversión por bisulfito utilizando reactivos de desnaturalización se lleva a cabo a 50°C durante 5 h (véase el ejemplo 2 del documento PCT/EP2004/011715).

Aunque el experto en la materia conoce que el aumento de la temperatura o del tiempo de reacción puede hacer aumentar el rendimiento de la reacción, no era previsible que el aumento del tiempo y la temperatura que se describe en la presente memoria provocaría un efecto tan marcado, sobre todo porque se creía que un aumento del tiempo/temperatura daría lugar a una mayor degradación del ADN (véase anteriormente). El nuevo procedimiento, sin embargo, proporciona una mayor cantidad de ADN convertido amplificable. El nuevo procedimiento es particularmente aplicable al análisis de ADN derivado de fluidos corporales, por ejemplo, la sangre o el plasma. En combinación con aditivos, condiciones de reacción mejoradas y/o nuevos métodos de purificación, la eficacia de la conversión se puede mejorar adicionalmente. De este modo se hace posible un análisis sensible de metilación de ADN de los fluidos corporales.

Otro aspecto de la presente invención se refiere a la utilización de determinados captadores de radicales en la reacción con bisulfito.

La utilización de captadores de radicales en la reacción con bisulfito es conocida (DE 10029915), pero la mayoría de los métodos conocidos utilizan hidroquinona como captador de radicales (véase: Fromer *et al.*: A genomic sequencing protocol that yields a positive display of 5-methylcytosine residues in individual DNA strands. *Proc. Natl. Acad. Sci. USA*, 1 de marzo de 1992; 89 (5):1827-31).

Descripción

De forma inesperada, se descubrió que es posible aumentar el rendimiento de la reacción con bisulfito añadiendo captadores de radicales específicos, especialmente derivados ácidos del cromano o derivados del ácido gálico. Según la presente invención, se introducen derivados de la vitamina E, particularmente derivados del cromano. Estos compuestos dan lugar a un aumento significativo de la tasa de conversión en comparación con la hidroquinona. La utilización de determinados derivados del cromano es conocida (PCT/EP2004/011715), pero estos captadores de radicales sólo se utilizan en combinación con disolventes desnaturalizantes.

Se ha descubierto que es posible aumentar la tasa de conversión de la reacción con bisulfito mediante la adición de derivados del cromano sin presencia de disolventes desnaturalizantes. La reacción con bisulfito sin adición de disolventes desnaturalizantes, si es posible, presenta diversas ventajas, por ejemplo, la simplificación de la purificación del ADN.

La eficiencia de la conversión se puede mejorar de manera significativa combinando la utilización de captadores de radicales con perfiles de temperatura especiales y nuevos métodos de purificación. Es posible llevar a cabo un análisis sensible de metilación de ADN aislado a partir de tejido o fluidos corporales.

Un aspecto de la presente invención descrito en la presente memoria es un procedimiento para la conversión por bisulfito de ADN, en el que la reacción con bisulfito se lleva a cabo a una temperatura > 50°C y con un tiempo de reacción ≥ 4,5 h, con la condición de que la temperatura sea de 57°C a 65°C a un tiempo de reacción entre 4,5 h y 5 h. En una forma de realización preferida, la reacción con bisulfito se lleva a cabo a una temperatura > 55°C.

La reacción con bisulfito se lleva a cabo con un tiempo de reacción óptimo comprendido entre 5 h y 18 h.

En otra forma de realización preferida, la reacción con bisulfito se lleva a cabo a una temperatura comprendida entre 57°C y 65°C y durante un período comprendido entre 4 h y 30 min y 5 h y 30 min, o a una temperatura comprendida entre 52°C y 57°C y durante un período comprendido entre 6 h y 30 min y 7 h y 30 min.

En una forma de realización preferida, la conversión se lleva a cabo a una temperatura comprendida entre 57°C y 65°C y durante un período comprendido entre 4 h y 45 min y 5 h y 15 min, o a una temperatura comprendida entre 52°C y 57°C y durante un período comprendido entre 6 h y 45 min y 7 h y 45 min.

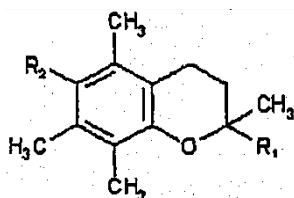
En una forma de realización preferida, la conversión se lleva a cabo a una temperatura comprendida entre 59°C y 62°C y durante un período comprendido entre 4 h y 45 min y 5 h y 15 min, o a una temperatura comprendida entre 54°C y 56°C y durante un período comprendido entre 6 h y 45 min y 7 h y 45 min.

En una forma de realización particularmente preferida, la conversión se lleva a cabo a una temperatura de 60°C durante 5 h, o a una temperatura de 55°C durante 7 h.

Otro aspecto de la presente invención se refiere a la utilización de determinados captadores de radicales en el tratamiento con bisulfito.

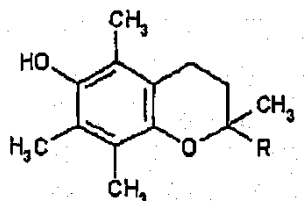
Según el procedimiento de la presente invención, la conversión por bisulfito se lleva a cabo en presencia de un captador de radicales. Los captadores de radicales preferidos son vitamina E o derivados de vitamina E, más preferido el cromano o un derivado de cromano, especialmente ácido 6-hidroxi-2,5,7,8-tetrametilcromano-2-carboxílico (Trolox™).

Los captadores de radicales presentan la siguiente fórmula general:



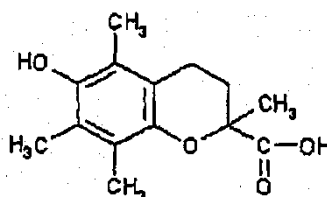
donde R₁ = H, COOH, [CH₂CH₂CH₂(CH₃)₃-CH₃
donde R₂ = H, OH, OAc

Son insertados unos captadores de radicales más preferidos con la siguiente fórmula:



donde R = H, COOH, [CH₂CH₂CH₂(CH₃)₃-CH₃

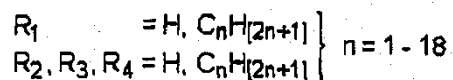
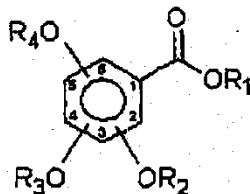
Se insertan los compuestos especialmente más preferidos con la siguiente fórmula:



Que es el ácido 6-hidroxi-2,5,7,8-tetrametilcroman-2-carboxílico (Trolox™).

También pueden utilizarse los compuestos con la siguiente fórmula:

5



10 Posiciones OR₂, OR₃, OR₄: [2,3,4], [2,3,5], [2,3,6], [2,4,5], [2,4,6], [3,4,5]

El ácido trihidroxibenzoico y sus derivados, en particular el ácido gálico (ácido 3,4,5-trihidroxi benzoico) y derivados de ácidos gálicos pueden utilizarse como captadores en la conversión por bisulfito.

15 En las disoluciones ácidas el ácido gálico es más eficaz que los captadores de radicales estándares. El ácido gálico presenta asimismo la ventaja de resultar soluble en agua pudiendo evitar complicaciones durante la purificación.

20 Las propiedades de los captadores radicales son causadas a través del sistema de anillo aromático. Por lo tanto puede esperarse que los cambios en la cadena lateral no presenten una influencia significativa en las propiedades de los captadores radicales. Debido a razones de claridad se presentan únicamente los compuestos en la presente memoria que resultan adecuados especialmente, debido a sus propiedades de solubilidad, y que resultan de una disponibilidad comercial fácil.

25 Los captadores de radicales según la presente invención se introducen en una concentración (con respecto al disolvente de reacción) comprendida entre 1 mmol/l y 500 mmol/l, más preferentemente en una concentración comprendida entre 10 mmol/l y 100 mmol/l, y especialmente en una concentración comprendida entre 20 mmol/l y 60 mmol/l.

30 En una forma de realización preferida de la presente invención, la concentración de Trolox™ está comprendida entre 35 mmol/l y 50 mmol/l. En el caso del ácido gálico y sus derivados, está comprendida entre 50 mmol/l y 60 mmol/l.

Podría resultar ventajoso para el rendimiento de la reacción introducir en la mezcla de reacción un disolvente que aumente la solubilidad del captador de radicales. Son disolventes adecuados, por ejemplo, los compuestos alcohólicos, aldehídicos o cetónicos no desnaturizantes.

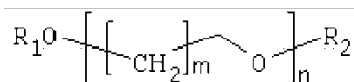
35 El ADN que se pretende investigar puede proceder de diferentes fuentes, en función de que el objetivo sea diagnóstico o científico. Para investigaciones con fines de diagnóstico, se pueden utilizar muestras de tejido como material de partida. Debido a la mayor sensibilidad de la conversión por bisulfito, resulta preferente analizar los fluidos corporales, particularmente el suero o el plasma. También es posible utilizar ADN procedente de esputo, heces, orina o líquido cefalorraquídeo. El ADN se extrae por métodos estándares a partir de la sangre, por ejemplo, con el kit de extracción de ADN UltraSens®, de Qiagen. El experto en la materia conocerá sin duda otros métodos para purificar el ADN.

45 A continuación, el ADN aislado se puede fragmentar, por ejemplo, por reacción con enzimas de restricción. Las condiciones de reacción y las enzimas utilizadas son conocidas por el experto en la materia y se toman, por ejemplo, de los protocolos suministrados por los fabricantes.

50 La conversión por bisulfito se puede llevar a cabo en condiciones de reacción estándar. Sin embargo, la reacción se puede llevar a cabo en presencia de determinados aditivos desnaturizantes (PCT/EP2004/011715). Así, la reacción se puede llevar a cabo en presencia de un compuesto que se selecciona de entre el grupo que comprende el dioxano, uno de sus derivados y un éter cíclico alifático parecido.

Resulta asimismo particularmente preferido que la reacción se realice en presencia de un compuesto de la fórmula siguiente:

55



n = 1-35000

5 m = 1-3

R₁ = H, Me, Et, Pr, Bu

R₂ = H, Me, Et, Pr, Bu

10 Resultan por lo tanto preferidos los compuestos de n-alquilenglicol, particularmente sus dialquil éteres, y especialmente el dietilenglicol dimetil éter (DME) (ver el documento PCT/EP2004/011715).

15 La conversión por bisulfito se puede producir según los protocolos conocidos indicados anteriormente. La reacción puede tener lugar en solución, o también en ADN unido a una fase sólida. Se utiliza disulfito de sodio (= bisulfito de sodio/metabisulfito de sodio), ya que es más soluble en agua que el sulfito de sodio. La sal de disulfito se dismuta en solución acuosa, proporcionando los aniones de hidrogenosulfito necesarios para la conversión de la citosina. Cuando, en adelante, se menciona la concentración de bisulfito, el término se refiere a la concentración de aniones hidrogenosulfito y sulfito en la solución de reacción. En el procedimiento según la presente invención, son posibles intervalos de concentración comprendidos entre 0,1 mol/l y 6 mol/l (véase anteriormente). El intervalo de concentración debe estar comprendido entre 1 mol/l y 6 mol/l, o mejor entre 2 mol/l y 4 mol/l. Sin embargo, cuando se utiliza dioxano, la concentración máxima de bisulfito que se puede utilizar es menor (véase a continuación). Al seleccionarse la concentración de bisulfito, debe tenerse en cuenta que una concentración elevada de bisulfito produce una conversión elevada, pero también una tasa de descomposición alta debido al menor pH.

25 El dioxano puede utilizarse en diferentes concentraciones. La concentración de dioxano está comprendida entre el 10% y el 35% (v/v), o mejor entre el 20% y el 30%, o aún mejor entre el 22% y el 28%, y es particularmente del 25%. Una concentración de dioxano mayor del 35% es problemática porque da lugar a la formación de dos fases dentro de la solución de reacción. En las formas de realización con una concentración de dioxano comprendida entre el 22% y el 28%, la concentración final de bisulfito preferida está comprendida entre 3,3 mol/l y 3,6 mol/l, y en otra forma de realización mejor, con una concentración de dioxano del 25%, la concentración final de bisulfito preferida es de 3,5 mol/l (véase el documento PCT/EP2004/011715).

30 Los compuestos de n-alquilenglicol según la invención pueden utilizarse en un intervalo de concentración diferente. El DME se utiliza en una concentración comprendida entre el 1% y el 35% (v/v). Es óptima una concentración de DME comprendida entre el 5% y el 25%, y la mejor concentración es del 10% (véase el documento PCT/EP2004/011715).

40 Los captadores preferidos que se utilizan en la presente invención son derivados de cromano, por ejemplo ácido 6-hidroxi-2,5,7,8-tetrametilcroman-2-carboxílico (también conocido como Trolox™ C). Sin embargo, para las ventanas de tiempo-temperatura de la presente invención, pueden utilizarse diferentes captadores. Se proporcionan otros ejemplos de captadores en la solicitud de patente WO 01/98528 (= DE 100 29 915; = solicitud de patente US 10/311.661).

45 En el método según la presente invención, la temperatura de reacción se aumenta de forma notable durante un corto período, por lo menos una vez durante el curso de la conversión. De este modo, la eficacia de la conversión por bisulfito se puede aumentar adicionalmente (véase el documento PCT/EP2004/011715). En adelante, los aumentos de la temperatura de corta duración se denominan "picos de temperatura" ("thermospikes"). La temperatura de reacción durante un pico de temperatura se eleva hasta más de 85°C durante por lo menos un pico de temperatura. El número óptimo de picos de temperatura es una función de la temperatura de reacción básica. Cuanto mayor es el número óptimo de picos de temperatura, menor es la temperatura de reacción básica. Es necesario por lo menos un pico de temperatura en cada caso. Por otro lado, en principio, puede concebirse un número cualquiera de picos de temperatura. Por supuesto, debe tenerse en cuenta que, con un número elevado de aumentos de la temperatura, la tasa de descomposición del ADN también aumenta y ya no puede asegurarse una conversión óptima. Por consiguiente, el número óptimo de picos de temperatura está comprendido entre 1 y 10 picos de temperatura cada vez, dependiendo de la temperatura de reacción básica. Así, el número óptimo de picos de temperatura está comprendido entre dos y 5. En los picos de temperatura, la temperatura de reacción aumenta preferentemente hasta un valor comprendido entre 85°C y 100°C, más preferentemente entre 90°C y 98°C, y todavía más preferentemente entre 94°C y 96°C.

60 La duración de los picos de temperatura también depende del volumen del lote de reacción. Debe asegurarse que la temperatura aumente de forma uniforme en toda la solución de reacción total. Para un lote de reacción de 20 µl, cuando se utiliza un termociclador, una duración comprendida entre 15 segundos y 1,5 minutos, especialmente una duración comprendida entre 20 segundos y 50 segundos, da buenos resultados, y una duración de 30 segundos es la óptima. Si se trabaja con un volumen de 100 µl, la duración está comprendida entre 30 segundos y 5 minutos, especialmente entre 1 minuto y 3 minutos. La duración óptima es de 1,5 minutos. Para un volumen de 600 µl, la

duración está comprendida entre 1 minuto y 6 minutos, especialmente entre 2 minutos y 4 minutos, y del mejor modo es de 3 minutos. El experto en la materia podrá fácilmente determinar las duraciones adecuadas de los picos de temperatura para una variedad de volúmenes de reacción.

5 Tras completarse la conversión por bisulfito, el ADN se somete a desulfonación y purificación. Se conocen diferentes métodos para ello (por ejemplo, véase: DE 101 54 317 A1 = US 10/416.624; Grunau *et al* 2001, loc. cit.). Normalmente, la solución de reacción se trata primero con hidróxido de sodio. A continuación se llevan a cabo una neutralización y una precipitación en alcohol del ADN. En una forma de realización de entre las descritas anteriormente, según la presente invención, la purificación se realiza por filtración en gel, por ejemplo, con columnas
 10 Sephadex-G25 (véase el documento PCT/EP2004/011715). De este modo, la sal de bisulfito se puede eliminar de forma muy eficaz sin necesidad de llevar a cabo etapas de lavado adicionales. En otra forma de realización, la purificación se lleva a cabo mediante superficies de unión a ADN, por ejemplo, mediante la resina de purificación Wizard DNA, de Promega (véase: Kawakami *et al*, loc. cit.). Una tercera forma de realización utiliza partículas magnéticas para la purificación, por ejemplo, con ayuda del proceso Magna-Pure®. Estos métodos de purificación dan resultados particularmente buenos en combinación con los compuestos de n-alkilenglicol según la presente invención, particularmente con DME. La purificación se lleva a cabo según las instrucciones del fabricante. El experto en la materia conoce que puede alcanzarse un rendimiento aún más elevado mediante la variación de las instrucciones del fabricante utilizando experimentos estándares. Correspondientemente, los protocolos optimizados también forman parte de la presente invención. El experto en la materia conoce otras instrucciones técnicas para la purificación de ácidos nucleicos por filtración en gel, superficies de unión a ADN y partículas magnéticas, y éstas se obtienen, por ejemplo, a partir de las instrucciones del fabricante. En una forma de realización particularmente más preferida, la purificación se lleva a cabo por ultrafiltración. Dicho procedimiento presenta varias ventajas técnicas y da lugar a una purificación sorprendentemente exitosa del ADN convertido (véase el documento PCT/EP2004/011715). El experto en la materia conoce diferentes sistemas de ultrafiltración disponibles en el mercado y que se pueden utilizar en el procedimiento según la presente invención. En otra forma de realización, se utilizan columnas Microcon™, de Millipore. De este modo, la purificación se puede llevar a cabo según un protocolo del fabricante modificado. Con este fin, la solución de reacción con bisulfito se mezcla con agua y se introduce en la membrana de ultrafiltración. A continuación, 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 lleva a cabo una desulfonación. Para ello, se añade NaOH 0,2 mol/l y el ADN se incuba durante 10 min. A continuación se lleva a cabo otra centrifugación (10 min), seguida de una etapa de lavado con 1 x tampón TE. A continuación se eluye el ADN. Para ello, la membrana se mezcla con 50 µl de 1 x tampón TE caliente (50°C) durante 10 minutos. La membrana se invierte según las instrucciones del fabricante y se lleva a cabo una centrifugación repetida, con lo que se extrae el ADN de la membrana. El eluido se puede utilizar directamente para las reacciones de detección deseadas. El experto en la materia conoce que otros procedimientos pueden estar indicados con otros sistemas de ultrafiltración, y que también puede alcanzarse un buen rendimiento variando las condiciones indicadas anteriormente. Las formas de realización correspondientes también forman parte de la presente invención.

40 El ADN convertido y purificado mediante las diferentes formas de realización descritas anteriormente se puede analizar de diversas maneras. Es particularmente preferido amplificar el ADN mediante una reacción en cadena de la polimerasa. De este modo puede asegurarse una amplificación selectiva del ADN originalmente metilado o no metilado por diferentes métodos, por ejemplo, por el llamado método "HeavyMethyl" (véase: Cottrell *et al*; A real-time PCR assay for DNA-methylation using methylation-specific blockers. Nucleic Acids Res., 13 de enero de 2004; 32(1):e10. WO 02/072880) o la llamada "PCR sensible a la metilación" ("MSP"; véase: Herman *et al*; Methylation-specific PCR: a novel PCR assay for methylation status of CpG islands. Proc Natl Acad Sci USA. 3 de septiembre de 1996; 93(18):9821-6). Los amplificadores obtenidos se pueden detectar por los métodos convencionales, por ejemplo, mediante reacciones de prolongación del cebador ("MsSNuPE"; véase, por ejemplo, el documento DE 100 10 280 = US 10/220.090) o mediante la hibridación a matrices de oligómeros (véase, por ejemplo: Adorjan *et al*, Tumour class prediction and discovery by microarray-based DNA methylation analysis. Nucleic Acids Res. 1 de marzo de 2002; 30(5):e21). En otra forma de realización particularmente preferida los amplificadores se analizan utilizando variantes de la PCR en tiempo real (véase: documento US nº 6.331.393 "Methyl Light"). Las variantes preferidas son los métodos "Taqman" y "LightCycler".

55 Los procedimientos que se dan a conocer en la presente invención se utilizan preferentemente para el diagnóstico y/o el pronóstico de acontecimientos adversos en pacientes o individuos, perteneciendo dichos acontecimientos adversos por lo menos a una de las siguientes categorías: interacciones no deseadas con fármacos; enfermedades cancerosas; disfunciones, daños o enfermedades del SNC; síntomas de agresión o alteraciones del comportamiento; consecuencias clínicas y psicológicas de daños cerebrales; alteraciones psicóticas y trastornos de la personalidad; demencia y/o síndromes asociados; enfermedades, disfunciones y daños cardiovasculares; disfunciones, daños o enfermedades del tubo gastrointestinal; disfunciones, daños o enfermedades del sistema respiratorio; lesión, inflamación, infección, inmunidad y/o convalecencia; disfunciones, daños o enfermedades del organismo como anomalía del proceso de desarrollo; disfunciones, daños o enfermedades de la piel, los músculos, el tejido conjuntivo o los huesos; disfunciones, daños o enfermedades endocrinas y metabólicas; cefaleas o disfunciones sexuales.

Este nuevo método también sirve, de un modo particularmente preferido, para distinguir tipos de células y tejidos o para estudiar la diferenciación celular.

5 Este nuevo método también sirve, de un modo particularmente preferido, para analizar la respuesta de un paciente a un tratamiento farmacológico.

Además, la utilización preferida de los captadores de radicales descritos anteriormente para la conversión por bisulfito del ADN forma parte de la presente invención. Resulta preferida la utilización de la vitamina E o los derivados de vitamina E, más preferida de cromano o derivados de cromano y especialmente preferida de ácido 6-hidroxi-2,5,7,8-tetrametilcroman-2-carboxílico (Trolox™).

10 Resulta preferida la utilización de los derivados de cromano para la reacción con bisulfito sin disolventes/reactivos desnaturizantes.

15 Resulta asimismo preferida la utilización de los compuestos según las fórmulas mencionadas anteriormente.

Resulta preferida la utilización de captadores de radicales con una concentración comprendida entre 1 y 500 mmol/l, más preferentemente con una concentración comprendida entre 10 y 100 mmol/l, y todavía más preferentemente con una concentración comprendida entre 20 y 60 mmol/l.

20 En una forma de realización preferida de la presente invención, la concentración de derivados de cromano está comprendida entre 35 mmol/l y 50 mmol/l.

También se da a conocer un kit que contiene un reactivo de bisulfito y un captador de radicales. Otros compuestos de dicho kit podrían ser tubos de microfiltración, un cebador, polimerasa y compuestos necesarios para la conversión por bisulfito, la purificación y/o la amplificación.

25 El kit no debe contener ningún disolvente/reactivo desnaturizante. Preferentemente, el captador de radicales es un derivado de la vitamina E, especialmente un derivado de cromano como el ácido 6-hidroxi-2,5,7,8-tetrametilcroman-2-carboxílico (Trolox™), respectivamente derivados del ácido trihidroxibenzoico.

Ejemplos

Ejemplo 1:

35 Se comprobará que el método de bisulfito optimizado hace posible un análisis sensible a la metilación del ADN obtenido a partir de fluidos corporales. Para ello, se mezcló 1 ml de plasma humano con una cantidad específica de ADN humano. El ADN se aisló a partir de las muestras de plasma por el método Magna Pure (Roche) según las instrucciones del fabricante. Los 100 µl de eluato resultantes de la purificación se utilizaron completamente en la subsiguiente reacción con bisulfito. El procedimiento para el método según la presente invención fue el siguiente: El eluato se mezcló con 354 µl de solución de bisulfito (5,89 mol/l) y 146 µl de dioxano con un captador de radicales (ácido 6-hidroxi-2,5,7,8-tetrametilcroman-2-carboxílico, 98,6 mg en 2,5 ml de dioxano). La mezcla de reacción se desnaturizó durante 3 min a 99°C y a continuación se incubó con uno de los siguientes programas de temperatura/tiempo:

- 45
- a) para un total de 5 h: 30 min a 50°C; un pico de temperatura (99,9°C) durante 3 min; 1,5 h a 50°C; un pico de temperatura (99,9°C) durante 3 min; 3 h a 50°C;
 - 50 b) para un total de 5 h: 30 min a 60°C; un pico de temperatura (99,9°C) durante 3 min; 1,5 h a 60°C; un pico de temperatura (99,9°C) durante 3 min; 3 h a 60°C; o
 - c) para un total de 7 h: 30 min a 55°C; un pico de temperatura (99,9°C) durante 3 min; 1,5 h a 55°C; un pico de temperatura (99,9°C) durante 3 min; 5 h a 55°C;

55 A continuación, todas las mezclas de reacción se purificaron por ultrafiltración a través de una columna Millipore Microcon™. La purificación se llevó a cabo esencialmente según las instrucciones del fabricante. Para ello, la mezcla de reacción se mezcló con 300 µl de agua, se cargó en la membrana de ultrafiltración, se centrifugó durante 15 min y a continuación se lavó con 1 x tampón TE. En este tratamiento, el ADN permanece en la membrana. A continuación se llevó a cabo una desulfonación. Para ello, se añadió NaOH 0,2 mol/l y se incubó durante 10 min. A continuación se llevó a cabo una centrifugación (10 min), seguida de una etapa de lavado con 1 x tampón TE. A continuación, se eluyó el ADN. Para ello, la membrana se mezcló durante 10 minutos con 50 µl de 1 x tampón TE caliente (50°C). La membrana se invirtió según las instrucciones del fabricante. A continuación se llevó a cabo una centrifugación repetida, con lo que se extrajo el ADN de la membrana. Se utilizaron 10 µl del eluato para la subsiguiente PCR en tiempo real LightCycler.

65 Se analizó un fragmento del gen de la GST-Pi humana. Se utilizaron los siguientes cebadores y sondas: Cebador

directo: GGAGTGGAGGAAATGAGAT (SEC ID 1); cebador inverso: CCTAATCAACACACAATCACTAA (SEC ID 2); Sonda TaqMan: FAM-TGGGTGTTTGTAAATTTTGTGTTTGTGTTAGGTT-TAMRA (SEC ID 3).

5 La amplificación se llevó a cabo mediante un ensayo específico de bisulfito. Se detectaron las señales fluorescentes y la cantidad de ADN convertido y aislado se cuantificó por comparación con curvas de calibración. La figura 1 muestra los resultados del experimento. Un aumento de la temperatura hasta más de 50°C y un aumento del tiempo de reacción hasta más de 5 h produce un aumento significativo del rendimiento de la conversión del ADN. Por consiguiente, el nuevo método da lugar a una cantidad sustancialmente mayor de ADN amplificable convertido. Esto se aplica especialmente a las combinaciones de tiempo/temperatura de 5 h/60°C y 7 h/55°C. La concentración de ADN detectada en el método mejorado es más de dos veces la concentración de ADN de la combinación 5 h/50°C. Este resultado es sorprendente, ya que el experto en la materia no habría podido predecir tanta diferencia en el rendimiento debido a las condiciones de reacción.

15 En la figura 2 se muestran más resultados.

Ejemplo 2:

20 En un experimento parecido al del ejemplo 1, se llevaron a cabo conversiones por bisulfito en diferentes ventanas de tiempo-temperatura: (3,0 h/50°C y 5,0 h/60°C). Se analizaron 5 ng de ADNm (Chemicon) en un fondo de 1 µ de PBL-DNA (Promega). El ADN convertido se purificó tal como se ha descrito anteriormente. El ADN convertido se amplificó mediante la tecnología "HM" utilizando bloqueadores de oligonucleótidos específicos de metilación. En la figura 3 se muestran las curvas de PCR en tiempo real. Claramente, la combinación de temperatura/tiempo correspondiente a 5 h/60°C es la que da mejor resultado.

Ejemplo 3:

30 A partir de los compuestos de la presente invención, es posible aumentar la tasa de conversión de la reacción con bisulfito en comparación con la utilización convencional de hidroquinona. El ADN de suero se aisló mediante el método MagNaPure (Roche) según las instrucciones del fabricante. A continuación, se combinaron los extractos de diversas muestras. Siempre se añaden 500 µl de una solución de bisulfito (4,17 mol/l) a 100 µl. Se introdujeron ácido 6-hidroxi-2,5,7,8-tetrametilcroman-2-carboxílico e hidroquinona, respectivamente, como captador de radicales. La mezcla de reacción se desnaturalizó durante 3 min a 99°C y a continuación se incubó durante 5 h siguiendo el siguiente programa de temperatura: 30 min a 50°C; un pico de temperatura (99,9°C) durante 3 min; 1,5 h a 50°C; un pico de temperatura (99,9°C) durante 3 min; 3 h a 50°C. A continuación, la mezcla de reacción del control, así como la del método según la presente invención, se purificaron por ultrafiltración mediante una columna Millipore Microcon. La purificación se llevó a cabo esencialmente según las instrucciones del fabricante. Para ello, se añadieron 300 µl de agua a la mezcla de reacción y a continuación ésta se colocó en la membrana de ultrafiltración, se centrifugó durante 15 min y se lavó con 1 x tampón TE. Durante este tratamiento, el ADN permanece en la membrana. A continuación se llevó a cabo una desulfonación. Para ello, se añadió NaOH 0,2 mol/l y se incubó durante 10 min. A continuación se llevaron a cabo una centrifugación (10 min) y una etapa de lavado con 1 x tampón TE. A continuación se eluyó el ADN. Para ello, se añadieron 50 µl de 1 x tampón TE caliente (50°C) durante 10 minutos. La membrana se utilizó según las instrucciones del fabricante. A continuación, el ADN que se había extraído de la membrana se volvió a centrifugar. Se utilizaron 10 µl del eluato para la subsiguiente PCR en tiempo real LightCycler. La amplificación se llevó a cabo mediante ensayos específicos de bisulfito. Se realizaron 6 réplicas por variación. Las señales de fluorescencia se detectaron y calcularon con el software LightCycler. En la figura 1 se muestran las curvas de fluorescencia de las amplificaciones. Se pone de manifiesto de manera significativa que la amplificación es significativamente más detectable cuando se añade ácido 6-hidroxi-2,5,7,8-tetrametilcroman-2-carboxílico que cuando se añade hidroquinona. Además, las señales detectadas por el procedimiento según la presente invención son significativamente más intensas. Por consiguiente, la tasa de conversión de la conversión por bisulfito aumenta significativamente.

Ejemplo comparativo 4:

55 Se utilizó ácido gálico (ácido 3,4,5-trihidroxibenzoico, Acros, M = 170,12 g/mol) como captador en la conversión por bisulfito para su comparación con Trolox™. En soluciones ácidas, el ácido gálico es incluso más eficiente que el captador de radicales estándar Trolox™ C (ácido 6-hidroxi-2,5,7,8-tetrametilcroman-2-carboxílico). Además, el ácido gálico tiene la ventaja de que es soluble en agua, lo que puede evitar complicaciones durante la purificación.

60 Se preparó una solución madre disolviendo 85,2 mg de ácido gálico en dioxano. La eficiencia del captador de radicales se analizó mediante la dilución de la solución madre a concentraciones más bajas:

Ácido gálico [mg]	Solución madre de captador de radicales [µl]	Dioxano [µl]	Concentración final [mmol]
85,1	-:-	2.500	50
[68,1]	116,8	29,2	40
[51,1]	87,6	58,4	30

Se utilizó Trolox™ en concentraciones finales de 33 mmol/l.

5 Se preparó una mezcla maestra de ADN que contenía 95 ng de PBL-DNA sin digerir (Promega) y 5 ng de ADN metilado (Chemicon) en 100 µl de volumen de entrada. Se utilizó el ADN metilado para analizar las muestras con el ensayo HeavyMethyl 15667.6, muy sensible. Para cada concentración analizada se trataron 6 réplicas con bisulfito. Para una mejor comparación, se trataron seis muestras adicionales. El tratamiento con bisulfito se llevó a cabo tal como se ha descrito en el ejemplo 3.

10 Se puso de manifiesto que el ácido gálico tenía muy buenas propiedades físicas para su aplicación en la conversión por bisulfito. Se disuelve sin problemas en dioxano y no surge ningún problema durante la purificación.

15 Por lo que parece, el ácido gálico es un captador de radicales muy eficiente. En una forma de realización preferida, se utiliza una concentración de 50 mmol en la reacción con bisulfito. En la figura 5 se muestran los resultados del tratamiento con bisulfito utilizando ácido gálico en comparación con Trolox™. La aplicación de ácido gálico produce una conversión mejorada.

20 El ácido gálico ofrece excelentes propiedades físicas para la preparación de mezclas para reacción con bisulfito y no interfiere con la purificación en columnas Microcon. Además, el compuesto tiene excelentes propiedades químicas y se puede utilizar como captador de radicales en la reacción con bisulfito.

Breve descripción de las figuras

25 La figura 1 muestra los resultados del ejemplo 1. El ADN se aisló a partir de muestras de plasma, se trató con bisulfito según diferentes combinaciones de tiempo/temperatura y se amplificó mediante PCR LightCycler. El rendimiento de ADN en las combinaciones 5 h/60°C y 7 h/55°C es mucho mayor que en la combinación 5 h/50°C.

La figura 2 muestra otros resultados del ejemplo 1.

30 La figura 3 muestra los resultados del ejemplo 2. Se muestran las curvas de PCR en tiempo real del ADN convertido según diferentes ventanas de tiempo/temperatura. A continuación, el ADN se amplificó con bloqueadores específicos de metilación.

35 La figura 4 muestra los resultados del ejemplo 3. El ADN se trató con bisulfito en presencia de un captador (hidroquinona o Trolox™) y a continuación se analizó mediante PCR en tiempo real.

La figura 5 muestra los resultados del ejemplo 4. El rendimiento de diferentes concentraciones de ácido gálico como captador se comparó con un estándar (Trolox™ con una concentración final de 33 mmol/l). Se puso de manifiesto que el ácido gálico produce un rendimiento incluso mayor que el Trolox™.

40 Listado de secuencias

<110> Epigenomics AG

45 <120> Conversión por bisulfito mejorada de ADN

<130> 536-77 EPT2

<150> EP 05 090 090.1

50 <151> 2005-04-01

<150> EP 05 090 135.4

<151> 2005-05-12

55 <160> 3

<170> PatentIn versión 3.5

60 <210> 1

<211> 20

<212> ADN

<213> Secuencia artificial

65 <220>

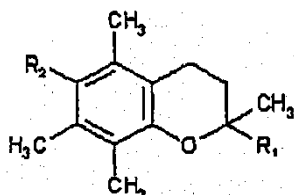
<223> cebador directo

ES 2 647 483 T3

	<400> 1	
5	ggagtggagg aaattgagat	20
	<210> 2	
	<211> 23	
	<212> ADN	
10	<213> Secuencia artificial	
	<220>	
	<223> cebador inverso	
	<400> 2	
15	cctaatcaac acacaatcac taa	23
	<210> 3	
	<211> 33	
20	<212> ADN	
	<213> Secuencia artificial	
	<220>	
25	<223> sonda taqman	
	<400> 3	
	tgggtgttg taattttgt tttgttag gtt	33
30		

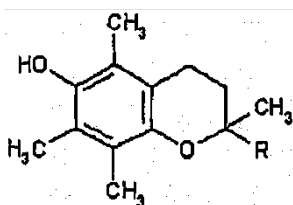
REIVINDICACIONES

1. Procedimiento para la conversión por bisulfito de ADN, en el que la reacción con bisulfito se lleva a cabo a una temperatura $> 50^{\circ}\text{C}$ y con un tiempo de reacción $\geq 4,5$ h, con la condición de que la temperatura sea de 57°C a 65°C a un tiempo de reacción entre 4,5 h y 5 h, caracterizado por que la reacción se realiza en presencia de un compuesto con la fórmula general siguiente:



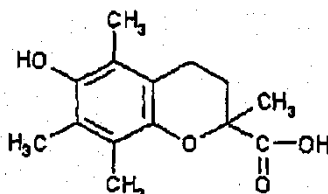
en la que $R_1 = \text{H}, \text{COOH}, [\text{CH}_2\text{CH}_2\text{CH}(\text{CH}_3)]_3\text{-CH}_3$
y $R_2 = \text{H}, \text{OH}, \text{OAc}$.

2. Procedimiento según la reivindicación 1, en el que el compuesto presenta la fórmula general siguiente:



en la que $R = \text{H}, \text{COOH}, [\text{CH}_2\text{CH}_2\text{CH}(\text{CH}_3)]_3\text{-CH}_3$.

3. Procedimiento según la reivindicación 2, en el que el compuesto presenta la fórmula general siguiente:



4. Procedimiento según cualquiera de las reivindicaciones 1 a 3, en el que la reacción con bisulfito se lleva a cabo a una temperatura $> 55^{\circ}\text{C}$ y con un tiempo de reacción ≥ 5 h, en el que la temperatura es de 57°C a 65°C a un tiempo de reacción entre 4,5 h y 5 h.

5. Procedimiento según cualquiera de las reivindicaciones 1 a 4, en el que la reacción con bisulfito se realiza con un tiempo de reacción de 5 h a 18 h.

6. Procedimiento según cualquiera de las reivindicaciones 1 a 5, caracterizado además por que es analizado el ADN derivado de fluidos corporales.

7. Procedimiento según la reivindicación 6, caracterizado además por que el fluido corporal es sangre o plasma.

8. Procedimiento según cualquiera de las reivindicaciones 1 a 7, caracterizado además por que la temperatura de reacción se aumenta hasta un intervalo de 85 a 100°C brevemente durante el curso de la conversión (pico térmico).

9. Utilización del procedimiento según cualquiera de las reivindicaciones 1 a 8 para el diagnóstico y/o el pronóstico de episodios adversos para pacientes o individuos, perteneciendo estos episodios adversos a por lo menos una de las categorías siguientes: interacciones con fármacos no deseadas; enfermedades cancerosas; disfunciones, daños o enfermedades del SNC; síntomas de agresividad o alteraciones del comportamiento; consecuencias clínicas y psicológicas de daños cerebrales; alteraciones psicóticas y trastornos de la personalidad; demencia y/o síndromes

- asociados; enfermedades, disfunciones y daños cardiovasculares; disfunciones, daños o enfermedades del tubo gastrointestinal; disfunciones, daños o enfermedades del sistema respiratorio; lesión, inflamación, infección, inmunidad y/o convalecencia; disfunciones, daños o enfermedades del organismo como anomalía en el proceso de desarrollo; disfunciones, daños o enfermedades de la piel, de los músculos, del tejido conjuntivo o de los huesos;
- 5 disfunciones, daños o enfermedades endocrinas y metabólicas; cefaleas o disfunciones sexuales.

Fig. 1

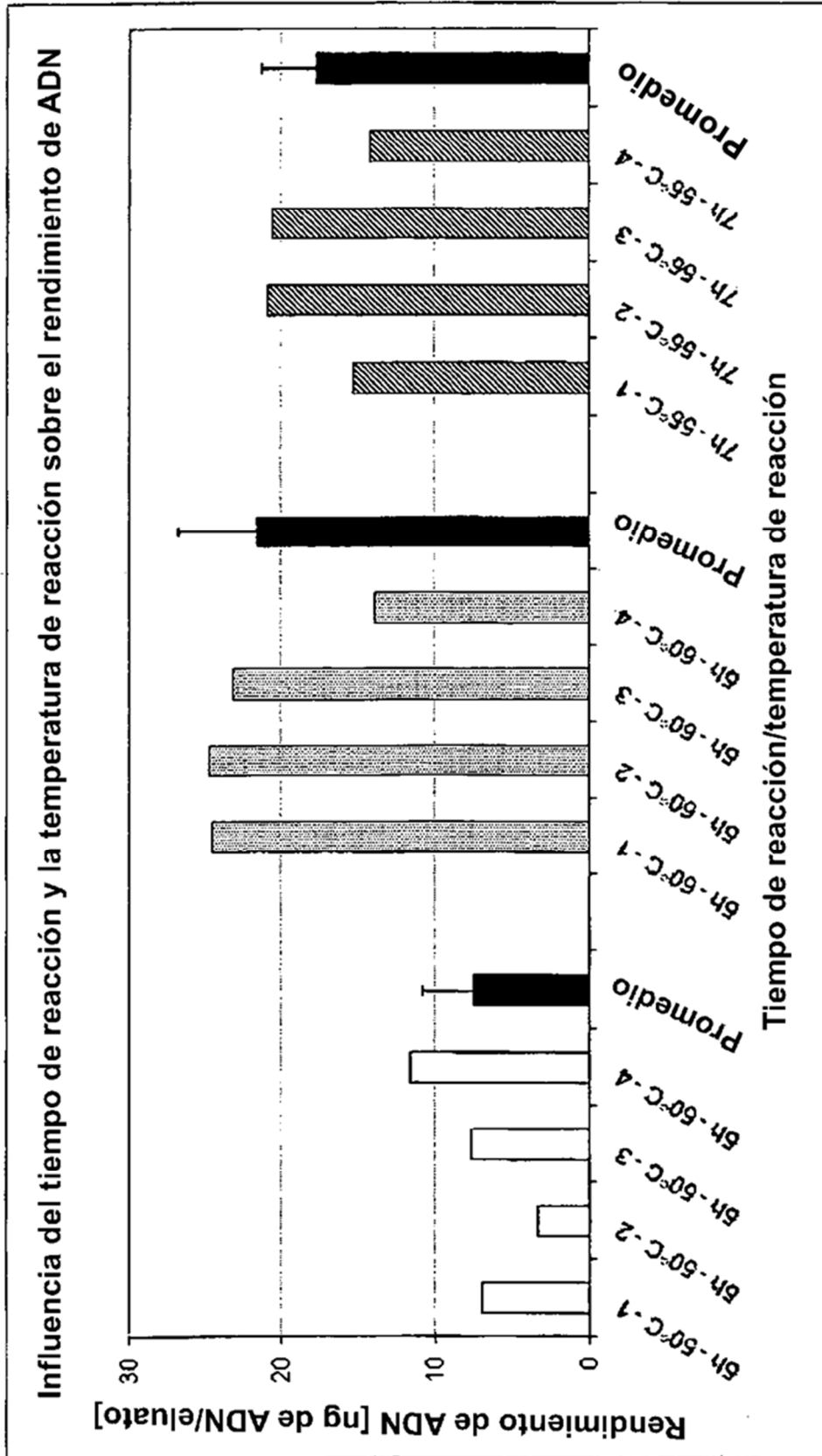


Fig. 2

Curvas de amplificación

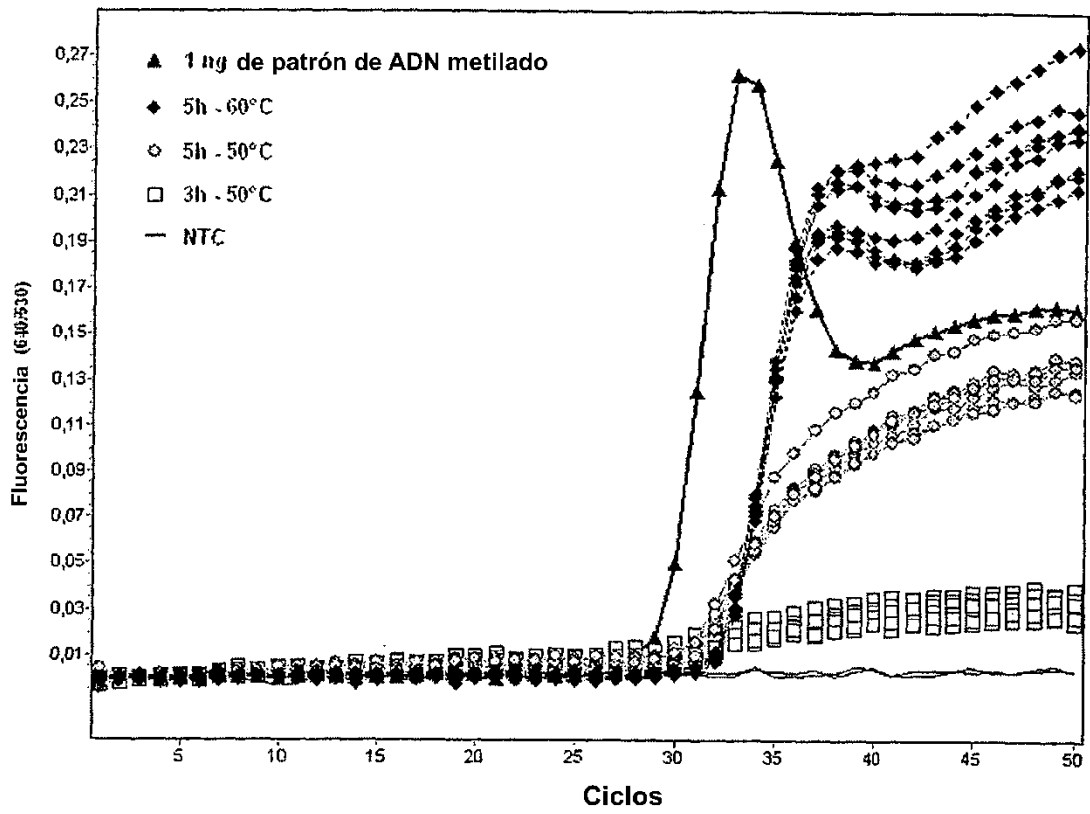


Fig. 3

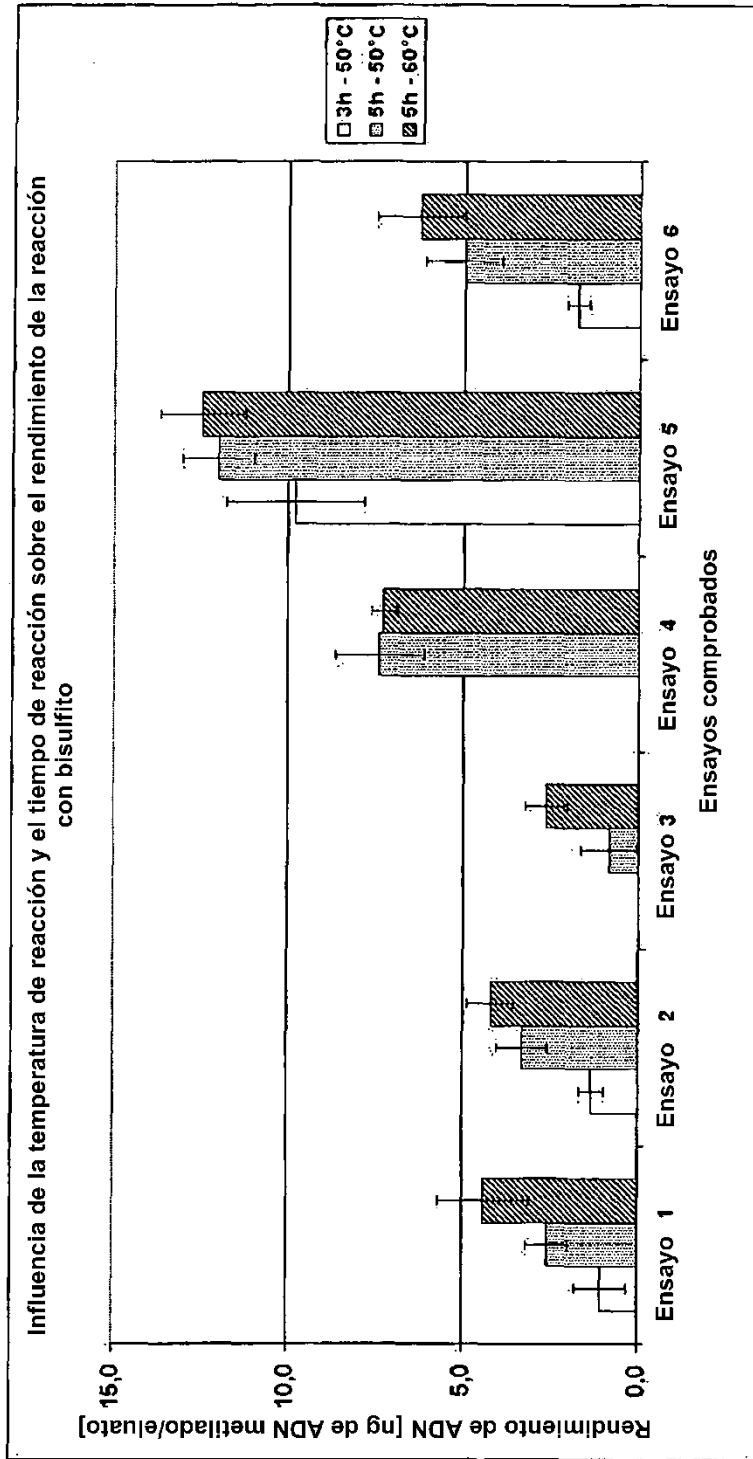


Fig. 4

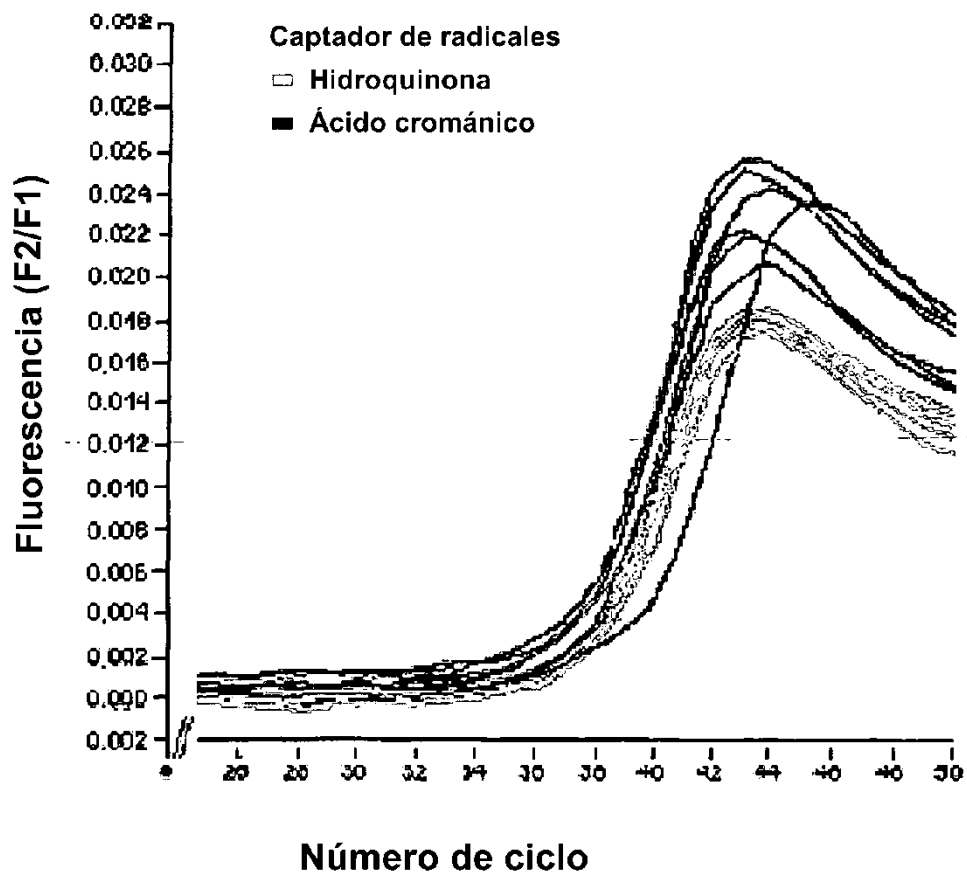


Fig. 5

