

19



OFICINA ESPAÑOLA DE  
PATENTES Y MARCAS

ESPAÑA



11 Número de publicación: **2 545 577**

51 Int. Cl.:

**C07H 21/00** (2006.01)

**C12Q 1/68** (2006.01)

12

TRADUCCIÓN DE PATENTE EUROPEA

T3

96 Fecha de presentación y número de la solicitud europea: **27.08.2003 E 07012188 (4)**

97 Fecha y número de publicación de la concesión europea: **29.07.2015 EP 1829886**

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

30 Prioridad:

**29.08.2002 EP 02019097**

**18.12.2002 EP 02028114**

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

**14.09.2015**

73 Titular/es:

**EPIGENOMICS AG (100.0%)**

**Geneststrasse 5**

**10829 Berlin, DE**

72 Inventor/es:

**MARKERT-HAHN, CHRISTINE, DR. y**

**BLOCK, DIRK, DR.**

74 Agente/Representante:

**LAZCANO GAINZA, Jesús**

**ES 2 545 577 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

Método mejorado para el tratamiento con bisulfito.

5 La presente aplicación se refiere a un método para desarrollar una reacción con bisulfito para determinar las posiciones de metilación en un ácido nucleico, es decir las citosinas metiladas y no metiladas, de manera que el ácido nucleico no se une a una fase sólida durante la etapa de desaminación y/o desulfonación de la reacción con bisulfito. La fase sólida es preferentemente un material que comprende vidrio o sílice, con mayor preferencia lana de vidrio, una membrana de vidrio o una partícula de vidrio magnética. Más aun, se describe la utilización de una fase sólida para unir un ácido nucleico durante la etapa de desaminación y/o desulfonación de la reacción con bisulfito y un estuche que contiene un reactivo de bisulfito y una fase sólida.

15 Los genes constituyen solamente una pequeña proporción del genoma total de los mamíferos, y el control preciso de su expresión en presencia de un impresionante fondo de ácido desoxirribonucleico (ADN) no codificadora presenta un problema sustancial para su regulación. El ADN no codificador, que contiene intrones, elementos repetitivos, y elementos que se pueden transponer potencialmente activos, requiere mecanismos eficaces para su silenciamiento a largo plazo. Los mamíferos parecen aprovechar las posibilidades que ofrece la metilación de las citosinas para proporcionar un mecanismo heredable para alterar las interacciones ADN-proteína para asistir en tal silenciamiento. La metilación del ADN es esencial para el desarrollo de los mamíferos; y desempeña una función potencial durante el envejecimiento y el cáncer. La implicación de la metilación en la regulación de la expresión génica y como una modificación epigenética que marca los genes improntados se estableció bien. En los mamíferos, la metilación tiene lugar solo en los residuos de citosina y más específicamente solo en los residuos de citosina adyacentes a un residuo de guanina, es decir en la secuencia CG. La detección y mapeo de los sitios de metilación del ADN son etapas esenciales para la comprensión de las señales moleculares que indican si una secuencia dada está metilada.

25 Esto se logra actualmente mediante el método que se denomina del bisulfito que se describió por Frommer, M., y otros, Proc Natl Acad Sci U S A 89 (1992) 1827-31) para la detección de 5-metilcitosinas. El método del bisulfito para el mapeo de la 5-metilcitosina utiliza el efecto de que el hidrógeno sulfito sódico reacciona con la citosina pero no reacciona o reacciona solo de manera débil con la 5-metilcitosina. La citosina reacciona con el bisulfito para formar una citosina sulfonada que es un producto intermedio de la reacción la cual es propensa a experimentar una desaminación que resulta en un uracilo sulfonado que puede desulfonarse a uracilo bajo condiciones alcalinas. Es de conocimiento general que el uracilo tiene el comportamiento de apareamiento de bases de la timina diferente al de la citosina de partida mientras que la 5-metilcitosina tiene el comportamiento de apareamiento de bases de la citosina. Esto hace posible la discriminación entre citosinas metiladas o no metiladas mediante por ejemplo la secuenciación genómica con bisulfito (Grigg, G. y Clark, S., Bioessays 16 (1994) 431-6; Grigg, G. W., DNA Seq 6 (1996) 189-98) PCR específica de metilación (MSP) que se describe en la patente de los Estados Unidos 5,786,146.

40 Existen varios documentos que se dirigen a aspectos específicos de la reacción con bisulfito (Benyajati, C., y otros, Nucleic Acids Res 8 (1980) 5649-67) que realizan investigaciones generales acerca de la modificación con bisulfito de la 5-metildesoxicitosina y de la desoxicitosina (Olek, A., y otros, Nucleic Acids Res 24 (1996) 5064-6) que describen un método para la secuenciación de bases con bisulfito de manera que el tratamiento con bisulfito y las etapas de PCR subsecuentes se realizan sobre un material que se incrusta en perlas de agarosa. En el método del bisulfito que se describe por Clark, S. J., y otros, Nucleic Acids Res 22 (1994) 2990-7, la muestra se desala después de la desaminación.

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

55 Existen estuches para realizar tratamientos con bisulfito disponibles comercialmente en Intergen, que se distribuyen Serologicals Corporation, Norcross, GA, Estados Unidos, por ejemplo el estuche de modificación de ADNCpGenome™.

60 Una variación del método de secuenciación genómica con bisulfito se describe por Feil, R., y otros, Nucleic Acids Res 22 (1994) 695-6, de manera que el ADN genómico se une a perlas de vidrio después de la desaminación y el lavado. Después de la elución el ácido nucleico se desulfona. Se conoce que los ácidos nucleicos pueden aislarse mediante la utilización de su comportamiento de unión a superficies de vidrio, por ejemplo la adsorción a gel de sílice o a tierra de diatomeas, adsorción a partículas magnéticas de vidrio (MGPs) o a partículas de órgano silanos bajo condiciones caotrópicas. La extracción mediante la utilización de fases sólidas usualmente contiene las etapas de adición de la solución con los ácidos nucleicos a la fase sólida bajo condiciones que permitan la unión de la sustancia de interés a la fase sólida, la eliminación del resto de la solución de los ácidos nucleicos unidos a la fase sólida y la subsecuente

liberación de los ácidos nucleicos de la fase sólida en un eluato líquido (que algunas veces se denomina elución). El resultado de tal proceso es usualmente una solución que contiene la sustancia de interés en estado disuelto.

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

10 El problema que se discute con anterioridad se soluciona mediante la proporción de un método para la conversión de una base citosina, preferentemente de bases citosina, en un ácido nucleico a una base uracilo, preferentemente a bases uracilo, de manera que preferentemente las bases 5-metilcitosina no se convierten significativamente ("reacción con bisulfito" o "tratamiento con bisulfito") de manera que el ácido nucleico no se une a una fase sólida durante la etapa de desaminación de la reacción con bisulfito. Preferentemente la fase sólida es lana de vidrio, una membrana de vidrio o una partícula de vidrio magnética. Más aun, la presente invención describe usos de una fase sólida en la etapa de desaminación y/o desulfonación de la reacción con bisulfito y estuches que contienen una fase sólida y reactivos para realizar una reacción con bisulfito.

20 El uso de una fase sólida durante la etapa de desulfonación de la reacción con bisulfito, tiene la ventaja de que el manejo es más sencillo y/o fácilmente susceptible de automatización. Por ejemplo, cuando se utilizan lanas de vidrio para las etapas de desaminación y/o desulfonación, no son necesarias reacciones de precipitación de ADN que consumen mucho tiempo; la separación del ADN unido-libre puede lograrse fácilmente por centrifugación, el volumen muerto de la lana de vidrio es despreciable y por lo tanto las etapas de lavado son muy eficaces. Esto es una ventaja cuando el ADN que se trata con bisulfito se utiliza para PCR donde inhibidores potenciales pueden reducir significativamente la sensibilidad. El método de acuerdo con la invención puede realizarse fácilmente de manera manual y es por lo tanto muy adecuado para laboratorios más pequeños donde los analizadores de rutina no están disponibles. Para laboratorios mayores con un mayor número de muestras, es ventajosa la utilización de una fase sólida que pueda manejarse por los analizadores de rutina, en particular partículas de vidrio magnéticas. En una reacción con bisulfito de rutina se eligen condiciones desnaturalizantes ya que el bisulfito puede reaccionar solamente con pirimidinas que no se implican en el apareamiento de bases. Por lo tanto, es sorprendente que la reacción con bisulfito pueda realizarse con éxito de manera satisfactoria mediante el método de acuerdo con la invención ya que el ácido nucleico se une a la superficie de la fase sólida por varias interacciones que posiblemente influyan en el éxito de la reacción con bisulfito.

35 De acuerdo con la invención, el término "reacción con bisulfito", "tratamiento con bisulfito" o "método del bisulfito" significará una reacción para la conversión de una base citosina, en particular de bases citosina, en un ácido nucleico a una base o bases uracilo, preferentemente en presencia de iones bisulfito de manera que preferentemente las bases 5-metilcitosina no se convierten de manera significativa. Esta reacción para la detección de citosinas metiladas se describió en detalle por Frommer y otros, supra y Grigg y Clark, supra. La reacción con bisulfito contiene una etapa de desaminación y una etapa de desulfonación que pueden realizarse separadamente o simultáneamente (ver Figura 1; Grigg y Clark, supra). La declaración de que las bases 5-metilcitosina no se convierten de manera significativa solamente tendrá en cuenta el hecho de que no puede excluirse que un pequeño porcentaje de bases 5-metilcitosinase convierta a uracilo aunque se desee convertir solamente y exclusivamente las bases citosina (no metiladas) (Frommer y otros, supra).

45 El método de la invención puede realizarse en varias disposiciones de las etapas de reacción con bisulfito e inmovilización.

50 Como se describe en la presente descripción, la etapa de desaminación y desulfonación se realiza mientras que el ácido nucleico está unido a la fase sólida. Por lo tanto en la presente descripción se describe un método para la conversión de una base citosina, en un ácido nucleico a una base uracilo ("reacción con bisulfito") de manera que las bases 5-metilcitosinano se convierten de manera significativa, que comprende las etapas de

- a) unión del ácido nucleico a una fase sólida,
- b) incubación del ácido nucleico unido a la fase sólida en presencia de iones sulfito de manera que el ácido nucleico se desamina,
- c) lavado opcional del ácido nucleico unido a la fase sólida desaminado,
- 55 d) incubación del ácido nucleico unido a la fase sólida desaminado bajo condiciones alcalinas de manera que el ácido nucleico desaminado se desulfona,
- e) lavado opcional del ácido nucleico unido a la fase sólida desaminado y desulfonado, y
- f) elución opcional del ácido nucleico desaminado y desulfonado de la fase sólida.

60 De acuerdo con la invención, la etapa de desulfonación se realiza mientras el ácido nucleico está unido a la fase sólida. Por lo tanto, la presente invención proporciona un método para la conversión de una base citosina, preferentemente de bases citosina, en un ácido nucleico a una base uracilo, preferentemente a bases uracilo, de manera que las bases 5-metilcitosina no se convierten de manera significativa ("reacción con bisulfito"), que comprende las etapas de

- 65 a) incubación del ácido nucleico en presencia de iones sulfito de manera que el ácido nucleico se desamina,

- b) unión del ácido nucleico desaminado a una fase sólida,
- c) lavado opcional del ácido nucleico unido a la fase sólida desaminado,
- d) incubación del ácido nucleico unido a la fase sólida desaminado bajo condiciones alcalinas de manera que el ácido nucleico desaminado se desulfona,
- 5 e) lavado opcional del ácido nucleico unido a la fase sólida desaminado y desulfonado, y
- f) elución opcional del ácido nucleico desaminado y desulfonado de la fase sólida.

En la presente descripción se describe además que la etapa de desaminación se realiza mientras el ácido nucleico está unido a la fase sólida. Por lo tanto, en la presente descripción se describe también un método para la conversión de una base citosina, en un ácido nucleico a una base uracilo de manera que las bases 5-metilcitosina no se convierten de manera significativa ("reacción con bisulfito"), que comprende las etapas de

- a) unión del ácido nucleico a una fase sólida,
- b) incubación del ácido nucleico unido a la fase sólida en presencia de iones sulfito de manera que el ácido nucleico se desamina,
- 15 c) lavado opcional del ácido nucleico unido a la fase sólida,
- d) elución del ácido nucleico desaminado de la fase sólida,
- e) incubación del ácido nucleico desaminado bajo condiciones alcalinas de manera que el ácido nucleico desaminado se desulfona.

El experto con experiencia en la materia conoce cómo realizar la reacción con bisulfito, por ejemplo mediante referencia a Frommer y otros, supra o Grigg y Clark, supra quienes describen los parámetros principales de la reacción con bisulfito. De Grunau y otros, supra, se conoce por el experto en la materia qué variaciones son posibles en el método del bisulfito. Se describe la influencia de la temperatura y del tiempo de incubación sobre la eficiencia de desaminación y los parámetros que influyen sobre la degradación del ADN. En resumen, en la etapa de desaminación se emplea un amortiguador que contiene iones bisulfito, de manera opcional agentes caotrópicos y de manera opcional reactivos adicionales tales como un alcohol o estabilizantes tales como hidroquinona y el pH está en el rango ácido. La concentración de bisulfito está entre 0.1 y 6 M de bisulfito, preferentemente de 1 M a 5.5 M, la concentración del agente caotrópico está entre 1 y 8 M, de manera que se emplean preferentemente sales de guanidinio, el pH está en el rango ácido, preferentemente entre 4.5 y 6.5, la temperatura está entre 0 oC y 90 oC, preferentemente entre la temperatura ambiente (25 oC) y 90 oC, y el tiempo de reacción está entre 30 min y 24 horas o 48 horas o incluso mayor, pero preferentemente entre 1 hora y 24 horas. La etapa de desulfonación se realiza mediante la adición de un amortiguador o solución alcalina tal como por ejemplo una solución que contenga solamente un hidróxido, por ejemplo hidróxido sódico, o una solución que contenga etanol, cloruro sódico e hidróxido de sodio (por ejemplo EtOH 38%, NaCl 100 mM, NaOH 200 mM) e incubando a temperatura ambiente o a temperaturas elevadas durante varios minutos, preferentemente de 5 min a 60 min.

En una modalidad de la invención, el ácido nucleico es ácido desoxirribonucleico (ADN), en particular ADN genómico o ácido nucleico, es decir el ADN o el ácido nucleico que se encuentra en el genoma del organismo y que se trasmite a la descendencia como información necesaria para la supervivencia. La frase se utiliza para distinguir entre otros tipos de ADN, tales como los que se encuentran en plásmidos. El origen del ácido nucleico puede eucariótico o procariótico, preferentemente de vertebrado, de manera particular de mamíferos, con mayor preferencia de animales o humanos.

En una modalidad de la invención, el ácido nucleico se une a la fase sólida, que está sin modificar, es decir el ácido nucleico se une directamente sin ningún compuesto que medie la unión a la fase sólida. El ácido nucleico se une a la superficie sin modificar de la fase sólida, de manera que la unión a la superficie tendrá en cuenta además que la fase sólida puede contener poros y que el ácido nucleico puede unirse a las superficies en los poros de la fase sólida. En modalidades de acuerdo con la invención, la fase sólida puede ser un intercambiador iónico (disponible comercialmente en por ejemplo Amersham Biosciences Europe, Freiburg, Alemania), capaz de unir a un ácido nucleico bajo condiciones específicas, hidroxiapatita (disponible comercialmente en Sigma, Taufkirchen, Alemania), vidrio o sílice o materiales que comprendan vidrio o sílice, preferentemente con una superficie no modificada. En otra modalidad la fase sólida puede modificarse, esto es la fase sólida une indirectamente al ácido nucleico con un compuesto que media la unión a la fase sólida, por ejemplo mediante la unión específica de secuencia del ácido nucleico a oligonucleótidos que se unen a la superficie o mediante la unión de estreptavidina (que se fija a la superficie de la fase sólida) a ADN marcado con biotina. Por lo tanto partículas adecuadas están disponibles comercialmente en DYNAL, Oslo, Noruega y se describen por ejemplo en el documento WO 90/06045.

El término "no modificada" significa que no existe ninguna modificación química adicional, es decir ningún otro grupo químico se une de manera covalente o no covalente. El término "superficie no modificada", "superficie de sílice no modificada" o "superficie de vidrio no modificada", significa que no hay otros grupos químicos unidos de manera covalente o no covalente que sirvan como sustancia intermediaria para la unión del ácido nucleico y en la que los ácidos nucleicos se unen a la sustancia intermediaria y no a la propia superficie de sílice. Por lo tanto, los ácidos nucleicos se unen preferentemente mediante enlaces de hidrógeno y otras fuerzas atómicas de manera directa a la "superficie no modificada". Un ejemplo de una superficie modificada son las superficies de sílice a las cuales se fijan oligonucleótidos

que unen de manera secuencia-específica a moléculas de ácido nucleico. Otro ejemplo de superficies de sílice modificadas son las superficies de sílice recubiertas con estreptavidina que se unen a moléculas de ADN biotiniladas.

5 En una modalidad preferida de manera particular de acuerdo con la invención la fase sólida es un material que comprende vidrio o sílice, preferentemente con una superficie (vidrio o sílice) no modificada, por ejemplo fibras de vidrio o, tierra de diatomeas, perlas o partículas de vidrio, membranas de vidrio o partículas de vidrio magnéticas u otras sustancias cubiertas con una superficie de vidrio no modificada. Se prefieren de manera particular lanas de vidrio o membranas de vidrio o partículas de vidrio magnéticas. Tales fases sólidas se describen por ejemplo en EP 0 389 063 o US5,234,809.

10 Las condiciones para la unión de ADN o de ácidos nucleicos a superficies de vidrio o sílice se conocen básicamente por los expertos en el campo. Estos procesos se describen con detalle por varios documentos. En Vogelstein, B. y Gillespie, D., Proc Natl Acad Sci U S A 76 (1979) 615-9, por ejemplo, se propone un procedimiento para la unión de ácidos nucleicos de geles de agarosa en presencia de yoduro sódico a vidrio incoloro esmerilado. La purificación de ADN plasmídico de bacterias sobre polvo de vidrio en presencia de perclorato sódico se describe en Marko, M. A., y otros, Anal Biochem 121 (1982) 382-7. En DE-A 37 34 442, se describe el aislamiento de ADN monocatenario del fago M13 sobre filtros de fibra de vidrio mediante la precipitación de las partículas del fago mediante la utilización de ácido acético y la lisis de las partículas del fago con perclorato. Los ácidos nucleicos que se unen a los filtros de fibra de vidrio se lavan y se eluyen después con un amortiguador Tris/EDTA que contiene metanol. Un procedimiento similar para purificar ADN de fagos lambda se describe en Jakobi, R., y otros, Anal Biochem 175 (1988) 196-201. El procedimiento supone la unión selectiva de ácidos nucleicos a superficies de vidrio en soluciones de sales caotrópicas y la separación de los ácidos nucleicos de los contaminantes tales como agarosa, proteínas o residuos celulares. Para separar las partículas de vidrio de los contaminantes, las partículas pueden centrifugarse o los fluidos se extraen a través de filtros de fibra de vidrio. Ésta es una etapa limitante, sin embargo, que impide que el procedimiento se utilice para procesar grandes cantidades de muestras. En una modalidad preferida de la invención, se utilizan partículas de vidrio magnéticas para unir los ácidos nucleicos después de la precipitación por adición de sal y etanol según se describe en, por ejemplo, Alderton, R. P., y otros, Anal Biochem 201 (1992) 166-9 y en el documento [WO 91/12079](#) (PCT GB 91/00212).

30 En una modalidad muy preferida de la invención, la fase sólida es una partícula de vidrio magnética, preferentemente con una superficie de vidrio no modificada. Las partículas de vidrio magnéticas son una dispersión sólida de pequeños núcleos magnéticos en vidrio, es decir, son gotitas de vidrio en las que están dispersos objetos magnéticos muy pequeños. Esos objetos que se refieren como magnéticos se atraen por un imán, es decir, por ejemplo, por materiales ferri o ferromagnéticos o super paramagnéticos. Las sustancias paramagnéticas no son útiles ya que solamente se atraen por los imanes muy débilmente lo que no es suficiente para un método de acuerdo con esta invención. Se prefieren los materiales ferri o ferromagnéticos, en particular si todavía no son premagnetizados. La premagnetización en este contexto se entiende que significa la puesta en contacto con un imán, que incrementa la remanencia. Los materiales magnéticos que se prefieren son hierro u óxido de hierro tal como por ejemplo magnetita (Fe<sub>3</sub>O<sub>4</sub>) o Fe<sub>2</sub>O<sub>3</sub>, preferentemente gamma-Fe<sub>2</sub>O<sub>3</sub>. En principio, podría utilizarse ferrita bárica, níquel, cobalto, aleaciones de Al-Ni-Fe-Co o cualquier otro material ferri o ferromagnético. Se prefieren de manera particular de acuerdo con la presente invención las partículas de vidrio magnéticas que se describen en los documentos [WO 96/41811](#), [WO 00/32762](#) y [WO 01/37291](#).

45 En una modalidad muy preferida de la invención, las partículas de vidrio magnéticas tienen un lixiviador de hierro inferior, ya que el hierro es un inhibidor de la subsecuente reacción de amplificación, es decir el hierro es un inhibidor enzimático. Por lo tanto, esta es una característica importante de las partículas de vidrio magnéticas. Preferentemente, el lixiviador de hierro en agua o HCl 1 M (durante 20 min) está por debajo de 40 ppm, con mayor preferencia por debajo de 20 ppm, con aun mayor preferencia por debajo de 10 ppm. En la modalidad de la invención que se prefiere más, las partículas de vidrio magnéticas son las que se describen en la solicitud internacional [WO 01/37291](#) que están disponibles además públicamente en el estuche ADN MagNA Pure LC DNA Isolation Kit I (Roche, Mannheim, Alemania). Estas partículas sedimentan de manera lenta y se pueden utilizar por lo tanto de manera ventajosa en un método automatizado de acuerdo con la invención. La producción de las mismas se resume a continuación.

50 Las partículas de vidrio magnéticas son sustancialmente esféricas y tienen un pequeño diámetro y contienen al menos un objeto magnético con un diámetro entre 5 y 500 nm. Esto tiene consecuencias sorprendentes sobre la cinética de sedimentación, que se cuantifica por los valores de tiempo medio t<sub>1/2</sub>, que es el tiempo que transcurre hasta que el 50 % de las partículas sedimenta a partir de un elemento de volumen específico. El período de vida media para la sedimentación de una suspensión de peso por volumen de 3 mg/ml de las MGPs con una superficie de vidrio no modificada de acuerdo con la invención en isopropanol es más de 3 min, preferentemente 4 min, con mayor preferencia 6 min. Sin embargo los valores que se prefieren más para el periodo de vida media son de más de 10 min o incluso de más de 20 min. Los objetos magnéticos de las MGPs que se prefieren más pueden ser, por ejemplo, pigmentos magnéticos. El tamaño de los objetos magnéticos está en el intervalo nanométrico, es decir entre 5 y 500 nm, preferentemente entre 10 y 200 nm, con mayor preferencia entre 15 y 50 nm. Los pigmentos magnéticos adecuados se producen por la compañía CERAC y tienen un diámetro medio de 23 nm y constan de  $\gamma$ -Fe<sub>2</sub>O<sub>3</sub> (superficie BET 50 m<sup>2</sup>/g, CERAC: P.O. Box 1178, Milwaukee, Wisconsin 53201-1178 Estados Unidos; Artículo-núm. I-2012). Las partículas de vidrio magnéticas que se prefieren más de acuerdo con la presente invención se caracterizan además por el hecho de que las MGPs tienen un diámetro de partícula entre 0.5  $\mu$ m y 5  $\mu$ m, preferentemente entre 1  $\mu$ m y 2  $\mu$ m según se

determinó mediante microscopía electrónica de barrido de alta resolución, mientras que los objetos magnéticos tienen un diámetro entre 5 y 500 nm, preferentemente entre 10 y 200 nm, con mayor preferencia en el intervalo de 15 a 50 nm según se describió anteriormente. Por lo tanto, las MGPs se caracterizan además por una relación de diámetros entre el núcleo de pigmento magnético y la partícula de vidrio magnética menor de 1 a 10 según se determinó mediante microscopía electrónica de barrido de alta resolución. Las MGPs que se prefieren más son microporosas pero tienen una superficie muy estructurada y por lo tanto relativamente grande, con más de 6 m<sup>2</sup>/g. Preferentemente, las partículas de vidrio magnéticas tienen un área de superficie en el intervalo de 5 a 100 m<sup>2</sup>/g, preferentemente de 5 a 90 m<sup>2</sup>/g, con mayor preferencia en el intervalo de 10 a 50 m<sup>2</sup>/g, con mayor preferencia en el intervalo de 15 a 30 m<sup>2</sup>/g. Ésta se puede determinar mediante el método de Braunauer-Emmett-Teller mediante la utilización de un aparato comercial automático. Para una discusión de este método, que se denomina de manera familiar el método BET, ver Braunauer, en "The Adsorption of Gases and Vapors" (1943), Princeton University Press.

Las partículas de vidrio magnéticas que se utilizan en la presente invención pueden proporcionarse en diferentes formulaciones esencialmente según se describe en el documento WO 01/37291. Es posible proporcionarlas en la forma de una tableta, como un polvo o preferentemente como una suspensión. En una modalidad preferida de la invención estas suspensiones contienen entre 5 y 60 mg/ml de partículas de vidrio magnéticas (MGPs). En otra modalidad de la invención el material que contiene sílice se suspende en soluciones amortiguadas acuosas que pueden contener de manera opcional un agente caotrópico en una concentración de entre 2 y 8 mol/l, y preferentemente entre 4 y 6 mol/l. Las sales caotrópicas son yoduro sódico, perclorato sódico, tiocianato de guanidinio, isotiocianato de guanidinio o clorhidrato de guanidinio. Un agente caotrópico de acuerdo con la presente invención es cualquier sustancia química que perturbe la estructura ordenada del agua líquida y tendrá el efecto de que el ADN o el ARN se una a las MGPs de acuerdo con la presente invención si este agente está presente en la solución que contiene el ADN o el ARN. Son posibles además otros compuestos que se conocen por los expertos en el campo.

En una modalidad preferida de la invención, las partículas de vidrio magnéticas se producen mediante el método sol-gel que se describe en los documentos WO 01/37291, WO 00/37291 y WO 96/41811, en particular en donde el método sol-gel comprende las etapas de:

- suspender los objetos magnéticos en un sol
- hidrólisis del sol para cubrir los objetos magnéticos con un gel
- secado por aspersion de los objetos magnéticos cubiertos con un gel en un equipo de secado por aspersion de dos boquillas, y
- sinterización del polvo secado por aspersion con el fin de formar un vidrio a partir del gel que cubre los objetos magnéticos.

Las MGPs que se prefieren de acuerdo con la invención son partículas de vidrio magnéticas que se producen de acuerdo con el ejemplo 8 del documento WO 00/32762 que contienen como pigmento magnético microns negro mate. Las MGPs que se prefieren más de acuerdo con la invención se fabrican de acuerdo con la solicitud internacional WO 01/37291 las que se proporcionan además en el estuche MagNa Pure LC DNA Isolation Kit I (Roche, Mannheim, Alemania). Se producen además mediante el método sol-gel según se describe en la solicitud internacional WO 01/37291 mediante la utilización de objetos o pigmentos magnéticos con un diámetro de aproximadamente 23 nm (fabricados por CERAC, consistentes en  $\gamma$ -Fe<sub>2</sub>O<sub>3</sub>; CERAC: P.O. Box 1178, Milwaukee, Wisconsin 53201-1178 Estados Unidos; Artículo-Núm. I-2012). Después de que los objetos magnéticos se cubren con el gel, se crea un polvo mediante la atomización de la suspensión a través de una boquilla de dos fluidos. Se producen sistemas de secado por aspersion adecuados por Nubilosa Molekularzerstäubung, Ladisch GmbH & Co. KG, Konstanz, Alemania, por ejemplo el "Labor-Zerstäubungstrockner (Typ LTK)" o por Büchi AG, Uster, Suiza, por ejemplo el Mini Spray Dryer (Tipo B-191). Debido a que las relaciones de los diámetros entre los núcleos magnéticos y la cubierta de vidrio son menores de 1 a 10, preferentemente entre 1:10 y 1:1000, la geometría y el número de núcleos magnéticos incorporados o de sus vehículos inertes no determina la forma y el tamaño de las partículas sino las condiciones de fabricación, en particular las condiciones durante el secado por aspersion. En otras palabras, la elección de la presión, temperatura de entrada, temperatura de salida y régimen de flujo durante el procedimiento de secado por aspersion son los grados de libertad que determinan la distribución de tamaños, forma de las gotas de vidrio y de esta manera modificarán las MGPs. Por lo tanto, las boquillas del sistema de secado por aspersion se calientan. La temperatura de entrada está entre 120 °C y 500 °C, preferentemente entre 170 °C y 230 °C o entre 150 °C y 230 °C, con mayor preferencia entre 150 °C y 200 °C o entre 190 °C y 210 °C, o a 200 °C o ligeramente menos. La temperatura de salida depende del punto de ebullición del sol y de esta manera del solvente y puede estar por encima, ser igual, o estar ligeramente por debajo, es decir menos de 10 °C, del punto de ebullición del solvente. Cuando se utiliza etanol como solvente, está entre 50 °C y 300 °C, preferentemente entre 70 °C y 150 °C, con mayor preferencia entre 80 °C y 110 °C. La temperatura óptima está entre 90 °C y 100 °C. La presión de la boquilla es de más de 3 bares, preferentemente se regula entre 4 y 6 bares. El técnico apreciará el hecho de que los parámetros exactos dependerán del sistema de secado por aspersion que se utilice. Sin embargo, él puede transferir las descripciones de la presente invención a cualquier otro sistema de secado por aspersion y encontrar los parámetros al tener en cuenta las descripciones de esta invención. Fórmulas como las que se describen en Masters: "Spray Drying Handbook" (1991), John Wiley & Sons, New York pueden conducirle al camino para encontrar qué parámetros tienen que elegirse para otros ajustes. Preferentemente, buscará en los manuales de su sistema de secado por aspersion o contactará con el servicio técnico del fabricante del sistema de secado por

aspersión. Para optimizar el rendimiento, la temperatura de densificación o sinterización debe ser tan elevada como sea posible, es decir ligeramente por debajo del intervalo de fusión. Las temperaturas exactas dependen de la composición del vidrio pero pueden estar entre 400°C y 1200°C. En el caso de la composición de vidrio EJ que se describe en el documento WO 01/37291 la temperatura de sinterización está entre 720°C y 770°C, preferentemente alrededor de 750°C. Está dentro de la habilidad del técnico el encontrar las temperaturas para cada composición de vidrio cuando se tienen en cuenta las enseñanzas de la presente invención. Posteriormente, el polvo se calienta durante 1 hora a 200 °C, se enfría de manera opcional hasta temperatura ambiente y se calienta a 750 °C (temperatura de densificación o sinterización) en una atmósfera de nitrógeno con una velocidad de calentamiento de 1 K/min y se mantiene a esa temperatura durante 1 hora. Después el horno se enfría a 150 °C y se calienta de nuevo a 200 °C durante una hora en aire. Después de enfriar hasta temperatura ambiente, el polvo se transfiere a un tamiz (50 µm) y se tamiza durante 30 min. La muestra tamizada se embotella y esteriliza a 200 °C durante 4 horas y después se enfría a 80 °C. Después los vasos de vidrio se retiran del horno, se cubren con papel de aluminio estéril y se cierran.

El procedimiento experimental para unir el ácido nucleico a superficies de vidrio o sílice no modificadas (o preferentemente a las partículas de vidrio magnéticas) puede describirse con detalle como sigue. Se realiza preferentemente en presencia de sales caotrópicas con una concentración de entre 1 y 8 mol/l, y preferentemente entre 2 y 6mol/l. Las sales caotrópicas pueden ser yoduro sódico, perclorato sódico, tiocianato de guanidinio, isotiocianato de guanidinio o clorhidrato de guanidinio. Un agente caotrópico de acuerdo con la presente invención es cualquier sustancia química que perturbe la estructura ordenada del agua líquida y tenga como efecto que el ADN (o ARN) se una a las partículas de vidrio magnéticas si este agente está presente en la solución que contiene el ADN (o el ARN). Pueden estar presentes además otras sustancias biológicas que se conocen por los expertos en el campo. Aun otras sustancias son posibles además. Para unir la mezcla de ácidos nucleicos y de manera opcional otros compuestos biológicos, las perlas de vidrio con una superficie de vidrio no modificada se añaden a la mezcla y se incuban durante un período de tiempo suficiente para que la unión ocurra. Los expertos se familiarizan de manera usual con la duración de la etapa de incubación. Esta etapa puede optimizarse mediante la determinación de la cantidad de ácidos nucleicos inmovilizados sobre la superficie a diferentes puntos de tiempo. Tiempos de incubación de entre 10 segundos y 30 minutos pueden ser apropiados para los ácidos nucleicos. Después se añaden los reactivos para llevar a cabo las diferentes etapas de la reacción con bisulfito (o pueden incluso estar presentes antes). Después de la incubación o del lavado, los ácidos nucleicos pueden separarse del líquido. Esto puede lograrse generalmente por gravedad o en el caso conveniente de ácidos nucleicos unidos a partículas de vidrio magnéticas mediante la separación del ácido nucleico unido a las partículas de vidrio magnéticas por la aplicación de un campo magnético. Por ejemplo, las partículas magnéticas pueden arrastrarse hacia la pared del vaso en el que se realizó la incubación. El líquido que contiene los componentes biológicos o los componentes de la reacción que no se unieron a las partículas magnéticas puede eliminarse después. El procedimiento de eliminación que se utilice depende del tipo de recipiente en el que se realice la incubación. Las etapas adecuadas incluyen la eliminación del líquido mediante pipeteo o aspiración. El material con el ácido nucleico unido puede después lavarse al menos una vez, preferentemente con una mezcla de 70 partes en volumen de etanol con 30 partes en volumen de agua ("Etanol al 70%") o en una solución de lavado ácida como se describe en el documento WO 99/40098. Se utiliza una solución de lavado que no cause que los ácidos nucleicos y el ácido nucleico objetivo se liberen de la superficie del material sino que eliminen los contaminantes no deseados tan a fondo como sea posible. Esta etapa de lavado tiene lugar preferentemente mediante incubación del vidrio o de la sílice con el ácido nucleico unido. El material se resuspende preferentemente durante esta etapa. La solución de lavado contaminada se elimina preferentemente igual que en la etapa de unión que se describe anteriormente. Después de la última etapa de lavado, el material puede secarse brevemente en vacío, o el fluido puede dejarse evaporar. Puede realizarse además una etapa de pretratamiento mediante la utilización de acetona.

En una modalidad de la invención el ácido nucleico se obtiene de una muestra biológica mediante la utilización de las fases sólidas de acuerdo con la invención y los métodos que se conocen por los expertos en el campo. La muestra biológica comprende células de organismos multicelulares como por ejemplo células humanas y de animales tales como Leucocitos, y compuestos químicos de alto y bajo peso molecular inmunológicamente activos tales como haptenos, antígenos, anticuerpos y ácidos nucleicos, plasma sanguíneo, fluido cerebral, esputos, heces, especímenes de biopsia, médula ósea, enjuagues orales, suero sanguíneo, tejidos, orina o mezclas de estos. En una modalidad preferida de la invención la muestra biológica es un fluido del cuerpo humano o animal. Preferentemente la muestra biológica es sangre, plasma sanguíneo, suero sanguíneo u orina. El plasma sanguíneo es preferentemente plasma de sangre tratado con EDTA, heparina o citrato. La muestra biológica que comprende los ácidos nucleicos se lisa para crear una mezcla de compuestos biológicos que comprende los ácidos nucleicos y otros componentes. Los procedimientos para lisar muestras biológicas se conocen por los expertos y pueden ser de naturaleza química, enzimática o física. Una combinación de estos procedimientos es además aplicable. Por ejemplo, la lisis puede realizarse mediante la utilización de ultrasonidos, presión alta, fuerzas de cizallamiento, álcali, detergentes o soluciones salinas caotrópicas, o proteasas o lipasas. Para el procedimiento de lisis para obtener ácidos nucleicos, se hace referencia especial a Sambrook y otros: Molecular Cloning, A Laboratory Manual, 2da edición, Cold Spring Harbour Laboratory Press, Cold Spring Harbour, NY y Ausubel y otros: Current Protocols in Molecular Biology 1987, J. Wiley and Sons, NY. Después los ácidos nucleicos se aíslan de la mezcla de lisis mediante la utilización de los métodos y fases sólidas de acuerdo con la invención y después pueden someterse a los métodos de acuerdo con la invención, es decir al tratamiento con bisulfito de acuerdo con la invención. Se utilizan además agentes caotrópicos para lisar las células para preparar una mezcla entre ácidos nucleicos y otras sustancias biológicas (ver por ejemplo Sambrook y otros (1989) o EP 0 389 063). Posteriormente se

añade el material que comprende vidrio o sílice y un efecto de purificación resulta del comportamiento del ADN o ARN de unirse al material con una superficie de vidrio bajo estas condiciones, es decir en presencia de ciertas concentraciones de un agente caotrópico, mayores concentraciones de solventes orgánicos o bajo condiciones ácidas. Por lo tanto, la presente invención considera además la combinación de las etapas de lisis y de la reacción con bisulfito, es decir el ácido nucleico que se aisló de la mezcla entre ácidos nucleicos y otras sustancias biológicas se somete directamente al tratamiento con bisulfito, de manera que el ácido nucleico se une a una fase sólida durante la etapa de desaminación y/o desulfonación. Se proporciona en más detalle, un método para la conversión de una base citosina, preferentemente de bases citosina, en un ácido nucleico a una base uracilo, preferentemente a bases uracilo, de manera que preferentemente las bases 5-metilcitosina no se convierten de manera significativa ("reacción con bisulfito" o "tratamiento con bisulfito"), de manera que el ácido nucleico se aísla de una mezcla que comprende un ácido nucleico y otros compuestos biológicos mediante la unión del mismo a una fase sólida, preferentemente a un material que comprende vidrio o sílice, y permanece unido a la fase sólida durante la etapa de desaminación y/o desulfonación de la reacción con bisulfito. En la presente descripción se describe un método en donde el ácido nucleico se aísla de una mezcla de un ácido nucleico y otros compuestos biológicos y se une a una fase sólida durante la etapa de desaminación y desulfonación de la reacción con bisulfito, es decir se describe un método para la conversión de una base citosina en un ácido nucleico a una base uracilo de manera que las bases 5-metilcitosina no se convierten de manera significativa ("reacción con bisulfito" o "tratamiento con bisulfito"), que comprende las etapas de

- a) proveer una mezcla de un ácido nucleico y otros compuestos biológicos
- b) unir el ácido nucleico a una fase sólida, con la eliminación opcional de los demás compuestos biológicos y lavado de manera opcional del ácido nucleico unido a la fase sólida,
- c) incubar el ácido nucleico unido a la fase sólida en presencia de iones sulfito de manera que el ácido nucleico se desamina,
- d) lavar opcionalmente el ácido nucleico unido a la fase sólida desaminado,
- e) incubar el ácido nucleico unido a la fase sólida desaminado bajo condiciones alcalinas de manera que el ácido nucleico se desulfona,
- f) lavar opcionalmente el ácido nucleico unido a la fase sólida desaminado y desulfonado, y
- g) eluir opcionalmente del ácido nucleico desaminado y desulfonado de la fase sólida.

La presente invención proporciona un método en donde el ácido nucleico se aísla de una mezcla de un ácido nucleico y otros compuestos biológicos y está unido a una fase sólida durante la etapa de desulfonación de la reacción con bisulfito, es decir se proporciona un método para la conversión de una base citosina, preferentemente de bases citosina, en un ácido nucleico a una base uracilo, preferentemente a bases uracilo, de manera que preferentemente las bases 5-metilcitosina no se convierten de manera significativa ("reacción con bisulfito" o "tratamiento con bisulfito"), que comprende las etapas de

- a) proveer una mezcla de un ácido nucleico y otros compuestos biológicos
- b) unir el ácido nucleico a una fase sólida, con eliminación opcional de los demás compuestos biológicos, lavar opcionalmente el ácido nucleico unido a la fase sólida y elución del ácido nucleico de la fase sólida,
- c) incubar el ácido nucleico que se eluyó en presencia de iones sulfito de manera que el ácido nucleico se desamina,
- d) unir el ácido nucleico desaminado a una fase sólida,
- e) lavar opcionalmente el ácido nucleico unido a la fase sólida desaminado,
- f) incubar el ácido nucleico unido a la fase sólida desaminado bajo condiciones alcalinas de manera que el ácido nucleico se desulfona,
- g) lavar opcionalmente el ácido nucleico unido a la fase sólida desaminado y desulfonado, y
- h) eluir opcionalmente el ácido nucleico desaminado y desulfonado de la fase sólida.

Se describe adicionalmente en la presente descripción un método en donde el ácido nucleico se aísla de una mezcla de un ácido nucleico y otros compuestos biológicos y se une a una fase sólida durante la etapa de desaminación de la reacción con bisulfito, es decir se describe un método para la conversión de una base citosina en un ácido nucleico a una base uracilo, de manera que preferentemente las bases 5-metilcitosina no se convierten de manera significativa, que comprende las etapas de

- a) proveer una mezcla de un ácido nucleico y otros compuestos biológicos
- b) unir el ácido nucleico a una fase sólida, con eliminación opcional de los demás compuestos biológicos y lavar opcionalmente el ácido nucleico unido a la fase sólida,
- c) incubar el ácido nucleico unido a la fase sólida en presencia de iones sulfito de manera que el ácido nucleico se desamina,
- d) lavar opcionalmente el ácido nucleico unido a la fase sólida,
- e) eluir el ácido nucleico desaminado de la fase sólida,
- f) incubar el ácido nucleico desaminado bajo condiciones alcalinas, de manera que el ácido nucleico desaminado se desulfona.

El método preferido de acuerdo con la invención comprende además la etapa de elución a partir del ácido nucleico unido de dicha fase sólida. Después dicho ácido nucleico puede, por ejemplo, amplificarse. Para que tenga lugar la



5 elución, el material que comprende vidrio o sílice (con la superficie de sílice no modificada) se resuspende en una  
 10 solución con ninguna o con una pequeña cantidad de un agente caotrópico y/o un solvente orgánico. De manera  
 15 alternativa, la suspensión puede diluirse con una solución con ninguna o con una pequeña cantidad de un agente  
 caotrópico y/o un solvente orgánico. Amortiguadores de esta naturaleza se conocen de DE 3724442 y Jakobi y otros,  
 supra. Los amortiguadores de elución con un bajo contenido en sales son en particular amortiguadores con un  
 contenido de menos de 0.2 mol/l. En una modalidad que se prefiere especialmente, el amortiguador de elución contiene  
 la sustancia Tris para la amortiguación, en particular una solución amortiguadora con Tris con un pH alrededor de 7 o  
 por encima de 7. En otra modalidad especial, el amortiguador de elución es agua desmineralizada. La solución que  
 contiene el ácido nucleico está ahora lista para utilizarse en la reacción de amplificación después de que se elimina la  
 fase sólida. Por lo tanto, el ácido nucleico se transfiere a un nuevo tubo de reacción que contiene todos los reactivos  
 necesarios para la amplificación. Opcionalmente, una solución que contiene todos los reactivos necesarios para la  
 amplificación se añade a la suspensión de la fase sólida y los ácidos nucleicos liberados. En otra modalidad, una  
 solución que contiene todos los reactivos necesarios para la amplificación se añade a la suspensión de la fase sólida y  
 el ácido nucleico unido sin la etapa de elución, de manera que se realiza una amplificación del ácido nucleico en la fase  
 sólida.

20 De acuerdo con la presente invención, para las etapas de lavado y unión, se utilizan preferentemente líquidos que sean  
 adecuados para procesos en biología molecular, en particular para procesos de purificación de ácido  
 desoxirribonucleico (ADN) o de ácido ribonucleico (ARN) que utilizan la unión de estas sustancias a una fase sólida, en  
 particular a superficies de sílice o de vidrio, más particularmente a partículas de vidrio magnéticas, bajo ciertas  
 condiciones. Los líquidos que se prefieren comprenden alcoholes y/o cetonas o cualquier mezcla de estos con agua. Los  
 25 alcoholes incluirán de acuerdo con la invención preferentemente alcoholes primarios, secundarios o terciarios de  
 fórmula general R-OH donde R representa la fórmula general  $-(\text{CH}_2)_n-\text{CH}_3$  con  $n \geq 0$ . Sin embargo, otros alcoholes  
 pueden utilizarse además sin ser adecuados para propósitos de biología molecular como por ejemplo glicerol. Son  
 particularmente adecuados los alcoholes isopropanol, etanol o mezclas de estos con agua, preferentemente una mezcla de  
 80 partes en volumen de isopropanol con 20 partes en volumen de agua. En otra modalidad de la invención el líquido  
 comprende cetonas como por ejemplo acetona. Además, se utilizan soluciones acuosas amortiguadas adecuadas.  
 Sistemas amortiguadores que son adecuados para propósitos de biología molecular pueden encontrarse por ejemplo en  
 Sambrook, J., y otros, en "Molecular Cloning: A Laboratory Manual" (1989), Eds. J. Sambrook, E. F. Fritsch y T.  
 30 Maniatis, Cold Spring Harbour Laboratory Press, Cold Spring Harbour, NY. Son sustancias amortiguadoras que se  
 prefieren Tris-hidroximetilamina (TRIS), fosfato, N-(2-hidroxi-etil) piperazina-N'-(2-ácido etanosulfónico) (HEPES), sales  
 de estas u otras sustancias adecuadas. Además, pueden estar presentes sustancias que modifiquen la fuerza iónica de  
 la solución como por ejemplo NaCl, KCl o  $\text{CaCl}_2$  o que sean agentes complejantes de cationes metálicos como por  
 ejemplo el ácido etilén-diamino-tetraacético (EDTA) o las sales del mismo.

35 En una modalidad preferida de la invención, el ácido nucleico se amplifica con la Reacción en cadena de la polimerasa.  
 (PCR; EP 0 201 184, EP-A-0 200 362, US 4,683,202). El método de amplificación puede ser además la Reacción en  
 Cadena de la ligasa (LCR, Wu, D. Y. y Wallace, R. B., Genomics 4 (1989) 560-9 y Barany, F., Proc Natl Acad Sci U S A  
 88 (1991) 189-93; reacción en cadena de la Polimerasa Ligasa (Barany, F., PCR Methods Appl 1 (1991) 5-16); Gap-  
 40 LCR (publicación de patente PCT núm. WO 90/01069); Reacción en cadena de reparación (publicación de patente  
 europea núm. EP 439,182 A2), 3SR (Kwoh, D. Y., y otros, Proc Natl Acad Sci U S A 86 (1989) 1173-7; Guatelli, J. C., y  
 otros, Proc Natl Acad Sci U S A 87 (1990) 1874-8; publicación de patente PCT núm. WO 92/0880A), y NASBA (patente  
 de los EE.UU. núm. US 5,130,238). Además, existen la amplificación por desplazamiento de cadena (SDA), la  
 amplificación mediada por transcripción (TMA) y la amplificación Q $\beta$  (para una revisión ver por ejemplo Whelen, A. C. y  
 45 Persing, D. H., Annu Rev Microbiol 50 (1996) 349-73; Abramson, R. D. y Myers, T. W., Curr Opin Biotechnol 4 (1993)  
 41-7). Los métodos de amplificación que se prefieren particularmente de acuerdo con la invención son el método de  
 PCR específica de metilación (MSP) que se describe en la patente US 5,786,146 que combina el tratamiento con  
 bisulfito y una PCR específica de alelo (ver por ejemplo las patentes US 5,137,806, US 5,595,890, US 5,639,611).

50 En una modalidad preferida, el método puede comprender además la etapa de detección del ácido nucleico amplificado.  
 El ácido nucleico amplificado puede determinarse o detectarse mediante métodos analíticos estándar que se conocen  
 por las personas expertas en la materia y que se describen por ejemplo en Sambrook, y otros, Molecular Cloning, Cold  
 Spring Harbor University Press (1989), Lottspeich y Zorbas, en "Bioanalytik" (1998), Eds. L. a. Zorbas, Spektrum  
 Akademischer Verlag, Heidelberg, Berlin, Alemania, o en Ausubel, F., y otros, en "Current protocols in molecular  
 55 biology" (1994), Eds. F. Ausubel, R. Brent y K. RE., Wiley & Sons Verlag, New York. Puede haber también etapas de  
 purificación adicionales antes de que el ácido nucleico objetivo se detecte por ejemplo una etapa de precipitación. Los  
 métodos de detección pueden incluir pero sin limitarse a la unión o el intercalado de colorantes específicos tales como el  
 bromuro de etidio que se intercala en el ADN bicatenario y después de eso cambia su fluorescencia. Los ácidos  
 nucleicos purificados pueden además separarse por métodos electroforéticos opcionalmente después de una digestión  
 60 de restricción y visualizarse después de eso. Existen además ensayos que se basan en sondas que aprovechan la  
 hibridación de oligonucleótidos a secuencias específicas y la detección subsecuente del híbrido. Es posible además  
 secuenciar el ácido nucleico objetivo después de etapas adicionales que se conocen por los expertos en el campo.  
 Otros métodos aplican una diversidad de secuencias de ácido nucleico a un chip de silicio al cual se unen sondas  
 específicas y producen una señal cuando se unen secuencias complementarias.

En una modalidad particularmente preferida de la invención, el ácido nucleico se detecta mediante la medición de la intensidad de la luz de fluorescencia durante la amplificación. Este método supone la monitorización de la fluorescencia en tiempo real. Un método particularmente preferido que aprovecha la amplificación y la detección simultáneas mediante la medición de la intensidad de la luz fluorescente es el método TaqMan<sup>®</sup> que se describe en el documento WO 92/02638 y las correspondientes patentes de Estados Unidos US 5,210,015, US 5,804,375, US 5,487,972. Este método aprovecha la actividad exonucleasa de una polimerasa para generar una señal. En detalle, el ácido nucleico se detecta por un proceso que comprende la puesta en contacto de la muestra con un oligonucleótido que contiene una secuencia complementaria a una región del ácido nucleico objetivo y un oligonucleótido marcado que contiene una secuencia complementaria a una segunda región de la misma hebra del ácido nucleico objetivo, pero que no incluye la secuencia de ácido nucleico que se define por el primer oligonucleótido, para crear una mezcla de dúplices durante las condiciones de hibridación, en donde los dúplices comprenden al ácido nucleico objetivo que se hibridó al primer oligonucleótido y al oligonucleótido marcado de tal manera que el extremo 3' del primer oligonucleótido es adyacente al extremo 5' del oligonucleótido marcado. Después esta mezcla se trata con una polimerasa de ácido nucleico dependiente de molde que tiene una actividad nucleasa de 5' a 3' bajo condiciones suficientes para permitir que la actividad nucleasa de 5' a 3' de la polimerasa corte el oligonucleótido hibridado, marcado y libere fragmentos marcados. La señal que se genera por la hidrólisis del oligonucleótido marcado se detecta y/o mide. La tecnología TaqMan<sup>®</sup> elimina la necesidad de que se forme un complejo de reacción unido a una fase sólida y se haga detectable. En términos más generales, la reacción de amplificación y/o detección del método de acuerdo con la invención es un ensayo en fase de solución homogénea. Los formatos que se utilizan en el instrumento LightCycler<sup>®</sup> son métodos adicionales preferidos (ver por ejemplo US 6,174,670). Se prefiere particularmente la utilización del tratamiento con bisulfito, la amplificación con o sin iniciadores específicos de metilación en presencia de una sonda específica de metilación y la detección de fluorescencia en tiempo real como se describe en US 6,331,393.

En una modalidad preferida de la presente invención, el método se automatiza, es decir el método lleva a cabo un proceso susceptible de ser automatizado como el que se describe por ejemplo en el documento WO 99/16781. Un proceso susceptible de ser automatizado significa que las etapas del proceso son adecuadas para ser llevadas a cabo con un aparato o máquina capaz de funcionar con poco o ningún control o influencia externos por un ser humano. Un método automatizado significa que las etapas del método susceptible de ser automatizado son llevadas a cabo con un aparato o una máquina capaz de funcionar con poco o ningún control o influencia externos por un ser humano. Solamente las etapas de preparación para el método pueden tener que realizarse de manera manual, por ejemplo los recipientes de almacenamiento tienen que llenarse y ponerse en su lugar, la elección de las muestras tiene que realizarse por un ser humano y las etapas adicionales que se conocen por los expertos en el campo, por ejemplo el manejo del ordenador de control. El aparato o máquina puede por ejemplo añadir líquidos de manera automática, mezclar las muestras o llevar a cabo las etapas de incubación a temperaturas específicas. Típicamente, tal máquina o aparato es un robot que se controla por un ordenador que lleva a cabo un programa en el que se especifican los comandos y etapas individuales. En una modalidad preferida de la invención, el método está en un formato de gran productividad, es decir los métodos automatizados se llevan a cabo en un formato de alta productividad, lo cual significa que los métodos y la máquina o el aparato que se utilizan se optimizan para un número elevado de muestras en un tiempo corto.

Preferentemente el método de acuerdo con la invención se utiliza en diagnóstico, para análisis de diagnóstico o para bioanalítica, o para el tamizaje de tejidos o fluidos del cuerpo humano o aun del cuerpo de animales para detectar la presencia de cierto patrón de metilación. Más aun, el método de acuerdo con la invención se utiliza para mejorar la velocidad, la precisión o la sensibilidad de la detección de sitios de metilación en ácidos nucleicos.

En una modalidad preferida, la presente invención se refiere a la utilización de una etapa de desulfonación en fase sólida de una reacción en donde una base citosina, preferentemente bases citosina, en un ácido nucleico se convierte a una base uracilo, preferentemente a bases uracilo, en presencia de iones bisulfito de manera que preferentemente las bases 5-metilcitosina no se convierten de manera significativa ("reacción con bisulfito"). En una modalidad preferida, la presente invención se refiere a la utilización de una fase sólida en la etapa de desulfonación de una reacción en donde una base citosina, preferentemente bases citosina, en un ácido nucleico se convierte a una base uracilo, preferentemente a bases uracilo, en presencia de iones bisulfito de manera que preferentemente las bases 5-metilcitosina no se convierten de manera significativa. Más particularmente, esto significa que la fase sólida se utiliza para unir el ácido nucleico durante la etapa de desulfonación de la reacción con bisulfito, es decir el ácido nucleico se une a la fase sólida durante la etapa de desulfonación de la reacción con bisulfito. Preferentemente, la fase sólida es un material que comprende sílice o vidrio. Con mayor preferencia, la fase sólida es lana de vidrio o una membrana de vidrio. En la modalidad que más se prefiere, la fase sólida es una partícula de vidrio magnética.

En otra modalidad preferida, la presente invención se refiere a un estuche para llevar a cabo una reacción con bisulfito que comprende una solución que contiene iones bisulfito y una fase sólida. En una modalidad preferida la fase sólida es un material que comprende sílice o vidrio. En una modalidad que se prefiere más, la fase sólida es lana de vidrio o una membrana de vidrio. En la modalidad que se prefiere más, la fase sólida es una partícula de vidrio magnética. En otra modalidad de la invención, se proporciona un estuche de partes que comprende un recipiente de almacenamiento que contiene las partículas de vidrio magnéticas o una suspensión de las mismas de acuerdo con la presente invención.

Tales estuches que se conocen en la materia comprenden además utensilios plásticos que pueden utilizarse durante el procedimiento con bisulfito como por ejemplo placas de microtitulación en el formato de 96 ó 384 pocillos o tubos de reacción fabricados por ejemplo, por Eppendorf, Hamburg, Alemania. El estuche puede comprender además una solución de lavado que sea adecuada para la etapa de lavado de la fase sólida, en particular, de la membrana o la lana de vidrio o de las partículas de vidrio magnéticas. Frecuentemente la solución de lavado se proporciona como una solución madre que tiene que diluirse antes de su utilización. El estuche puede contener además un eluyente, es decir una solución o un amortiguador (por ejemplo TE, Tris 10 mM, EDTA 1 mM, pH 8.0) o agua pura para eluir el ADN o el ARN unido a la fase sólida. Además, pueden estar presentes reactivos adicionales que contengan amortiguadores adecuados para utilizarse en la presente invención. Preferentemente, el estuche de acuerdo con la invención se utiliza para una reacción en donde una base citosina, preferentemente bases citosina, en un ácido nucleico se convierte a una base uracilo, preferentemente a bases uracilo, en presencia de iones bisulfito de manera que preferentemente las bases 5-metilcitosina no se convierten de manera significativa.

Los siguientes ejemplos, referencias y figuras se proporcionan para ayudar a la comprensión de la presente invención, el verdadero alcance de la cual se expone en las reivindicaciones adjuntas.

### 1.1 Ejemplos

#### 1. Ejemplo 1: Establecimiento de una LC-PCR específica para ADN tratado con Bisulfito

##### 1.1 General

El hecho de que la reacción con bisulfito funcione y convierta las citosinas no metiladas en uracilo puede demostrarse por una reacción en cadena de la polimerasa de manera que se utilizan iniciadores que son específicos para una región de la secuencia del ácido nucleico en donde las citosinas no metiladas se convierten en uracilos, es decir la base adenina en el iniciador está opuesta al uracilo que es el producto de la reacción con bisulfito a partir de las citosinas no metiladas. En el caso de una conversión incompleta, el iniciador no podría hibridarse con esta región ya que habría citosinas que no se aparearían con las bases adenina del iniciador. Esto tendría el efecto de que no se obtendría ningún producto de la PCR.

Un método mejorado para realizar reacciones en cadena de la polimerasa rápidas se describe por ejemplo en US 6,174,670 y se utiliza en el instrumento LightCycler® (Roche, Mannheim, Alemania). En este método, dos sondas marcadas pueden aproximarse estrechamente de manera dependiente del amplificado de tal manera que las dos marcas puedan llevar a cabo una transferencia de energía de fluorescencia (FRET). La cantidad de amplificado correlaciona de esta manera con la intensidad de la luz emitida de una cierta longitud de onda. Este método de PCR específica puede utilizarse por lo tanto para analizar si se obtuvo una conversión completa de las citosinas no metiladas, mediante el análisis por ejemplo de la región promotora del gen  $\pi$  de la glutation-S-transferasa (ver por ejemplo la sec. con núm. de ident.: 1 para la secuencia de longitud completa de este gen y del promotor, US 5,552,277, código de acceso al Genbank M24485 y Morrow y otros (1989) Gene 75, 3-11) mediante la utilización de sondas y de iniciadores adecuados. Sin embargo, los expertos con experiencia en la materia saben que pueden utilizarse también otros métodos para esta evaluación. Las medidas de fluorescencia se normalizan mediante la división por la medida de fluorescencia inicial, es decir, la fluorescencia de fondo, que se obtiene durante un ciclo temprano en la reacción mientras las medidas de fluorescencia entre los ciclos parecen ser relativamente constantes. El número de ciclos que se elige para la medida de la fluorescencia inicial es el mismo para todas las reacciones que se comparan, de tal manera que todas las medidas representan incrementos relativos al mismo ciclo de reacción. En los ciclos tempranos de una amplificación por la reacción en cadena de la polimerasa, el número de moléculas objetivo puede describirse por la ecuación geométrica  $N_i = N_0 \times (1 + E)^i$ , donde  $N_0$  = el número de moléculas objetivo al inicio de la reacción,  $N_i$  = el número de moléculas objetivo al finalizar el ciclo  $i^o$ ,  $E$  = la eficiencia de la amplificación ( $0 \leq E \leq 1$ ). Durante esta fase de crecimiento geométrico de la amplificación, el número de ciclos que se requieren para alcanzar un valor umbral particular (valor de  $C_T$  o punto de cruce) es inversamente proporcional al logaritmo de  $(1 + E)$ . Así, el valor de  $C_T$  representa una medida de la eficiencia de la reacción que permite comparaciones entre reacciones. Una disminución del valor de  $C_T$ , que significa que la reacción alcanzó el valor umbral en menos ciclos, indica un incremento de la eficiencia de la reacción. Como el aumento del producto de la amplificación se monitorea mediante la medición del incremento de fluorescencia de la reacción, se define el  $C_T$  en la presente descripción como el número de ciclos de amplificación que se llevan a cabo hasta que la fluorescencia exceda un nivel de fluorescencia arbitrario (AFL). El AFL se eligió próximo al nivel de fluorescencia basal, pero por encima del intervalo de las fluctuaciones aleatorias de la fluorescencia que se midió, de tal manera que la cinética de la reacción se midió durante la fase de crecimiento geométrico de la amplificación. La acumulación del producto amplificado en los ciclos más tardíos inhibe la reacción y eventualmente conduce a una meseta de la reacción. Se eligió un AFL de 1.5 para todas las reacciones. Como una amplificación por PCR consta de ciclos discretos y las medidas de fluorescencia se llevan a cabo una vez por ciclo, la fluorescencia medida aumenta típicamente desde más abajo del AFL hasta por encima del AFL en un solo ciclo. Para mejorar la precisión de las medidas, se calculó un número "exacto" de ciclos para alcanzar el umbral de AFL, que se refiere en la presente descripción como valor de  $C_T$  o punto de cruce, mediante la interpolación de las medidas de la fluorescencia entre ciclos.

1.2 Metodología General

El experimento siguiente demuestra que la PCR que se describe en el instrumento LightCycler® puede utilizarse como herramienta de evaluación del ADN que se trató con bisulfito. Muestra que la combinación iniciador/sonda diseñada da resultados positivos solamente con ADN después del tratamiento con bisulfito. El ADN tratado con bisulfito (en este caso el ADN se trató con bisulfito de acuerdo con el protocolo que se describe en el Ejemplo 2) y el ADN no tratado se amplificaron en paralelo con la utilización de las mismas concentraciones de molde (20ng y 1ng por PCR).

1.3 Análisis por PCR en el Instrumento LightCycler®

1.3.1 Composición de mezcla madre:

Sonda de hibridación LC FastStart DNA Master Hybridation Probe 1x, MgCl<sub>2</sub> 2 mM, iniciador directo 0.5µM, iniciador inverso 0.5µM, sonda donadora 250nM, sonda aceptora 250nM, molde 10µl, volumen total de la PCR 20µl.

1.3.2 Condiciones de la PCR:

Desnaturalización 10min/95°C  
 55 ciclos 95°C/10s  
 65°C/10s - captación de señal  
 72°C/110s Incremento gradual de la temperatura 20°C/s

1.4 Resultado

MDNA/PCR	Tratamiento con bisulfito	Valor de C <sub>T</sub> o Punto de cruce
20 ng	Sí	30.55
		29.72
		29.95
		30.06
1 ng	Sí	34.7
		35.8
		34.07
		33.86
20 ng	No	Sin curva de crecimiento
		Sin curva de crecimiento
		Sin curva de crecimiento
		Sin curva de crecimiento
1 ng	No	Sin curva de crecimiento
		Sin curva de crecimiento
		Sin curva de crecimiento

El resultado muestra puntos de cruce solamente para el ADN que se trató con bisulfito. Por lo tanto, esta PCR es adecuada para evaluar los métodos con bisulfito. Para aquellos con experiencia en la materia está claro que podría utilizarse cualquier PCR como herramienta de evaluación si se garantiza que la combinación iniciador/sonda no reacciona con el ADN antes del tratamiento con bisulfito.

2. Ejemplo 2: Reacción del bisulfito mediante la utilización de partículas de vidrio magnéticas (MGPs)

2.1.1 Desnaturalización del ADN:

## ES 2 545 577 T3

100 µl de la dilución del ADN metilado (Intergen, que se distribuye por Serologicals Corporation, Norcross, GA, Estados Unidos; Cat S7821) (30 ng y 6 ng/ensayo que se añaden a 1000 ng de hADN de fondo catálogo de Roche 1691112; 10 réplicas por concentración), y 12 µl de NaOH 2 M se mezclan y se incuban durante 15 minutos a 37 ° C.

### 5 2.1.2 Desaminación del ADN

Se mezclan 112 µl del ADN desnaturalizado con 200 µl de reactivo de bisulfito (bisulfito de sodio 2.5M, hidroquinona 125 mM, pH 5.0) y se incuban durante 16 horas a 50 ° C.

### 10 2.2 Procesamiento mediante el uso de MGPs

Se mezclan 312 µl del ADN desaminado con 600 µl de amortiguador de unión (estuche de aislamiento de ADN MagNAPureDNA Isolation Kit I, Catálogo de Roche Nr. 3 003 990) y 75µl de una solución de partículas de vidrio magnéticas (MagNAPure DNA Isolation Kit I) y se incuban durante 15 minutos a temperatura ambiente con mezclado continuo. Después de eso, las partículas de vidrio magnéticas se lavan tres veces con 1 ml de Etanol al 70%. La separación del ADN unido libre se realiza en un separador magnético (Catálogo de Roche 1641794). Después de eso, tiene lugar la desulfonación por la adición de 250 µl de EtOH al 90% / NaOH 20 mM al ADN unido a las MGPs; la mezcla se incubó durante 10 minutos a temperatura ambiente con mezclado. Después de eso las MGPs se lavan dos veces con etanol al 90%. Para eliminar los restos de etanol las MGPs se calentaron durante 15 min./60°C en un termomezclador con la tapa abierta. Después de eso el ADN se eluye con 50µl de Tris 10mM/EDTA 0.1mM pH7.5 (15 min./60°C). Se utilizan 10µl del ADN eluido para el análisis subsecuente mediante PCR.

### 2.3 Tratamiento con bisulfito mediante la utilización del Estuche de Intergen

Se trataron 30 ng y 6 ng de ADN metilado (Intergen, que se distribuye por Serologicals Corporation, Norcross, GA, Estados Unidos; Cat S7821) (10 réplicas por concentración) de acuerdo con el método que se describe en el prospecto del paquete del estuche de Intergen CpGenome DNA Modification Kit (Intergen, que se distribuye por Serologicals Corporation, Norcross, GA, Estados Unidos; Cat. S7820). Se utilizan 10µl del ADN eluido para el análisis subsecuente mediante PCR.

### 2.4 Detección del ADN tratado con bisulfito mediante la utilización de una PCR específica en el instrumento LightCycler® (formato hyprobe)

#### 2.4.1 Composición de mezcla madre

Sonda de hibridación LightCycler® FastStart DNA Master Hybridation Probe 1x (Roche 2239272), MgCl<sub>2</sub> 2mM, iniciador directo 0.5 µM, iniciador inverso 0.5 µM, sonda donadora 250 nM, sonda aceptora 250 nM, molde 10 µl, volumen total de la PCR 20 µl.

#### 2.4.2 Condiciones de la PCR

Desnaturalización 10min/95°C

55 ciclos	95°C/10s
	65°C/10s - captación de señal
	72°C/10s   Incremento gradual de la temperatura 20°C/s

Las muestras del tratamiento con bisulfito de MGP y del tratamiento con bisulfito de Intergen se procesaron en paralelo en el mismo proceso en el instrumento LightCycler®.

2.4.3 Resultados:

réplicas	ADN metilado por		Método del Bisulfito que se utilizó	
	Bisulfito	PCR	Intergen	Método MGP
Valores de C <sub>T</sub> o Puntos de cruce				
1	<b>30 ng</b>	<b>6 ng</b>	29.90	30.46
2			30.07	29.86
3			30.07	30.44
4			30.14	30.35
5			30.22	30.24
6			30.26	30.46
7			30.31	30.50
8			30.19	30.54
9			30.03	30.17
10			29.85	30.69
1	<b>6ng</b>	<b>1.2 ng</b>	32.49	32.14
2			32.67	32.60
3			32.29	32.83
4			32.87	32.53
5			32.15	32.90
6			32.23	32.77
7			32.59	32.73
8			32.91	33.09
9			32.46	32.88
10			33.17	32.83

Los valores de C<sub>T</sub> o puntos de cruce que se calculan durante la PCR en tiempo real son casi idénticos para los dos métodos con bisulfito que se utilizaron, es decir que el desempeño de los métodos es el mismo.

3 Ejemplo 3: Reacción con bisulfito automatizada mediante la utilización de MGPs

3.1 Realización de la reacción con bisulfito:

3.1.1 Desnaturalización del ADN:

Se mezclan y se incuban durante 10 minutos a 37 °C 20 µl de la dilución de ADN metilado (Intergen, que se distribuye por Serologicals Corporation, Norcross, GA, Estados Unidos; Cat S7821) (50 ng/ensayo), 4 µl de una solución de Poli(dA)(concentración 250 ng/ µl) y 2.6 µl de NaOH 2 M.

3.1.2 Desaminación de ADN

Se mezclan 26 µl de ADN desnaturalizado con 220 µl de reactivo de bisulfito (bisulfito de sodio 2.5M, hidroquinona 125mM, pH 5.0) y se incuban durante 4 horas a 50 °C.

3.1.3 Procesamiento automatizado mediante la utilización del instrumento LC MagNAPure

Se mezclan 250 µl de ADN desaminado con 600 µl de amortiguador de unión (estuche de aislamiento de ADN MagNAPureDNA Isolation Kit I, Roche, Mannheim, Alemania) y 75 µl de la solución de partículas de vidrio magnéticas (estuche de aislamiento de ADN MagNAPure DNA Isolation Kit I, Roche, Mannheim, Alemania) y se incuban durante 15min/ temperatura ambiente con mezclado continuo. Después de eso, las partículas de vidrio magnéticas se lavan tres

veces con 1ml de Etanol al 70%. Después de eso, tiene lugar la desulfonación por la adición de 250 µl de EtOH al 90% / NaOH 20mM al ADN unido a las MGPs; la mezcla se incuba durante 10 min a temperatura ambiente con mezclado. Después de eso, las MGPs se lavan dos veces con Etanol al 90% y se eluyen con 50µl de Tris 10mM/EDTA 0.1mM pH 7.5 (7 min./80°C).

5

3.1.4 Detección del ADN tratado con bisulfito mediante la utilización de una PCR específica en el instrumento LightCycler® (formato hyprobe)

3.1.4.1 Composición de mezcla madre:

10

Sonda de hibridación LightCycler® FastStart DNA Master Hybridation Probe 1x, MgCl<sub>2</sub> 2mM, iniciador directo 0.5µM, iniciador inverso 0.5µM, sonda donadora 250nM, sonda aceptora 250nM, molde 5µl, volumen total de la PCR 20µl.

3.1.4.2 PCR-condiciones:

15

Desnaturalización 10min/95°C

55 ciclos	95°C/10s
	65°C/10s - captación de señal
	72°C/10s      Incremento gradual de la temperatura 20°C/s

20

3.1.4.3 Resultados

25

Plantilla	ng ADN	ng ADN	
	Por ensayo del bisulfito	por PCR	Punto de cruce
Univers. ADN metilado	100	10	33.97
			36.66
Univers. ADN metilado	50	5	35.66
			35.82
			37.67
			38.37
Univers. ADN metilado	10	1	37.82
			39.89
			38.76
			39.85

40

45

Los resultados muestran los puntos de cruce para cada concentración que se utilizó. Esto significa que el tratamiento con bisulfito automatizado tuvo éxito.

50

4. Ejemplo 4: Realización de las reacciones con bisulfito mediante la utilización de lana de vidrio

4.1 Desnaturalización del ADN

55

Se mezclan 100 µl de la dilución de ADN metilado (Intergen, que se distribuye por Serologicals Corporation, Norcross, GA, Estados Unidos; Cat S7821) (30 ng y 6 ng/ensayo, 10 réplicas por concentración) con 12 µl de NaOH 2M y se incuban durante 15 min a 37°C.

4.2 Desaminación de ADN:

60

Se incuban 112 µl del ADN desnaturalizado con 200 µl de reactivo de bisulfito (bisulfito sódico 2.5 M, hidroquinona 125 mM, pH 5.0) durante 16 h/ 50 °C con mezclado continuo.

4.3 Procesamiento del ADN desaminado con el estuche High Pure PCR Template Preparation Kit (Catálogo de Roche 1 796 828)

65

- Se mezclan 312µl de ADN desaminado con 200µl del amortiguador de unión del estuche y 100µl de isopropanol y se pipetea sobre la columna que contiene la lana de vidrio. La columna después se centrifuga en una centrifuga de sobremesa Eppendorf (1 min/8000rpm).
- Después de eso las columnas se lavan tres veces cada una con 500µl de Etanol al 80% (centrifugación 10 s/12000 rpm).
- Para la desulfonación se añaden a las columnas 250µl del reactivo (Etanol al 38% / NaCl 100 mM / NaOH 200mM). Después de una incubación de 5 minutos/temperatura ambiente, se centrifuga 1 min/800 rpm.
- Después de eso, las columnas se lavan dos veces cada una con 500µl de etanol al 80% (centrifugación 10s/12000rpm).
- Finalmente el ADN unido se eluye por adición de 50µl de amortiguador de elución (Tris 10 mM / EDTA 0.1mM, pH 7.5) precalentado (70°C) y centrifugación durante 1min/800rpm.

4.4 Detección del ADN tratado con bisulfito mediante la utilización de una PCR específica en el Instrumento LightCycler® (formato hyprobe)

4.4.1 Composición de mezcla madre:

Sonda de hibridación LightCycler® FastStart DNA Master Hybridation Probe 1x (Roche 2239272), MgCl<sub>2</sub> 2mM, iniciador directo 0.5µM, iniciador inverso 0.5µM, sonda donadora 250nM, sonda aceptora 250nM, molde 10µl, volumen total de la PCR 20µl.

4.4.2 Condiciones de la PCR:

Desnaturalización 10min/95°C

55 ciclos	95°C/10s
	65°C/10s - captación de señal
	72°C/10s      Incremento gradual de la temperatura 20°C/s

4.4.3 Resultados:

ADN metilado por	Valores de C <sub>T</sub> o puntos de cruce	ADN metilado por	Valores de C <sub>T</sub> o puntos de cruce
Ensayo de bisulfito	de PCR	Ensayo de bisulfito	de PCR
30 ng	6 ng	6 ng	1.2 ng
	32.27		34.28
	32.01		35.70
	31.89		35.52
	33.23		36.23
	32.18		35.05
	32.63		35.60
	32.65		34.75
	32.26		34.86
	32.00		34.80
	31.84		34.93

El resultado muestra los puntos de cruce para cada concentración que se utilizó. Esto significa que el tratamiento con bisulfito con la utilización de lana de vidrio tuvo éxito.

Ejemplo de referencia 5: Realización de la reacción con bisulfito en una fase sólida de lana de vidrio

5.1 Unión del ADN a la Lana de Vidrio

Se mezclan 100 µl de ADN (que contiene una mezcla de 1 µg de hADN (Roche) y 100 ng de ADN metilado (Intergen, que se distribuye por Serologicals Corporation, Norcross, GA, Estados Unidos; Cat S7821) con 200µl de tampón de



unión (High Pure PCR Template Preparation Kit, Catálogo de Roche 1796828) y 100µl de isopropanol. La mezcla se pipetea sobre la columna del estuche. La columna después se centrifuga en una centrifuga de sobremesa Eppendorf (1 min/8000 rpm). La lana se lava dos veces con el amortiguador de lavado del estuche (500µl por etapa de lavado).

5 5.2 Desnaturalización del ADN Unido a la Lana de Vidrio

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

10 después de eso la lana de vidrio se lava una vez con 500µl del amortiguador de lavado del estuche.

5.3 Desaminación del ADN Unido a la Lana de Vidrio:

15 Se pipetean 200µl de solución de desaminación (urea 6.25M/ bisulfito sódico 2M/ pH 5.0) sobre la lana de vidrio que tiene el ADN seguido por incubación a 50°C durante 16h en un baño de agua.

Después de eso se elimina el reactivo de desaminación y se lava la lana dos veces con 500µl cada vez del amortiguador de lavado del estuche.

20 5.4 Desulfonación del ADN desaminado unido a la lana de vidrio

Para la desulfonación se añaden a las columnas 250µl de reactivo (etanol al 90%/ NaOH 20 mM). Después de una incubación de 15 min/temperatura ambiente las columnas se centrifugan 1 min/8000 rpm. Después de eso las columnas se lavan dos veces con 500µl cada vez de etanol al 80% (centrifugación 10 s/12000rpm).

25 5.5 Elución del ADN

Finalmente el ADN unido se eluye por la adición de 50µl de amortiguador de elución (Tris 10 mM / EDTA 0.1mM, pH7.5) precalentado (70°C) y centrifugación durante 1 min/8000rpm.

30 5.6 Detección del ADN tratado con bisulfito mediante la utilización de una PCR específica en el InstrumentoLightCycler® (formato hyprobe)

35 5.6.1 Composición de mezcla madre:

Sonda de hibridación LightCycler® FastStart DNA Master Hybridation Probe<sup>®</sup>1x (Roche 2239272), MgCl<sub>2</sub> 2mM, iniciador directo 0.5µM, iniciador inverso 0.5µM, sonda donadora 250nM, sonda aceptora 250nM, molde 10µl, volumen total de la PCR 20µl.

40 5.6.2 PCR-condiciones:

Desnaturalización 10min/95°C

45

55 ciclos	95°C/10s
	65°C/10s - captación de señal
	72°C/10s   Incremento gradual de la temperatura 20°C/s

50 5.6.3 Resultado:

55

Número de la muestra	ADN metilado por PCR	Punto de Cruce
1	20ng	34.90
2	20ng	35.27
3	20ng	36.09
4	20ng	36.80

60

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

65

## Lista de Referencias

- Abramson, R. D. y Myers, T. W., *Curr Opin Biotechnol* 4 (1993) 41-7  
 Alderton, R. P., y otros, *Anal Biochem* 201 (1992) 166-9  
 5 Ausubel, F., y otros, en "Current protocols in molecular biology" (1994), Eds. F. Ausubel, R. Brent y K. R.E., Wiley & Sons Verlag, Nueva York  
 Barany, F., *PCR Methods Appl* 1 (1991) 5-16  
 Barany, F., *Proc Natl Acad Sci U S A* 88 (1991) 189-93  
 Benyajati, C., y otros, *Nucleic Acids Res* 8 (1980) 5649-67  
 10 Braunauer, en "The Adsorption of Gases and Vapors" (1943), Princeton University Press  
 Clark, S. J., y otros, *Nucleic Acids Res* 22 (1994) 2990-7  
 DE 3724442  
 DE-A 37 34 442  
 EP 0 200 362  
 15 EP 0 201 184  
 EP 0 389 063  
 EP 0 439 182  
 Feil, R., y otros, *Nucleic Acids Res* 22 (1994) 695-6  
 Frommer, M., y otros, *Proc Natl Acad Sci U S A* 89 (1992) 1827-31  
 20 GB 91/00212  
 Grigg, G. y Clark, S., *Bioessays* 16 (1994) 431-6  
 Grigg, G. W., *DNA Seq* 6 (1996) 189-98  
 Grunau, C., y otros, *Nucleic Acids Res* 29 (2001) E65-5  
 Guatelli, J. C., y otros, *Proc Natl Acad Sci U S A* 87 (1990) 1874-8  
 25 Jakobi, R., y otros, *Anal Biochem* 175 (1988) 196-201  
 Komiyama, M. y Oshima, S., *Tetrahedron Letters* 35 (1994) 8185-8188  
 Kwoh, D. Y., y otros, *Proc Natl Acad Sci U S A* 86 (1989) 1173-7  
 Lottspeich y Zorbas, en "Bioanalytik" (1998), Eds. L. a. Zorbas, Spektrum Akademischer Verlag, Heidelberg, Berlín, Alemania  
 30 Marko, M. A., y otros, *Anal Biochem* 121 (1982) 382-7  
 Morrow, C.S., y otros, *Gene* 75 (1989), 3-11  
 Oakeley, E. J., *Pharmacol Ther* 84 (1999) 389-400  
 Olek, A., y otros, *Nucleic Acids Res* 24 (1996) 5064-6  
 Paulin, R., y otros, *Nucleic Acids Res* 26 (1998) 5009-10  
 35 Raizis, A. M., y otros, *Anal Biochem* 226 (1995) 161-6  
 Sambrook, J., y otros, en "Molecular Cloning: A Laboratory Manual" (1989), Eds. J. Sambrook, E. F. Fritsch y T. Maniatis, Cold Spring Harbour Laboratory Press, Cold Spring Harbour, NY  
 Spray Drying Handbook (1991), John Wiley & Sons, Nueva York  
 US 4,683,202  
 40 US 5,130,238  
 US 5,137,806  
 US 5,210,015  
 US 5,234,809  
 US 5,487,972  
 45 US 5,552,277  
 US 5,595,890  
 US 5,639,611  
 US 5,786,146  
 US 5,804,375  
 50 US 6,174,670  
 US 6,331,393  
 Vogelstein, B. y Gillespie, D., *Proc Natl Acad Sci U S A* 76 (1979) 615-9  
 Warnecke, P. M., y otros, *Methods* 27 (2002) 101-7  
 Whelen, A. C. y Persing, D. H., *Annu Rev Microbiol* 50 (1996) 349-73  
 55 WO 00/32762  
 WO 00/37291  
 WO 01/37291  
 WO 01/98528  
 WO 02/31186  
 60 WO 90/01069  
 WO 90/06045  
 WO 92/02638

WO 92/0880A

WO 96/41811

WO 99/16781

WO 99/40098

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

LISTA DE SECUENCIAS

5 <110> Roche Diagnostics GmbH F. Hoffmann-La Roche AG  
 <120> Método mejorado para el tratamiento con bisulfito  
 <130> 21371

10 <140>  
 <141>

<150> 02019097.1 <151> 2002-08-29  
 <150> 02028114.3 <151> 2002-12-18

15 <160> 1  
 <170> Patent In Ver. 2.1

20 <210> 1  
 <211> 4261  
 <212> ADN  
 <213> Homo sapiens

25 <220>  
 <221> señal\_misc  
 <222> (1156)..(1162)  
 <223> motivo regulador de la transcripción; putativo

30 <220>  
 <221> Señal\_GC  
 <222> (1169)..(1174)

35 <220>  
 <221> Señal\_GC  
 <222> (1179)..(1184)

40 <220>  
 <221> Señal\_TATA  
 <222> (1194)..(1198)

<220>  
 <221> exon  
 <222> (1225)..(1254)

45 <220>  
 <221> Señal\_polyA  
 <222> (4041)..(4046)

50 <300>  
 <308> Genbank:M24485  
 <309> 2000-03-04

55 <300>  
 <303> Gen  
 <304> 75  
 <305> 1  
 <306> 3-11  
 <307> 1989

60 <308> Morrow y otros

<300>  
 <310> US5552277  
 <311> 1994-07-19  
 <312> 1996-09-03

65

ES 2 545 577 T3

<400> 1

5           aacaagagat caatatctag aataaatgga gatctgcaaa tcaacagaaa gtaggcagca 60  
           aagccaaaga aaatagccta aggcacagcc actaaaagga acgtgatcat gtcctttgca 120  
 10          gggacatggg tggagctgga agccgttagc ctcagcaaac tcacacagga acagaaaacc 180  
           agcgagaccg catggctctca cttataagtg ggagctgaac aatgagaaca catggtcaca 240  
           tggcggcgat caacacacac tggtgccctgt tgagcgggggt gctggggagg gagagtacca 300  
 15          ggaagaatag ctaagggata ctgggcttaa tacctgggtg atgggatgat ctgtacagca 360  
           aaccatcatg gcgcacacac ctatgtaaca aacctgcaca tcctgcacat gtaccccaga 420  
 20          acttcaaata aaagttggac ggccaggcgt ggtggctcac gcctgtaatc ccagcacttt 480  
           gggaagccga ggcgtgcaga tcacctaagg tcaggagttc gagaccagcc cggccaacat 540  
 25          ggtgaaabcc cgtctctact aaaaatacaa aaatcagcca gatgtggcac gcacctataa 600  
           ttccacctac tcgggaggct gaagcagaat tgcttgaacc cgagaggcgg aggttgcagt 660  
 30          gagccgccga gatcgcgcc a ctgcactcca gcctgggcca cagcgtgaga ctacgtcata 720  
           aaataaaata aaataacaca aaataaaata aaataaaata aaataaaata aaataataaa 780  
 35          ataaaaataaa ataaaataaa ataaaataaa ataaagcaat ttcctttctc ctaagcggcc 840  
           tccacccctc tcccctgcc tgtgaagcgg gtgtgcaagc tccgggatcg cagcggctct 900  
 40          aggggaattc cccccggat gtcccggcg gccagttcgc tgcgcacact tcgctgcggt 960  
           cctcttctcg ctgtctgttt actccctagg ccccgctggg gacctgggaa agagggaaag 1020  
 45          gcttccccgg ccagctgcgc ggcgactccg gggactccag ggcgcccctc tgcggccgac 1080  
           gccccgggtg cagcggccgc cggggctggg gccggcggga gtccgcgga cctccagaa 1140  
 50          gagcggcccg cggcctgact caqactggg ccggagcggg gcgggaccac ccttataagg 1200  
           ctcggaggcc gcgaggcctt cgct gga gtt tcg ccg ccg cag tct tcg cca 1251

ES 2 545 577 T3

cca gtgagtacgc gcggcccgcct ccccggggat ggggctcaga gctcccagca 1304  
 tggggccaac cgcgagcatc aggcccgggc tcccggcagg gctcctcgcc cacctcgaga 1364  
 5 cccgggacgg gggcctaggg gaccaggac gtccccagtg ccgttagcgg ctttcagggg 1424  
 gcccggagcg cctcggggag ggatgggacc ccgggggchg ggaggggggg caggctgchg 1484  
 10 tcaccgchg cttggcatcct ccccgggct ccagcaaact tttctttgtt cgctgcagtg 1544  
 ccgcccata ccgtggctta tttcccagtt cgaggtagga gcatgtgtct ggcaggggag 1604  
 15 ggaggcaggg gctggggctg cagcccacag cccctcgccc acccgagag atccgaacce 1664  
 ccttatacct ccgtcgtgtg gcttttacc cgggectcct tectgttccc cgctctccc 1724  
 gccatgcctg ctecccggcc cagtgttgtg tgaaatcttc ggaggaacct gttacctgt 1784  
 20 tccctccctg cactcctgac cctccccgg gttgctgca ggcggagtcg gcccggccc 1844  
 cacatctcgt acttctcct ccccgaggc cgctgcgchg cctgcgcat gctgctggca 1904  
 25 gatcagggcc agagctggaa ggaggagtg gtgaccgtg agacgtggca ggaggctca 1964  
 ctcaaagcct cctgcgtaag tgaccatgcc cgggcaagg gagggggtgc tgggccttag 2024  
 30 ggggctgtga ctaggatcgg gggacgcca agctcagtgc cctccctga gccatgcctc 2084  
 cccaacagc tatacgggca gctcccgaag ttccaggac gagacctac cctgtaccag 2144  
 35 tccaatacca tctgcgtca cctgggchg acccttggtg agtcttgaac ctccaagtc 2204  
 agggcaggca tgggcaagc tctgccccg gagcccttt gtttaaatca gctgccccg 2264  
 40 agccctctgg agtggaggaa actgagacc actgaggtta cgtagtttg ccaaggtaa 2324  
 gcctgggtgc ctgcaatcct tgccctgctc caggctgcct cccagggtgc aggtgagctc 2384  
 45 tgagcacctg ctgtgtggca gtctctcacc ctccacgca catcctcttc cctcctccc 2444  
 aggctggggc tcacagacag ccccctggtt ggccatccc cagtgactgt gtgttgatca 2504  
 ggcgcccagt cacgchgct gctcccctc acccaacccc agggctctat ggaaggacc 2564  
 50 agcaggaggc agccctggtg gacatggtga atgacggcgt ggaggacctc cgctgcaaat 2624  
 acatctcct catctacacc aactatgtga gcatctgac cagggttggg cactggggg 2684  
 55 tgaacaaaga aagggtcttc ttgtgccctc acccccctta cccctcaggt ggcttgggct 2744  
 gaccctctc tgggtcaggg tgcaggggct gggtcagctc tgggcccagg gcccagggg 2804  
 60 ctgggacaag acacaacctg cacccttatt gctgggaca tccaccagc aagtaacyg 2864  
 tcatggggg gagtgcaagg acagagacct ccagcaactg gtggtttctg atctcctgg 2924

ES 2 545 577 T3

5 gtggcgaggg cttectggag tagccagagg tggaggagga tttgtcgcca gtttctggat 2984  
 ggaggtgctg gcacttttag ctgaggaaaa tatgcagaca cagagcacat ttggggacct 3044  
 10 gggaccagtt cagcagagge agcgtgtgtg cgcgtgcgtg tgcgtgtgtg tgcgtgtgtg 3104  
 tgtgtacgct tgcatttgtg tcgggtgggt aaggagatag agatgggcgg gcagtaggcc 3164  
 15 caggccccga aggccttgaa cccactgggt tggagtctcc taagggaat gggggccatt 3224  
 gagaagtctg aacagggctg tgtctgaatg tgaggtctag aaggatcctc cagagaagcc 3284  
 20 agctctaaag cttttgcaat catctggtga gagaaccag caaggatgga caggcagaat 3344  
 ggaatagaga tgagttggca gctgaagtgg acaggatttg gtactagcct ggttgtgggg 3404  
 25 agcaagcaga ggagaatctg ggactctggg gtctggcctg gggcagacgg ggggtgtctca 3464  
 ggggctggga gggatgagag taggatgata catggtggtg tctggcagga ggcgggcaag 3524  
 30 gatgactatg tgaaggcact gcccgggcaa ctgaagcctt ttgagaccct gctgtcccag 3584  
 aaccagggag gcaagacctt cattgtggga gaccaggtga gcatctggcc ccatgctgtt 3644  
 35 ccttectcgc caccctctgc ttccagatgg acacaggtgt gagccatttg tttagcaaag 3704  
 cagagcagac ctaggggatg ggcttaggcc ctctgcccc aattcctcca gctgtctcc 3764  
 40 gctggctgag tccctagccc cctgcccctg cagatctcct tcgctgacta caacctgctg 3824  
 gaettgctgc tgatecatga ggtcctagcc cctggctgcc tggatgcgtt ccccctgctc 3884  
 45 tcagcatatg tgggggcct cagtgcccgg cccaagctca aggccttctt ggctcccct 3944  
 gagtacgtga acctcccat caatggcaac gggaaacagt gagggttggg gggactctga 4004  
 50 gcgggaggca gagtttgcct tctttctcc aggaccaata aaatttctaa gagagctact 4064  
 atgagcactg tgtttctgg gacggggctt aggggttctc agcctcgagg tcggtgggag 4124  
 55 ggcagagcag aggactagaa aacagctcct ccagcacagt cagtggcttc ctggagccct 4184  
 cagcctggct gtgtttactg aacctcaca actagaagag gaagaaaaaa aaagagagag 4244  
 60 agaaacaaag agaaata 4261

## REIVINDICACIONES

- 5
1. Método para la conversión de una base citosina en un ácido nucleico a una base uracilo, que comprende las etapas de:
- 5
- a) incubar el ácido nucleico en presencia de iones sulfito de manera que el ácido nucleico se desamina,  
 b) unir el ácido nucleico desaminado a una fase sólida,  
 c) lavar opcionalmente el ácido nucleico desaminado unido a la fase sólida,  
 10 d) incubar el ácido nucleico unido a la fase sólida desaminado bajo condiciones alcalinas de manera que el ácido nucleico desaminado se desulfona,  
 e) lavar opcionalmente el ácido nucleico unido a la fase sólida desaminado y desulfonado, y  
 f) eluir opcionalmente el ácido nucleico desaminado y desulfonado a partir de la fase sólida.
- 15
2. El método de acuerdo con la reivindicación 1 caracterizado porque la fase sólida es un material que comprende sílice o vidrio.
3. El método de acuerdo con la reivindicación 1 o 2 caracterizado porque la fase sólida es una lana de vidrio o una membrana de vidrio.
- 20
4. El método de acuerdo con la reivindicación 1 o 2 caracterizado porque la fase sólida es una partícula de vidrio magnética.
5. El método de la reivindicación 4 caracterizado porque la partícula de vidrio magnética tiene un diámetro medio entre 0.5  $\mu\text{m}$  y 5  $\mu\text{m}$ .
- 25
6. El método de acuerdo con la reivindicación 4 o 5 caracterizado porque la partícula magnética de vidrio contiene un objeto magnético con un diámetro entre 5 y 500 nm.
7. El método de la reivindicación 6 caracterizado porque la partícula de vidrio magnética contiene un objeto magnético con un diámetro medio de 23 nm.
- 30
8. El método de acuerdo con cualquiera de las reivindicaciones de la 4 a la 7 caracterizado porque la partícula de vidrio magnética se fabrica por el método sol-gel.
- 35
9. El método de la reivindicación 8, en donde dicho método sol-gel comprende las etapas de
- a) suspender objetos magnéticos en un sol  
 b) hidrólisis del sol para cubrir los objetos magnéticos con un gel,  
 c) secado por aspersion de los objetos magnéticos cubiertos con un gel en un secador por aspersion de dos boquillas, y  
 40 d) sinterización del polvo secado por aspersion para formar un vidrio a partir del gel que cubre los objetos magnéticos.
- 45
10. Uso de una fase sólida en la etapa de desulfonación de una reacción en donde una base citosina en un ácido nucleico se convierte a una base uracilo en presencia de iones bisulfito con la condición de que el ácido nucleico no se une a la fase sólida durante la etapa de desaminación.
11. El uso de acuerdo con la reivindicación 10, en donde la fase sólida es un material que comprende sílice o vidrio.
- 50
12. El uso de acuerdo con las reivindicaciones 10 u 11, en donde la fase sólida es una lana de vidrio o una membrana de vidrio.
13. El uso de acuerdo con las reivindicaciones 10 u 11, en donde la fase sólida es una partícula de vidrio magnética
- 55
14. El método de acuerdo con cualquiera de las reivindicaciones de la 1 a la 9 o la utilización de acuerdo con cualquiera de las reivindicaciones de la 10 a la 13, en donde la fase sólida contiene poros.
- 60
15. El método o la utilización de acuerdo con la reivindicación 14, en donde los ácidos nucleicos se unen a las superficies en dichos poros.
- 65
16. Un estuche para realizar una reacción con bisulfito de acuerdo con el método de la reivindicación 1, en donde el estuche contiene una solución que comprende iones bisulfito y una fase sólida.



- 5
- 10
- 15
17. El estuche de acuerdo con la reivindicación 16, en donde la fase sólida es un material que comprende sílice o vidrio.
  18. El estuche de acuerdo con la reivindicación 16 o 17, en donde la fase sólida es una lana de vidrio o una membrana de vidrio.
  19. El estuche de acuerdo con cualquiera de las reivindicaciones de la 16 a la 18, en donde la fase sólida es una partícula de vidrio magnética.
  20. El estuche de acuerdo con cualquiera de las reivindicaciones de la 16 a la 19, en donde la fase sólida contiene poros.
  21. El estuche de acuerdo con la reivindicación 20, en donde el ácido nucleico se une a las superficies en dichos poros.
  22. Uso del estuche de acuerdo con cualquiera de las reivindicaciones de la 16 a la 21 para una reacción, en donde una base citosina en un ácido nucleico se convierte a una base uracilo en la presencia de iones bisulfito.

Figura 1:

