



19



OFICINA ESPAÑOLA DE
PATENTES Y MARCAS

ESPAÑA

11 Número de publicación: **2 358 480**

51 Int. Cl.:

C12Q 1/68 (2006.01)

G01N 21/64 (2006.01)

12

TRADUCCIÓN DE PATENTE EUROPEA

T3

96 Número de solicitud europea: **07804750 .3**

96 Fecha de presentación : **10.08.2007**

97 Número de publicación de la solicitud: **2069532**

97 Fecha de publicación de la solicitud: **17.06.2009**

54

Título: **Procedimiento para determinar ácidos nucleicos mediante fluorescencia.**

30

Prioridad: **11.08.2006 FR 06 07309**
11.08.2006 US 836949 P

45

Fecha de publicación de la mención BOPI:
11.05.2011

45

Fecha de la publicación del folleto de la patente:
11.05.2011

73

Titular/es: **BIOQUANTA**
5 rue l'Abbé de l'Épée
75005 Paris, FR
Assistance Publique - Hôpitaux de Paris y
BIOQUANTA Corp.

72

Inventor/es: **Sacko, Mory;**
Delacotte, Nicolas;
Bah, Mamadou Saliou y
Conti, Marc

74

Agente: **Espiell Volart, Eduardo María**

ES 2 358 480 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

La presente invención se refiere a un procedimiento fluorimétrico para determinar la cantidad de ácido nucleico presente en una muestra, a un fluorímetro adecuado para la realización de dicho procedimiento y a una cubeta para un ensayo de fluorescencia de un compuesto.

5 Es conocida la existencia de ácidos nucleicos libres circulando en la sangre desde hace varios años [Mandel y Métais; 1947; Tan y col., 1966]. Desde ese momento, se ha encontrado usando procesos como el RIA (inmunoensayo radiactivo) que los pacientes que sufren cáncer tienen un elevado nivel de ADN en circulación en relación con aquellos que sufren tumores benignos o en relación con sujetos sanos [Leon y col., 1977; Shapiro y col., 1983].

10 Sin embargo, en estos últimos años, con el desarrollo de procesos de biología molecular muy eficaces, como la PCR en tiempo real, se ha observado un interés creciente en los fragmentos de ADN circulante con miras a su uso como un marcador biológico clínico.

15 El ADN extraído del plasma de pacientes con cáncer normalmente tiene características de ADN tumoral [Anker P. y col., 1999], tal como inestabilidad de cadena, la presencia de oncogenes específicos, genes supresores de tumores y alteraciones de microsatélites. La idea de que este ADN circulante se origina en las células tumorales fue asumida por Kok y col. [De Kok y col., 1997] quienes publicaron que el ADN que deriva de los tumores, caracterizado por alteraciones específicas, podría estar en el suero de los pacientes que sufren un tumor colorrectal. Así, estos autores detectaron determinadas mutaciones puntuales K-ras en el ADN del suero que previamente se habían identificado en el tumor principal. Es por esto que la mayoría de los estudios de ADN circulante se centraron en la detección de mutaciones, pérdida de heterocigosidad, mutaciones de microsatélites y la metilación del ADN extraído de los tumores (tejidos) o suero de pacientes que sufrían diversos tipos de cánceres. Las mutaciones de microsatélites y las inestabilidades detectadas en el ADN genómico libre del suero sugieren que este podría ser un posible nuevo marcador, con una especificidad considerable para el seguimiento de tumores.

20 Más recientemente, un gran número de estudios han intentado utilizar el mero aumento de la concentración de ADN circulante genómico o no genómico como marcador diagnóstico o un marcador del desarrollo precoz de cáncer de mama y de pulmón y también para el control e inspección de pacientes que ya han recibido tratamiento con quimioterapia [Sozzi y col., 2001]. Esta determinación podría eliminar, o al menos reducir, la necesidad de procedimientos más invasivos, tales como biopsias. También podría ser útil en la selección de cánceres específicos en estadio inicial, tales como cánceres de pulmón [Sozzi y col., 2003], mama [Gal y col., 2004] o próstata [Boddy y col., 2005; Jung y col., 2004]. Finalmente, también podría usarse como complemento del análisis de marcadores utilizados frecuentemente para controlar pacientes que sufren cánceres o se someten a quimioterapia, o pacientes que se han sometido a una intervención quirúrgica, han sufrido un traumatismo [Lam y col., 2003] o un infarto de miocardio [Chang y col., 2003].

Hay básicamente dos tipos de ADN circulante en la sangre:

- ADN asociado con las células nucleadas en circulación y
- 35 - ADN circulante libre en el plasma.

El ADN genómico en el suero está fragmentado en pacientes que sufren cáncer o han tenido un infarto de miocardio, con la presencia de fragmentos de aproximadamente 100 pares de bases en el caso de carcinomas [Wu y col., 2002] y de aproximadamente 200 pares de bases en el caso del infarto de miocardio [Chang y col., 2003]. Estos fragmentos no se encuentran en la sangre de controles sin patología en los que, además, el ADN en circulación se encuentra a concentraciones muy bajas. Incluso ahora, se sabe muy poco sobre el mecanismo por el cual el ADN se libera al torrente circulatorio. Jahr y col. [Jahr y col., 2001] han propuesto la hipótesis de que las fuentes principales de este ADN son células apoptóticas y necróticas.

45 Actualmente no existe valor límite de referencia que defina la concentración de este ADN circulante en sujetos sanos. Diversos estudios han intentado aproximarse a este umbral, pero es muy difícil comparar estos como metodologías, y los resultados obtenidos difieren en muchos niveles. Además, las unidades utilizadas varían de un estudio a otro: ng/ml; número de copias/ml; equivalente de genoma/ml (la cantidad de ADN contenido en una célula diploide se estima en 6,6 picogramos/ml), etc.

50 Muchos grupos de investigación han determinado el nivel de ADN circulante buscando una posible aplicación en el pronóstico, en particular intentando establecer correlaciones con los marcadores diagnósticos convencionales. Hasta la fecha, todos los estudios han coincidido en que los niveles medios de ADN son sustancialmente más elevados en pacientes con cáncer que en controles sanos, independientemente del suero o plasma utilizado. Sin embargo, las cantidades absolutas medidas varían entre estudios. Esta diferencia podría estar ligada al tipo de cáncer analizado y a las diversas metodologías utilizadas. Los niveles de ADN medidos en el plasma son menores que los medidos en el suero, como confirman los mayores volúmenes de datos publicados [Thijssen y col., 2002]. Con respecto al significado clínico, al menos dos publicaciones describen una correlación entre los niveles de ADN y factores pronósticos conocidos. En cánceres pulmonares (microcíticos y no microcíticos), existe una estrecha correlación entre los niveles de ADN en plasma y la actividad de la LDH del suero y de la enolasa específica de neuronas (NSE), con relaciones

similares entre cada marcador y la supervivencia del paciente [Fournié y col., 1995]. De modo similar, los niveles de ADN se han correlacionado con el estadio clínico en el caso de metástasis de los ganglios linfáticos y el tamaño del tumor en pacientes que sufren cáncer de mama [Shao y col., 2001]. Finalmente, es importante recordar que la fracción de ADN circulante debido a la contribución de los tumores varía considerablemente de un paciente a otro [Jahr y col., 2001].

Un gran número de procesos para determinar ácidos nucleicos en solución están disponibles hoy en día y permiten, dependiendo del procedimiento, la adaptación a las diversas necesidades de médicos e investigadores. Estos procesos incluyen, principalmente, espectrofotometría [Greenstock y col., 1975]: un procedimiento utilizado con mucha frecuencia en todos los laboratorios de investigación y que presenta la ventaja de ser barato pero el inconveniente, importante en la práctica clínica, de ser extremadamente insensible no permite medir las cantidades de ADN circulante en los pacientes.

Hay otros procesos más sensibles, aunque todos ellos tienen características que hacen que sea más o menos difícil utilizarlos de forma rutinaria, en parte debido a que tienen una fase común la cual es que se extrae el ADN del entorno biológico antes de la determinación:

- Los **procesos de radioinmunoensayo** [Leon y col., 1975] necesitan un tiempo relativamente largo (varios horas para las series de análisis), tienen que realizarse en una serie de determinaciones y no esporádicamente y, sobre todo, requiere estructuras especializadas y personal autorizado para la manipulación de elementos radiactivos.

- La **PCR competitiva** [Siebert y col., 1992; Yap y col., 1992], basada en muestras comparativas relativas a patrones conocidos, es la adición de varios procesos en serie que proporcionan sensibilidad y especificidad de detección. Estos procesos son poco prácticos y relativamente confidenciales, por tanto, su uso rutinario en los laboratorios de análisis clínicos es inconcebible en el futuro

- La **PCR cuantitativa en tiempo real** [Mulder y col., 1994] es el proceso preferido en las diversas publicaciones interesadas en este problema de medir el ADN circulante. Sus ventajas son dobles: es específico del ADN diana que se va a mostrar (en este caso, el ADN humano) y, hoy en día, ya no está reservado a laboratorios de investigación, ya que el equipo puede encontrarse en un gran número de hospitales. Sin embargo, no está libre de inconvenientes: extracción obligatoria, costes de manejo relativamente elevados, equipo específico el cual no puede usarse para análisis rutinarios a gran escala y sensibilidad insuficiente.

- **Fluorimetría cuantitativa** [Greenstock y col., 1975]. Aunque este no evita la etapa de extracción, permite medir más rápida y directamente el ADN libre presente en la solución. Sin embargo, las condiciones técnicas en las que se usa (microplacas, volumen de reactivo, medición de fluorescencia) evitan que se consigan los límites de sensibilidad deseados y no permiten identificar el origen del ADN detectado (humano o no).

Por tanto, en la presente invención se busca proporcionar un proceso para determinar la cantidad de ácido nucleico presente en una muestra que esté libre de los inconvenientes de los procesos existentes.

El punto inicial de la invención es, por tanto, el hecho de que los inventores han demostrado que es posible determinar la cantidad de ácido nucleico presente en una muestra añadiendo a la misma un fluoróforo y determinando la intensidad de fluorescencia emitida, en un análisis sincrónico o, en al menos dos, en particular, en al menos tres diferentes longitudes de onda de emisión en respuesta a la excitación en al menos dos, en particular en al menos tres longitudes de onda correspondientes.

Resumen de la invención

La presente invención se refiere a un procedimiento para determinar la cantidad de ácido nucleico presente en una muestra mediante fluorescencia a al menos dos, preferiblemente, al menos tres longitudes de onda, en el que:

- se añade un fluoróforo a la muestra,

- se miden respectivamente las intensidades de fluorescencia emitidas por el fluoróforo a al menos dos, preferiblemente al menos tres, longitudes de onda de emisión en respuesta a las estimulaciones lumínicas a al menos dos, preferiblemente, a tres, longitudes de onda de excitación,

y

- se deduce la cantidad de ácido nucleico presente en la muestra a partir de al menos dos, preferiblemente al menos tres, intensidades de fluorescencia medidas.

En una realización en particular del procedimiento anterior, se miden las intensidades de fluorescencia I_1 , I_2 y I_3 , emitidas por el fluoróforo a tres longitudes de onda de emisión λ_1 , λ_2 y λ_3 en respuesta a las estimulaciones lumínicas a tres longitudes de onda de excitación λ'_1 , λ'_2 y λ'_3 respectivamente, con $\lambda_1 < \lambda_2 < \lambda_3$ y estando predeterminadas λ_1 , λ_2 y λ_3 .

En otra realización en particular del procedimiento anterior, la cantidad de ácido nucleico se deduce del valor de F siguiente:

$$F = I_2 - \left[\frac{I_1 - I_3}{\lambda_1 - \lambda_3} \lambda_2 - \frac{\lambda_1 I_3 - \lambda_3 I_1}{\lambda_1 - \lambda_3} \right]$$

5 En otra realización en particular del procedimiento anterior, el fluoróforo es Picogreen® y las longitudes de onda son las siguientes:

$\lambda'_1 = 472 \pm 10$ (preferiblemente ± 5) nm $\lambda_1 = 502 \pm 10$ (preferiblemente ± 5) nm

$\lambda'_2 = 496 \pm 10$ (preferiblemente ± 5) nm $\lambda_2 = 526 \pm 10$ (preferiblemente ± 5) nm

$\lambda'_3 = 538 \pm 10$ (preferiblemente ± 5) nm $\lambda_3 = 568 \pm 10$ (preferiblemente ± 5) nm

10 Además, en otra realización en particular del procedimiento anterior, se miden las intensidades de fluorescencia I_1 e I_2 , emitidas por el fluoróforo a dos longitudes de onda de emisión λ_1 y λ_2 en respuesta a dos estimulaciones lumínicas a dos longitudes de onda de excitación λ'_1 y λ'_2 respectivamente, estando predeterminadas λ_1 y λ_2 .

En este contexto, la cantidad de ácido nucleico se deduce preferiblemente del valor absoluto de la diferencia entre I_1 e I_2 a partir del siguiente valor de F:

$$F = [I_2 - I_1]$$

15 Aún en este contexto, si es fluoróforo es Picogreen®, las longitudes de onda son las siguientes:

$\lambda'_1 = 472 \pm 10$ nm $\lambda_1 = 502 \pm 10$ nm y

$\lambda'_2 = 496 \pm 10$ nm $\lambda_2 = 526 \pm 10$ nm, o

$\lambda'_1 = 496 \pm 10$ nm $\lambda_1 = 526 \pm 10$ nm y

$\lambda'_2 = 538 \pm 10$ nm $\lambda_2 = 568 \pm 10$ nm

20 Más específicamente, la cantidad de ácido nucleico de la muestra se deduce del valor de F usando una curva de calibrado.

La presente invención también se refiere a un fluorímetro adecuado para llevar a cabo un procedimiento como el definido anteriormente en este documento, caracterizado porque comprenden:

25 - uno o más sistemas para la excitación lumínica a dos y/o tres longitudes de onda de excitación λ'_1 , λ'_2 y, opcionalmente, λ'_3 ;

- uno o más sistemas para medir las intensidades de fluorescencia I_1 , I_2 y, opcionalmente, I_3 emitidas a tres longitudes de onda de emisión λ_1 , λ_2 y λ_3 .

- una calculadora que calcule el siguiente valor F:

$$F = [I_2 - I_1] \text{ y/o } F = I_2 - \left[\frac{I_1 - I_3}{\lambda_1 - \lambda_3} \lambda_2 - \frac{\lambda_1 I_3 - \lambda_3 I_1}{\lambda_1 - \lambda_3} \right]$$

30 En una realización en particular del procedimiento anterior del fluorímetro mencionado anteriormente, para tres longitudes de ondas, las longitudes de onda de excitación y emisión son las siguientes:

$\lambda'_1 = 472 \pm 10$ (preferiblemente ± 5) nm $\lambda_1 = 502 \pm 10$ (preferiblemente ± 5) nm

$\lambda'_2 = 496 \pm 10$ (preferiblemente ± 5) nm $\lambda_2 = 526 \pm 10$ (preferiblemente ± 5) nm

$\lambda'_3 = 538 \pm 10$ (preferiblemente ± 5) nm $\lambda_3 = 568 \pm 10$ (preferiblemente ± 5) nm

35 En otra realización en particular del fluorímetro mencionado anteriormente, para dos longitudes de onda, las longitudes de onda de excitación y emisión son las siguientes:

$$\lambda'_1 = 472 \pm 10 \text{ nm} \quad \lambda_1 = 502 \pm 10 \text{ nm y}$$

$$\lambda'_2 = 496 \pm 10 \text{ nm} \quad \lambda_2 = 526 \pm 10 \text{ nm, o}$$

$$\lambda'_1 = 496 \pm 10 \text{ nm} \quad \lambda_1 = 526 \pm 10 \text{ nm y}$$

$$\lambda'_2 = 538 \pm 10 \text{ nm} \quad \lambda_2 = 568 \pm 10 \text{ nm}$$

5 La presente invención también se refiere a una cubeta prevista para el ensayo de fluorescencia de un compuesto, que comprende un recipiente de mezcla y de medida que es transparente a la luz al menos a las longitudes de onda utilizadas para el análisis de fluorescencia, estando conectado el recipiente a:

- un depósito que contiene un fluoróforo, estando conectando a su vez el depósito del fluoróforo a un depósito que contiene una solución de dilución, y a

10 • un depósito para estandarizar el volumen de una muestra que contiene el compuesto que se va a analizar, estando conectado a su vez el depósito de estandarización a un pocillo para la recogida de la muestra que contiene el compuesto que se va a analizar.

En una realización en particular de la cubeta definida anteriormente en este documento, las válvulas antirretorno se colocan:

15 - entre el pocillo de recogida y el depósito de estandarización, de modo que la solución recogida es capaz de pasar sólo en la dirección del depósito de estandarización.

- entre el depósito de estandarización y el recipiente de mezcla y medición, de modo que la solución recogida es capaz de pasar sólo en la dirección del recipiente;

20 - entre el depósito que contiene la solución de dilución y el depósito del fluoróforo, de modo que la solución de dilución es capaz de pasar sólo en la dirección del depósito del fluoróforo;

- entre el depósito del fluoróforo y el vaso de mezcla y medida, de modo que la dilución es capaz de pasar sólo en la dirección del vaso.

25 En otra realización en particular de la cubeta definida anteriormente en este documento, los compartimentos que consisten en el depósito de estandarización, el recipiente de mezcla y medida, el depósito del fluoróforo y el depósito de la solución de dilución están fabricados en un material suficientemente flexible como para permitir que los líquidos contenidos en los recipientes se muevan debido a la presión ejercida sobre los mismos.

En otra realización en particular de la cubeta definida anteriormente en este documento, el fluoróforo es Picogreen® y la solución de dilución es un tampón Tris-Borato-EDTA (TBE).

30 En otra realización en particular de la cubeta definida anteriormente en este documento, el depósito de estandarización se acopla a un medio para la selección de moléculas de ácido nucleico contenidas en la solución recogida y que tiene una longitud de menos de 1.000 nucleótidos.

Descripción detallada de la invención

Ácido nucleico

35 El ácido nucleico puede ser de origen natural o sintético y los nucleótidos, en especial los ribonucleótidos o los desoxirribonucleótidos, que este incorpora pueden ser naturales o modificados. Preferiblemente, el ácido nucleico es ADN o ARN, más preferiblemente ADN. También preferiblemente, el tamaño de las cadenas de ácido nucleico es mayor de cinco bases.

40 Ventajosamente, la cuantificación específica de los ácidos nucleicos que tienen cadenas de bajo peso molecular (longitud menor de 1.000 bases, por ejemplo) en una muestra, opcionalmente después de la selección de estos ácidos nucleicos usando un proceso adecuado, permite la cuantificación de la muestra por apoptosis de las células, por ejemplo, en el organismo o en el cultivo del cual se origina la muestra; por tanto, el valor medido puede relacionarse con el valor de la cantidad total de ADN, medido opcionalmente sin ningún proceso para la selección de cadenas con un tamaño menor de 1.000 bases, para proporcionar el porcentaje de muerte celular por apoptosis.

45 La apoptosis también puede cuantificarse midiendo los ácidos nucleicos totales y midiendo los ácidos nucleicos de elevado peso molecular tras la eliminación de los ácidos nucleicos de bajo peso molecular usando un proceso adecuado. La cantidad de ácidos nucleicos de pesos moleculares bajos puede obtenerse a continuación restando los ácidos nucleicos de pesos moleculares altos.

Opcionalmente, los ácidos nucleicos de bajo peso molecular pueden cuantificarse directamente tras su selección específica. Los ácidos nucleicos restantes de elevado peso molecular pueden también medirse a continuación específicamente. Por consiguiente, el contenido total de ácidos nucleicos puede obtenerse mediante la suma de ambas cantidades.

5 Para cuantificar la apoptosis, la cuantificación específica de los ácidos nucleicos de pesos moleculares bajos o de pesos moleculares elevados de los ácidos nucleicos totales puede realizarse mediante fluorescencia, tras la interacción del ADN con un fluoróforo. Los ácidos nucleicos pueden capturarse y/o concentrarse con anterioridad utilizando cualquier proceso adecuado.

10 La cuantificación de la apoptosis dentro del marco de la presente invención puede avanzar en condición cinética, mientras continua la experimentación. De hecho, no es necesario, por ejemplo, parar el cultivo celular para hacer la medición, ya que se miden los fragmentos de ácidos nucleicos eliminados al medio externo (p. ej., medio de cultivo). Las células vivas restantes permiten continuar con el experimento. Por tanto, es posible repetir la medición poco tiempo después, y así sucesivamente, con la frecuencia que sea necesario. Del mismo modo que es posible medir la apoptosis que ocurre en humanos o en animales, el medio medido será aquí cualquier tipo de muestra biológica.

15 Por tanto, es posible concebir numerosos campos de aplicación: tales como el campo médico, protocolos experimentales con animales o cultivos celulares... Los fragmentos de ácidos nucleicos pueden medirse en cualquier tipo de líquido, naturales o no.

Un campo en particular se refiere a estudios farmacológicos, en animales o en cultivos celulares. Abarca particularmente a:

- 20
- Comprobación de la letalidad de un fármaco;
 - Establecimiento del modo de inducción de la muerte celular, p. ej., necrosis o apoptosis;
 - Definición en las condiciones experimentales que se aplican, el tiempo antes de que se produzca la primera muerte celular, mientras que otras células están vivas, lo que permite la continuación del experimento.

25 Otro campo se refiere a la investigación científica sobre cultivos celulares. De hecho es posible estudiar el efecto sobre la muerte celular de:

- la estimulación o inactivación de rutas metabólicas, o
- condiciones experimentales utilizadas.

Aún, otro campo se refiere al protocolo experimental en animales, para comprobar los efectos de:

- 30
- fármacos sobre la muerte celular aleatoria,
 - muerte celular inducida o
 - condiciones experimentales.

Además de todo lo descrito anteriormente, es interesante cuantificar la apoptosis en el control o seguimiento de pacientes que sufren patologías que inducen muerte celular, para diagnosticar sus patologías o para seguir la eficacia de sus tratamientos.

35 Más en general, los campos de aplicación son aquellos en los que es necesario saber si tiene lugar muerte celular, el modo de inducción de la muerte, el intervalo antes de que esta ocurra y la duración del efecto estudiado. Por tanto, la cantidad de ácidos nucleicos que se han determinado con el procedimiento definido anteriormente se utiliza preferentemente en el contexto de la caracterización de la muerte celular.

Muestra

40 La muestra puede ser de origen natural o sintético, mineral u orgánico. Preferiblemente, la muestra es una muestra biológica o un derivado de muestra biológica. Más preferiblemente, la muestra deriva de una muestra biológica por dilución. La muestra biológica puede, por ejemplo, ser de un animal, en particular humano, o de origen vegetal.

45 También preferiblemente, la muestra biológica se selecciona entre el grupo compuesto por cultivos celulares, sangre completa, suero, plasma, elementos formes de la sangre, eritrocitos, orina, heces, líquido cefalorraquídeo, esperma, un líquido de punción, esputo, saliva, líquidos bronquiales y alveolares, pus, secreciones genitales, líquidos amnióticos, líquidos gástricos, bilis, líquido pancreático, y una biopsia tisular, pelo, piel y dientes y líquidos linfáticos.

También preferiblemente, la muestra se obtiene a partir de un paciente que sufre una situación fisiopatológica en la que puede haberse observado una rotura celular. En particular, la muestra se obtiene a partir de un paciente seleccionado entre el grupo compuesto por un paciente que sufre o, se sospecha que sufre, un cáncer, un paciente en

tratamiento con quimioterapia, un paciente que se ha sometido a una intervención quirúrgica, un paciente con traumatismo y un paciente que ha sufrido un infarto de miocardio.

Preferiblemente, los ácidos nucleicos contenidos en la muestra biológica se originan a partir de una lisis celular de origen fisiológico o patológico, en particular ácidos nucleicos originados a partir de células apoptóticas.

5 La muestra es preferiblemente en particular plasma diluido de 20 a 400 veces.

Ventajosamente, el procedimiento según la invención permite la cuantificación de un ácido nucleico dentro de cualquier mezcla deseada sin purificación previa del ácido nucleico.

Fluoróforo

10 El término "fluoróforo" se refiere a un compuesto el cual es propenso a emitir luz en respuesta a una excitación lumínica.

En la invención, el fluoróforo es preferiblemente propenso a interaccionar con los ácidos nucleicos mediante el establecimiento con estos de interacciones débiles o fuertes, o de enlaces químicos.

Generalmente, puede trazarse una distinción entre los fluoróforos que interaccionan con los ácidos nucleicos:

- agentes intercalantes, tales como bromuro de etidio, yoduro de propidio o Picogreen®;
- 15 - agentes que se unen al surco menor del ADN de cadena doble, tal como DAPI y reactivo Hoechst (por ejemplo, Hoechst 33258, Hoechst 34580);
- los diversos agentes que interaccionan con los ácidos nucleicos, tal como la naranja de acridina, 7-AAD, LDS 751 e hidroxiestilbanidina.

20 Entre otros ejemplos se incluyen fluoróforos seleccionados entre el grupo compuesto por fluoróforos de las familias SYBR (químicamente reactivo), TOTO (dímero de cianina), TO-PRO (monómeros de cianina), SYTO (penetran en las células) y SYTOX (no penetran en las células).

Preferiblemente, el fluoróforo es un agente intercalante de ácidos nucleicos.

25 La expresión "agente intercalante de ácidos nucleicos" se refiere a un fluoróforo propenso a insertarse entre las bases que forman la cadena del ácido nucleico. Los agentes intercalantes son bien conocidos por un experto en la técnica.

Por tanto, los inventores han demostrado, en especial, que Picogreen®, bromuro de etidio, el reactivo Hoechst 33258, naranja de acridina, POPO®, TOTO® y SYBR® permiten la cuantificación de ácidos nucleicos usando el procedimiento de la invención.

30 Preferiblemente, el fluoróforo se selecciona por tanto entre el grupo compuesto por Picogreen®, bromuro de etidio, el reactivo Hoechst 33258, naranja de acridina, POPO®, TOTO® y SYBR®.

Más preferiblemente, el fluoróforo es Picogreen® o 2-[N-bis-(3-dimetilaminopropil)-amino]-4-[2,3-dihidro-3-metil-(benzo-1,3-tiazol-2-il)-metiliden]-1-fenil-quinolinium[+].

35 En particular, Picogreen® está comercializado por *Molecular Probes*. En particular, se caracteriza en la patente de EE.UU. Nº 5.863.753. En el proceso anterior, el Picogreen® del kit de cuantificación de ADNds Picogreen (Molecular Probes) se utiliza preferiblemente en una dilución de aproximadamente 1/5.000 a aproximadamente 1/80.000, en particular, en una dilución de aproximadamente 1/20.000.

Cuando se usa bromuro de etidio, pueden usarse las siguientes longitudes de onda de excitación y emisión en el procedimiento y fluorímetro definidos anteriormente.

Para tres longitudes de onda:

- 40 $\lambda'_1 = 475 \pm 10 \text{ nm}$ $\lambda_1 = 550 \pm 10 \text{ nm}$
 $\lambda'_2 = 520 \pm 10 \text{ nm}$ $\lambda_2 = 595 \pm 10 \text{ nm}$
 $\lambda'_3 = 560 \pm 10 \text{ nm}$ $\lambda_3 = 635 \pm 10 \text{ nm}$

Para dos longitudes de onda:

- 45 $\lambda'_1 = 475 \pm 10 \text{ nm}$ $\lambda_1 = 550 \pm 10 \text{ nm}$
 $\lambda'_2 = 520 \pm 10 \text{ nm}$ $\lambda_2 = 595 \pm 10 \text{ nm}$, o

$$\lambda'_1 = 520 \pm 10 \text{ nm} \quad \lambda_1 = 595 \pm 10 \text{ nm}$$

$$\lambda'_2 = 560 \pm 10 \text{ nm} \quad \lambda_2 = 635 \pm 10 \text{ nm}$$

Cuando se usa Hoechst 33258, pueden usarse las siguientes longitudes de onda de excitación y emisión en el procedimiento y fluorímetro definidos anteriormente.

5 Para tres longitudes de onda:

$$\lambda'_1 = 315 \pm 10 \text{ nm} \quad \lambda_1 = 435 \pm 10 \text{ nm}$$

$$\lambda'_2 = 350 \pm 10 \text{ nm} \quad \lambda_2 = 470 \pm 10 \text{ nm}$$

$$\lambda'_3 = 395 \pm 10 \text{ nm} \quad \lambda_3 = 515 \pm 10 \text{ nm}$$

Para dos longitudes de onda:

10 $\lambda'_1 = 315 \pm 10 \text{ nm} \quad \lambda_1 = 435 \pm 10 \text{ nm}$

$$\lambda'_2 = 350 \pm 10 \text{ nm} \quad \lambda_2 = 470 \pm 10 \text{ nm, o}$$

$$\lambda'_1 = 350 \pm 10 \text{ nm} \quad \lambda_1 = 470 \pm 10 \text{ nm}$$

$$\lambda'_2 = 395 \pm 10 \text{ nm} \quad \lambda_2 = 515 \pm 10 \text{ nm}$$

15 Cuando se usa verde II de SyBR, pueden usarse las siguientes longitudes de onda de excitación y emisión en el procedimiento y fluorímetro definidos anteriormente.

Para tres longitudes de onda:

$$\lambda'_1 = 450 \pm 10 \text{ nm} \quad \lambda_1 = 475 \pm 10 \text{ nm}$$

$$\lambda'_2 = 485 \pm 10 \text{ nm} \quad \lambda_2 = 510 \pm 10 \text{ nm}$$

$$\lambda'_3 = 525 \pm 10 \text{ nm} \quad \lambda_3 = 550 \pm 10 \text{ nm}$$

20 Para dos longitudes de onda:

$$\lambda'_1 = 450 \pm 10 \text{ nm} \quad \lambda_1 = 475 \pm 10 \text{ nm}$$

$$\lambda'_2 = 485 \pm 10 \text{ nm} \quad \lambda_2 = 510 \pm 10 \text{ nm, o}$$

$$\lambda'_1 = 485 \pm 10 \text{ nm} \quad \lambda_1 = 510 \pm 10 \text{ nm}$$

$$\lambda'_2 = 525 \pm 10 \text{ nm} \quad \lambda_2 = 550 \pm 10 \text{ nm}$$

25 Cuando se usa Popo 1, pueden usarse las siguientes longitudes de onda de excitación y emisión en el procedimiento y fluorímetro definidos anteriormente:

Para tres longitudes de onda:

$$\lambda'_1 = 415 \pm 10 \text{ nm} \quad \lambda_1 = 437 \pm 10 \text{ nm}$$

$$\lambda'_2 = 435 \pm 10 \text{ nm} \quad \lambda_2 = 457 \pm 10 \text{ nm}$$

30 $\lambda'_3 = 475 \pm 10 \text{ nm} \quad \lambda_3 = 497 \pm 10 \text{ nm}$

Para dos longitudes de onda:

$$\lambda'_1 = 415 \pm 10 \text{ nm} \quad \lambda_1 = 437 \pm 10 \text{ nm}$$

$$\lambda'_2 = 435 \pm 10 \text{ nm} \quad \lambda_2 = 457 \pm 10 \text{ nm, o}$$

$$\lambda'_1 = 435 \pm 10 \text{ nm} \quad \lambda_1 = 457 \pm 10 \text{ nm}$$

35 $\lambda'_2 = 475 \pm 10 \text{ nm} \quad \lambda_2 = 497 \pm 10 \text{ nm}$

Fluorescencia sincrónica

La expresión "fluorescencia sincrónica" se refiere a un proceso fluorimétrico bien conocido por un experto en la materia, en el que los dos monocromadores para recibir la luz emitida y de excitación se mueven simultáneamente para medir un conjunto de señales que se corresponden con la luz de excitación y emisión, cuyas longitudes de onda se fijan

por separado para cada uno mediante un intervalo constante, por ejemplo, 30 nm. En particular, la fluorescencia sincrónica es definida por Lloyd (1971) "Synchronised excitation of fluorescence emission spectra" *Nature physical Science* 231:64-5 y por Ficheux y col (1991) "La spectrofluorescence synchrone: théorie et applications" *Toxicorama* 3:1:8-13.

5 En el procedimiento definido anteriormente en este documento, las dos o tres intensidades de fluorescencia pueden medirse mediante fluorescencia sincrónica o, una vez que se han determinado las longitudes de onda de excitación y emisión, midiendo simplemente las dos o tres intensidades de luz emitida por las longitudes de onda de emisión determinadas en respuesta a las longitudes de ondas de excitación dadas.

10 Por tanto, λ_1 , λ_2 y, opcionalmente, λ_3 pueden determinarse mediante fluorescencia sincrónica como puntos que marcan variaciones en la pendiente del espectro sincrónico, en particular puntos de inflexión o puntos de rotura en la pendiente del espectro sincrónico.

15 Se entenderá que un punto de rotura de la pendiente marca el límite entre una nueva pendiente, lo cual es estadísticamente diferente de la original definida por los valores precedentes y un valor medio de la pendiente en los puntos precedentes del pico; la asignación también debe hacerse por la variabilidad de los puntos alrededor de esta media.

Más específicamente, si se toman tres longitudes de onda como la base, λ_2 representa una longitud de onda de emisión para la que se observa un pico de intensidad de emisión de fluorescencia, estando este pico rodeado por dos puntos de inflexión o de rotura del gradiente que se corresponden con λ_1 y λ_3 .

20 La manera en la que se determinan las longitudes de onda λ_1 , λ_2 , λ_3 , λ'_1 , λ'_2 y λ'_3 para un espectro de fluorescencia sincrónica se establece en el ejemplo siguiente para el caso en particular de Picogreen®. Brevemente, λ_1 , λ_2 y λ_3 pueden, más específicamente, corresponder respectivamente:

- a un punto de inflexión de una curva simple que representa el espectro de fluorescencia sincrónico de una solución de ácido nucleico y el fluoróforo si la lectura se toma usando un fluorímetro SHIMADZU tipo RF 535.

25 - a una rotura en el gradiente de una curva simple que representa el espectro de fluorescencia sincrónico de una solución de ácido nucleico y el fluoróforo si la lectura se toma usando un fluorímetro SAFAS tipo Xenius.

Ventajosamente, el procedimiento según la invención permite limitar o prevenir el fenómeno de interferencia de Rayleigh.

30 Alternativamente, si se toma dos longitudes de onda como la base, λ_1 o λ_2 representa una longitud de onda de emisión para la cual se observa un pico de intensidad de emisión de fluorescencia y la otra representa una longitud de onda de emisión para la cual se observa un punto de inflexión o un punto de rotura en la pendiente que precede o sigue directamente a dicho pico de intensidad de emisión. La elección de λ_1 y λ_2 se muestra en las figuras 15 y 16. Preferiblemente, un valor de λ_1 y λ_2 representa una longitud de onda de emisión para la cual se observa un pico de intensidad de emisión de fluorescencia y la otra representa una longitud de onda de emisión para la que se observa un punto de inflexión o un punto de rotura de la pendiente precediendo directamente a dicho pico de intensidad de emisión.

35 Aunque el uso de sólo dos longitudes de onda es menos preciso que el uso de tres longitudes de onda, esto también permite limitar o prevenir el fenómeno de interferencia de Rayleigh mientras que, al mismo tiempo, es más fácil de realizar.

Fluorímetro

40 Con respecto al fluorímetro según la invención, la potencia de la bombilla de excitación es preferiblemente aquella que permite, a las longitudes de onda de excitación, leer una concentración baja de ADN, de aproximadamente 2,5 ng/ml, con una precisión de menos del 10%. Preferiblemente el ancho de banda del monocromómetro utilizado no excede de +/-5 nm. La luz de emisión, en particular la emitida a 90° en relación con la dirección de la luz de emisión, se captura preferiblemente mediante un sistema adecuado y se dirige hacia un monocromómetro de emisión para seleccionar las longitudes de onda específicas para la medida.

45 El valor de F se calcula preferiblemente mediante el ordenador usando un algoritmo almacenado en su memoria. Además, el fluorímetro según la invención está equipado preferiblemente con un sistema que permite el almacenamiento de datos, tales como las curvas de calibración para cada grupo de medición. También preferiblemente, el fluorímetro según la invención proporciona la cantidad de ácido nucleico contenido en la muestra tras el cálculo y usando las curvas de calibración almacenadas.

50 Además, el fluorímetro según la invención está preferiblemente equipado con un sistema para mostrar los resultados y también un sistema para generar y exportar los datos, tales como una impresora (o una instalación para conectar una impresora). Además, también preferiblemente, el fluorímetro es capaz de mezclar las muestras y cualquier reactivo, y también transferirlos a un recipiente de lectura en el cual se realizará la medida. El fluorímetro de la invención posee, preferiblemente, un teclado numérico o alfanumérico que permite introducir, por ejemplo, un identificador de un

paciente a partir del cual se originan una o más muestras en las que se va a calcular la cantidad de ácido nucleico incluida en las mismas; al final del análisis, puede incluirse este identificador en un informe impreso usando la impresora. Además, es posible equipar el fluorímetro con un sistema que permite la lectura de un código de barras que lleva el recipiente que contiene la muestra que se va a analizar. Si la muestra está contenida en un recipiente que permite la medición utilizando el fluorímetro, tal como una cubeta según la invención, el código de barras puede incluir al menos un número de lote de producción para el recipiente. Este número puede también estar indicado en el informe impreso usando la impresora al final de análisis.

El fluorímetro de la invención esta preferiblemente equipado con al menos un medio de suministro de corriente eléctrica, por un cable o mediante una batería (dentro de un uso móvil) y también al menos con un medio de conexión a un sistema informático. Si el fluorímetro está equipado con diversos medios de conexión, estos medios de conexión serán preferiblemente de varios estándares diferentes. Dentro de su uso móvil, el fluorímetro es preferiblemente tan compacto como sea posible, por ejemplo teniendo las siguientes dimensiones: H<15 cm; L<25 cm; W<20 cm, y tan ligero como sea posible de modo que sea capaz de instalarse, sin inconvenientes para el usuario, por ejemplo, en las mesas de un laboratorio y sea capaz de moverse fácilmente.

Finalmente, el fluorímetro está preferiblemente equipado con un sistema que permite la transferencia y mezcla de los reactivos, en particular si dicho sistema se usa con una cubeta según la invención.

Cubeta

La cubeta según la invención comprende todo el equipo y reactivos necesarios para el proceso según la invención, es decir, el fluoróforo, opcionalmente un diluyente, un recipiente de medición, un sistema para recoger la muestra y cualquier cosa indispensable para realizar el proceso de forma eficaz.

Con respecto a la cubeta según la invención, se utilizan ventajosamente, materiales flexibles que permiten la mezcla de los diversos reactivos contenidos en la cubeta (muestra, tampón, fluoróforo) que se van a mezclar, por ejemplo, mediante presión-vacío y presión mecánica.

Los diversos compartimentos de la cubeta (pocillos, depósitos, recipientes) están conectados preferiblemente mediante capilares y el paso de un compartimento a otro se produce preferiblemente presionando, por ejemplo, el depósito del tampón, el depósito del fluoróforo y/o el depósito de estandarización. El paso del tampón a través del depósito del fluoróforo permite que se diluya el fluoróforo y la mezcla, como un todo, se lleva hacia el recipiente. La muestra, la cual puede o no haberse diluido de antemano, puede depositarse en el pocillo de la cubeta antes o después de que ésta se coloque en el fluorímetro. Preferiblemente, un volumen de muestra preciso se deposita en el pocillo, a continuación, una cantidad óptimamente determinada de la muestra se dirige, a través de la vía del depósito de estandarización, hacia el recipiente para que se mezcle allí con el fluoróforo. La mezcla en el recipiente puede llevarse a cabo entonces, por ejemplo, sometiendo al recipiente a presión-vacío o presión mecánica. La cubeta según la invención es ventajosa debido a que permite la mezcla extemporánea del fluoróforo en una solución concentrada y del tampón para llegar a la dilución final la cual es óptima para la fluorescencia; esto también permite la homogeneización del fluoróforo y de la muestra y también, si es apropiado, la dilución adecuada de la muestra y medir la fluorescencia emitida.

Descripción de las figuras

Figura 1: espectro de fluorescencia sincrónica del ADN contenido en el plasma diluido a 1/100. El eje y representa la intensidad de fluorescencia (IF) y el eje x representa la longitud de onda de emisión (en nm).

Figura 2: intensidad de fluorescencia del ADN en el plasma de un paciente sano con una dilución en 1/4.000 de Picogreen® en tampón TBE 1X (pH 8,4), delta-lambda = 50 nm. Los plasmas se diluyen 1/100. El eje y representa la intensidad de fluorescencia (IF) y el eje x representa la longitud de onda de emisión (en nm).

Figura 3: intensidad de fluorescencia del ADN en el plasma de un paciente enfermo con una dilución en 1/4.000 de Picogreen® en tampón TBE 1X (pH 8,4), delta-lambda = 50 nm. Los plasmas se diluyen a 1/100. El eje y representa la intensidad de fluorescencia (IF) y el eje x representa la longitud de onda de emisión (en nm).

Figura 4: intensidad de fluorescencia del ADN en el plasma de un paciente sano con una dilución en 1/20.000 de Picogreen® en tampón TBE 1X (pH 8,4), delta-lambda = 50 nm. Los plasmas se diluyen a 1/100. El eje y representa la intensidad de fluorescencia (IF) y el eje x representa la longitud de onda de emisión (en nm).

Figura 5: intensidad de fluorescencia del ADN en el plasma de un paciente enfermo con una dilución en 1/20.000 de Picogreen® en tampón TBE 1X (pH 8,4), delta-lambda = 50 nm. Los plasmas se diluyen a 1/100. El eje y representa la intensidad de fluorescencia (IF) y el eje x representa la longitud de onda de emisión (en nm).

- Figura 6: intensidad de fluorescencia del ADN plasmática en tres longitudes delta-lambdas diferentes (50 nm, 35 nm y 30 nm), tampón TBE1X (pH 8,4). El eje y representa la intensidad de fluorescencia (IF) y el eje x representa la longitud de onda de emisión (en nm).
- 5
Figura 7: linealidad de la intensidad de fluorescencia (eje y, cualquier unidad deseada) en función de la concentración del ADN (eje x, ng/ml).
- Figura 8: correlación entre la concentración de ADN medida usando un fluorímetro sincrónico (eje y, número de copias/ml) y usando PCR en tiempo real (eje x, número de copias/ml) sobre el ADN extraído usando kits a partir de pacientes que sufrían cáncer de próstata, tampón TBE 1X (pH 8,4) Picogreen® diluido a 1/20.000.
- 10
Figura 9: relación entre el número de copias medido mediante PCR en tiempo real y el que se mide mediante fluorimetría sincrónica en función del número de copias obtenidas mediante PCR en tiempo real, a partir de los resultados representados en la Fig. 8.
- 15
Figura 10: correlación entre la concentración de ADN medida usando fluorimetría sincrónica (eje y, número de copias/ml) y usando PCR en tiempo real (eje x, número de copias/ml) sobre el ADN extraído usando kits a partir de pacientes que sufren cáncer de próstata, tampón TBE 1X (pH 8,4), Picogreen® diluido a 1/20.000; sólo se ha conservado las concentraciones del ADN extraído de pacientes en los cuales el número de copias de genoma/ml es mayor de 100 en relación con los resultados presentados en la Fig. 8.
- 20
Figura 11: correlación entre la concentración de ADN medido usando PCR en tiempo real (eje y, número de copias/ml) y usando un fluorímetro sincrónico (eje x, número de copias/ml) sobre el ADN purificado a partir de pacientes que sufrían cánceres de próstata y colon, tampón TBE 1X (pH 8,4) Picogreen® diluido 1/20.000.
- 25
Figura 12: correlación entre la concentración de ADN medido usando PCR en tiempo real (eje y, número de copias/ml) y usando un fluorímetro sincrónico (eje x, número de copias/ml) sobre el ADN plasmático obtenido, sin preparación de la muestra, a partir de pacientes que sufrían cáncer de próstata y tenían un número de copias de genoma/ml mayor de 100. Tampón TBE 1X (pH 8,4), Picogreen® diluido a 1/20.000.
- 30
Figura 13: correlación entre la concentración de ADN medido usando un fluorímetro sincrónico (eje y, número de copias/ml) y usando fluorimetría de tres longitudes de onda o diferencial (eje x, ng/ml) sobre el ADN plasmático obtenido, sin preparación de la muestra, a partir de pacientes que sufrían cáncer de próstata, tampón TBE 1X (pH 8,4) Picogreen® diluido a 1/20.000.
- 35
Figura 14: espectro sincrónico de ADN en un plasma con una dilución a 1/20.000 de Picogreen®, tampón TBE 1X (pH 8,4) medido usando un espectrofluorímetro RF 535 de Shimadzu (curva superior) y un espectrofluorímetro Safas Xenius (curva inferior). Los plasmas se diluyen a 1/100. El eje y representa la intensidad de fluorescencia (IF) y el eje x representa la longitud de onda de emisión (en nm). Se representan los procedimientos gráficos para determinar λ_1 , λ_2 y λ_3 .

Las Figuras 15 y 16 representan ejemplos de determinación de fluorescencia (F) con el procedimiento según la invención usando intensidades de fluorescencia (I_1 , I_2) en dos longitudes de onda.

40 La invención se describirá en mayor detalle con referencia al ejemplo siguiente simplemente mediante ilustraciones y sin que suponga ninguna limitación.

EJEMPLO

EQUIPO

45 Plasmas o sueros recogidos en tubos herparinizados o con EDTA a partir de la sangre completa centrifugada y, a continuación, decantados; tampones TBE 1X (pH 8,5) (Tris 90 nM, ácido bórico 90 nM, EDTA 2 mM), tubos de polietileno para hemólisis, recipientes acrílicos, fluorímetro sincrónico (lector Shimadzu RF 535, analizador de datos DR-3), Picogreen® (kit de cuantificación de ADNds, Molecular Probes); ADN patrón de concentración conocida para el intervalo patrón.

PROCEDIMIENTO**A. Principio del fluorímetro sincrónico****a) Dificultades asociadas con la fluorimetría convencional**

5 La principal dificultad a menudo asociada con la detección fluorimétrica convencional está relacionada con la dispersión de Rayleigh como resultado de la proximidad de las longitudes de onda de excitación y emisión. Este efecto puede ser especialmente intenso en el caso de análisis de medios complejos y proteínados, con el suero sanguíneo.

Cuando se determina un espectro de fluorescencia convencional, uno de los monocromadores realizará el barrido del espectro mientras que el segundo permanece fijo. Para producir un espectro de emisión, se elige una longitud de onda de excitación (480 nm para Picogreen®) y el monocromómetro que selecciona la luz reemitida realizará el barrido por encima de este límite, por ejemplo, de 480 a 620 nm.

10 Cuando, al inicio de la medición, los dos monocromadores se fijan a la misma longitud de onda, el monocromómetro de emisión recibe del recipiente que contiene la muestra una señal lumínica muy potente correspondiente a la luz dispersada por la molécula de los compuestos en solución. Durante la dispersión, la luz que es ligeramente policromática, tiene al menos la misma longitud de onda que la luz de excitación y, por tanto, interfiere con la medida de la intensidad de la luz de emisión. De hecho, en el fenómeno de la fluorescencia, la luz de excitación no es
15 monocromática, sino más bien, se corresponde con un conjunto de longitudes de onda seleccionadas por el monocromador de excitación: una luz monocromática irradiará el recipiente de lectura. A continuación, la luz de fluorescencia emitida por la muestra en solución es policromática y se corresponde con un conjunto de longitudes de onda. Esta luz dispersada será seleccionada por el monocromador de emisión y se medirá. Cuando los dos monocromadores, el monocromador de excitación y el monocromador de emisión, se establecen a la misma longitud de
20 onda, se medirán los dos tipos de luz, la luz dispersada y la luz de emisión. Es imposible medir la intensidad de la luz de emisión. Esto es la interferencia de Rayleigh.

25 Esta luz dispersada tiene una intensidad mucho mayor que la de la luz emitida mediante fluorescencia y es, por tanto, capaz de enmascarar a esta, haciendo, de este modo, que cualquier determinación sea arbitraria, o incluso, imposible. Es necesario medir la intensidad de la luz emitida a una longitud de onda suficientemente alejada de la longitud de onda de excitación como para que esta interferencia no cause problemas. Por tanto, es imposible en estas condiciones medir con precisión una señal derivada de longitudes de onda relativamente muy próximas.

Para eliminar este fenómeno parásito en la convencional fluorescencia es necesario:

- o bien reducir la anchura de las ranuras ópticas con el fin de reducir la cobertura de las mismas (aunque esto reduce la intensidad de los haces de luz y, por tanto, necesariamente la sensibilidad del análisis);
- 30 - o desplazar la longitud de excitación (aunque esto reduce el rendimiento de fluorescencia de la molécula excitada y, por tanto, de nuevo, reduce la sensibilidad del análisis).

b) Contribución del fluorímetro sincrónico**Principio del procedimiento**

35 Durante la producción de un espectro sincrónico, los espectrofluorímetro mueven los dos monocromadores simultáneamente. En este caso, ya no se trata de una cuestión de producir un espectro de excitación o un espectro de emisión, sino más bien de medir un conjunto de señales correspondientes a la luz de excitación y a la luz de emisión, cuyas longitudes de onda se han establecido por separado una con respecto a la otra a un intervalo constante (denominado delta-lambda; 30 nm en el presente caso).

Ventajas40 **1) Eliminación de la interferencia resultante de la dispersión de Rayleigh**

Los dos monocromadores barrerán el espectro mientras se mueven a la misma velocidad, a menudo con un intervalo constante. En este caso, ya no es posible que haya problemas con la dispersión de Rayleigh, ya que los monocromadores nunca estarán en la misma longitud de onda. Una cobertura parcial de las ranuras en los sistemas de excitación y emisión puede producir una interferencia residual. Sin embargo, la intensidad de esta interferencia es prácticamente constante durante el análisis y aparece como un fondo lineal en el espectro. Esta se elimina fácilmente durante la medición, de la altura de la señal específica mediante el procedimiento de la tangente.

45 **2) Reducción del ancho de la banda**

Si las longitudes de excitación y emisión utilizadas durante la medición son longitudes de onda que permiten el rendimiento de fluorescencia máximo, la intensidad reemitida estará en un pico. Por otro lado, al alejarse de estas longitudes de onda, la intensidad de la luz reemitida es más débil debido a que la intensidad de la luz absorbida disminuye durante la excitación y el rendimiento de fluorescencia disminuye durante la emisión. Durante la fluorescencia
50

sincrónica, los dos fenómenos se suman y las variaciones en la luz reemitida son mayores. Esto lleva a una reducción del ancho de la banda de emisión a lo largo del espectro en relación a la obtenida en un espectro convencional.

B. Medición de la fluorescencia específica a tres longitudes de onda

5 El comentario anterior permite extrapolar una técnica derivada de la técnica de fluorescencia sincrónica. Los inventores han encontrado en varios cientos de mediciones de ADN tomadas de otros tantos pacientes enfermos diferentes, que la bajada observada en el espectro sincrónico se presentaba siempre y, especialmente, siempre tenía un mínimo a la misma longitud de onda.

10 Por tanto, pueden destacarse tres puntos importantes en el espectro sincrónico mostrado en la fig. 1: los dos puntos de inflexión "I₁" en 504 nm y "I₃" en 570 nm. La intensidad de fluorescencia "F" (en unidades arbitrarias) se calcula uniendo los dos puntos I₁ y I₃, a continuación, la intensidad de fluorescencia se determina en el pico de emisión en 526 nm midiendo la propia altura del pico hasta la intersección de la línea recta "I₁I₃". La altura de la línea por debajo de la línea recta I₁I₃ se corresponde con la señal de interferencia debida a la dispersión de Rayleigh y no se mide.

Esta técnica que es conocida como la técnica de la tangente permite eliminar el ruido de fondo debido a la dispersión de Rayleigh y da una muy buena aproximación de la señal de fluorescencia.

15 Por tanto, los inventores concluyeron a partir de esto que era posible desarrollar una nueva técnica sólo a estas tres longitudes de onda de emisión de fluorescencia.

Por tanto, se toman las siguientes mediciones:

Emisión I₁: λ'₁=472 nm λ₁=502 nm

Emisión I₂: λ'₂=496 nm λ₂=526 nm

20 Emisión I₃: λ'₃=538 nm λ₃=568 nm

A continuación, es necesario extrapolar el valor de fluorescencia "I_R" debido al efecto de Rayleigh a la longitud de onda de lectura principal (λ₂ = 526 nm). Esta fluorescencia se calcula en función de las mediciones I₁ e I₃. Como el pico de fluorescencia no es perfectamente simétrico, la fluorescencia I_R se calculará según la fórmula siguiente:

$$(0,6 \times I_1) + (0,4 \times I_3) = I_R$$

25 A continuación, la fluorescencia específica del ADN "F" se calculará en función de la medición I_R en la longitud de onda principal de la manera siguiente:

$$F = I_2 - I_R$$

En la fig. 14 se muestra que este procedimiento de determinación de la fluorescencia puede generalizarse independientemente del espectrofluorímetro utilizado.

C. Modo de operar

Preparación de Picogreen®

La solución madre de Picogreen® diluida 50 veces en una mezcla al 50% de etanol/TBE (v/v) se alícuota (120 µl) en tubos Eppendorf® y, a continuación, se mantiene en un congelador a -20°C en ausencia de luz.

Diseño del experimento

35 Los plasma alícuotados conservados en el congelador (a -20°C) se descongelan y se llevan a la temperatura ambiente del laboratorio (entre 15 y 25°C) y, a continuación, se diluyen (por un factor de 10 a 300) en el tampón TBE 1X (volumen final = 450 µl). Estas diluciones se conservan en hielo hasta el análisis.

40 Se pipetea 40 ml del tampón TBE 1X y, a continuación, se añaden a estos 100 µl de Picogreen® descongelado extemporáneamente (lo que resulta en un factor de dilución final de 20.000), conservándose la mezcla en hielo en ausencia de luz.

El espectrofluorímetro se enciende al menos de 20 a 30 minutos antes del inicio de las mediciones programadas como sigue:

- el monocromador escaneará de 400 a 600 nm durante la excitación,
- el monocromador escaneará de 430 a 630 nm durante la emisión.

45 Para obtener todas las mediciones, se adopta el siguiente procedimiento:

- Se toman 1,9 ml de Picogreen® diluido a 1/20.000 y se transfieren a un tubo de hemólisis que se coloca en ausencia de luz en la mesa de trabajo;

- A continuación, se añaden 100 µl de la dilución de plasma/suero (volumen final = 2 ml), la mezcla se agita durante 8 a 12 segundos y se deja durante 2 a 3 minutos en la mesa de trabajo, tras lo cual la mezcla se bombea rápidamente dentro de una cubeta acrílica para empezar el registro del espectro.

Siempre se hace un intervalo estándar en base al ADN patrón de concentración conocida proporcionado con el Picogreen®, siendo los puntos del intervalo seleccionados: 2,5 ng; 25 ng y 50 ng/ml.

Nota: el tampón TBE 1X se preparará al menos 24 h antes de las mediciones y se mantendrá en la mesa de trabajo ya que esto reduce significativamente el fenómeno de dispersión de Rayleigh.

D. Resultados

A. Perfeccionamiento de las condiciones experimentales

1. Elección del tampón

Como Picogreen® se fija a la doble hélice de ADN, entre las bases, la naturaleza del tampón influirá sobre la señal de fluorescencia. Por tanto, se probaron varios tipos de tampones que se encuentran normalmente en los laboratorios.

- Tampón TBE 1X (tris(hidroximetilamino)aminometano 1 M, EDTA 0,1 mM, pH = 7,5): tampón convencional para el uso de Picogreen®.

- Tampón fosfato monopotásico 10 mM, pH = 7,8: el tampón fosfato tiene una fluorescencia significativa que hace imposible medir las concentraciones de ADN presentes en los patrones o en el plasma con la precisión adecuada.

- Tampón TBE 1X (tris(hidroximetilamino)aminometano 90 mM, ácido bórico 90 mM, EDTA 2 mM, pH = 8,5); el tampón TBE 1X tiene una ligera fluorescencia residual pero, en particular, no tiene un pico de fluorescencia en la longitud de onda probada. Por tanto, su uso es ventajoso para el análisis según la invención.

2. Elección del pH

Los tres tampones anteriores se probaron a diversos pH: 5, 5,5, 6, 6,5, 7, 7,5, 8 y 8,5.

Las variaciones de pH en estas zonas no modifican el espectro de fluorescencia.

3. Elección de la dilución de reactivo: Picogreen®

Las técnicas fluorimétricas se realizan en un medio extremadamente diluido con el fin de limitar el fenómeno de interferencia convencional: autoinhibición, inactivación, debilitamiento de la señal y competencia, a lo cual se añade la dispersión de Rayleigh.

Los inventores determinaron la menor concentración de reactivo que proporciona la señal más intensa.

Se probaron las siguientes concentraciones de Picogreen®: 1/100, 1/250, 1/500, 1/1.000, 1/2.000, 1/4.000, 1/8.000, 1/12.000, 1/20.000.

Una dilución mayor da señales de intensidad más débiles. Una dilución excesivamente concentrada proporciona señales que son mucho menos reproducibles y no crecen de forma proporcional a la concentración de ADN probada.

Las señales son detectables a partir de una dilución de 1/4.000, aunque la técnica carece de sensibilidad. En esta dilución no es posible distinguir entre un plasma control (fig. 2) y el plasma de un paciente enfermo (fig. 3).

Los mejores resultados se obtienen a una dilución de 1/20.000 de Picogreen®. A esta dilución del reactivo, la técnica parece sensible y lineal y es posible distinguir entre un plasma control (fig. 4) y el plasma de un paciente enfermo (fig. 5).

4. Elección de la dilución de plasma

Para evitar la interferencia asociada con la matriz biológica es importante trabajar con muestras que estén lo mayormente diluidas posible. Se usaron plasmas diluidos a 1/20, 1/50, 1/100, 1/150, 1/200, 1/300, 1/400.

Los mejores resultados se obtienen con plasmas diluidos a 1/100.

No se observó dispersión de la luz asociada con la turbidez de los plasmas, incluso en el caso de plasmas opalescentes o turbios, o asociada con hemólisis, ictericia o hiperproteidemia.

Esta dilución permite que los plasmas control se midan con la precisión adecuada.

5. Elección de la diferencia de longitud de onda entre la luz de excitación y la luz de emisión

5 Los picos de longitudes de onda de excitación y emisión máximas propuestas por el fabricante de Picogreen® son 485 y 530, respectivamente. Las elecciones de estas longitudes de ondas y de su diferencia de 45 nm pueden ser debidas a las propiedades de las moléculas, aunque también a las tensiones materiales asociadas con la dispersión de la luz en el recipiente de lectura. La elección de una diferencia de 45 nm puede originarse en las tensiones técnicas asociadas con la gran mayoría de los fluorímetros que sólo son capaces de limitar la interferencia de Rayleigh cuando las longitudes de onda de excitación y de emisión están separadas por 40 nm.

10 Si este fuera el caso, no se observarían picos de longitudes de onda de fluorescencia máximas sino longitudes de onda comprometidas entre la mejor sensibilidad y la mínima interferencia.

El uso de fluorescencia sincrónica, mientras que limita considerablemente la interferencia de Rayleigh, permite que puedan usarse moléculas que tienen un pico de longitudes de onda de fluorescencia máximas pudiendo estar separadas por menos de 10 nm.

Por tanto, se probaron diferencias de 20, 25, 30, 35, 40, 45, 50 y 55 nm.

15 La mejor sensibilidad se obtuvo con una diferencia entre la longitud de onda de excitación y la longitud de onda de emisión de 30 nm (fig. 6).

6. Estabilidad de Picogreen® con el tiempo

La repetibilidad de las determinaciones es la siguiente:

Conc. ng/ml	5
Media	4,5
Desviación típica	0,026
CV %	0,59
CV % = (desviación típica/media) x 100	

20 Su reproductibilidad es la siguiente:

Conc. ng/ml	2	60
Media	5,1	66,85
Desviación típica	0,9	2,96
CV %	5,57	4,43

La precisión de la técnica es aceptable para su uso en biología clínica.

b. Calidad de la técnica de fluorescencia sincrónica

1. Precisión

25 La precisión incluye las pruebas de repetitividad y reproductibilidad.

Repetitividad

La prueba se realizó midiendo 10 veces el mismo día con la misma preparación de reactivos los diversos tipos de muestra.

30 Los inventores usaron tres controles de concentraciones diferentes así como dos muestras de plasma de pacientes: la primera se congeló durante una semana y la segunda se analizó como plasma fresco.

Los resultados expresados como CV% ((desviación típica/media)*100) se resumen en la tabla siguiente:

Tipo de muestra	CV %
Patrón 1 (5 ng/ml)	6,7
Patrón 2 (50 ng/ml)	2,4
Patrón 3 (100 ng/ml)	2,3
Paciente 1 (congelada) (215 ng/ml)	2,8
Paciente 2 (fresca) (1.110 ng/ml)	3.5

Reproductibilidad

La prueba se realizó analizando 20 veces en 20 días diferentes con reactivos que se reconstituyeron cada día.

5 Los inventores usaron tres patrones de concentraciones diferentes así como una muestra de plasma que se congeló en alícuotas.

Los resultados se resumen en la tabla siguiente:

Tipo de muestra	CV %
Patrón 1 (5 ng/ml)	15
Patrón 2 (50 ng/ml)	2,4
Patrón 3 (100 ng/ml)	5,9
Paciente 1 (congelada) (245 ng/ml)	4,8

2. Precisión

10 La prueba se realizó de la siguiente manera. Se analizaron dos muestras de ADN purificadas mediante una técnica fotométrica (260 nm) (corregida por la presencia de ARN o proteínas). Estos valores medidos sirven como referencia para el análisis. Estas muestras purificadas de ADN se analizaron a continuación mediante el procedimiento de fluorometría sincrónica.

En la tabla siguiente se muestra la precisión del procedimiento expresada como porcentaje de ADN encontrado en relación con el procedimiento fotométrico.

Concentración en ng/ml	% de precisión
15	102
77	106
159	93

15

3. Umbral de detección

El umbral de detección se calcula de la siguiente manera. Se midieron 20 ejemplos que contenían sólo el tampón TBE 1X. A continuación se calculó la media de estas diez determinaciones y se añadió a esta medida tres veces la desviación típica de las mediciones obtenidas.

20 El umbral medido de este modo es de 3,5 ng/ml.

4. Umbral de sensibilidad

La primera concentración de ADN detectable con la precisión adecuado del 20% es 4 ng/ml. Se encuentra que esta es relativamente satisfactoria. La concentración plasmática de un sujeto sano es de aproximadamente 2 a 6 ng/ml de ADN circulante. En el hospital, los valores patológicos son mucho elevados que estos valores normales.

5. Prueba de linealidad

A partir de 4 ng/ml de ADN, la técnica es lineal hasta al menos 5.000 ng/ml (fig. 7).

c. Calidad de la técnica que implica la medición de tres puntos de fluorescencia

5 Los resultados obtenidos por este procedimiento son idénticos en todos los puntos a los de la técnica de fluorescencia sincrónica (fig. 13).

Conclusión: estas primeras pruebas muestran que los procedimientos de fluorimetría sincrónica o los procedimientos que implican la medición de los tres puntos de fluorescencia son técnicas fiables que pueden usarse en biología clínica.

Estos resultados se comparan en este documento con los de la PCR cuantitativa.

10 d. Determinación del ADN circulante mediante el procedimiento fluorimétrico sincrónico en diversos cánceres (próstata, colon)

15 En una primera etapa, el trabajo se realizó sobre extractos idénticos de ADN para validar el procedimiento sobre extractos purificados y comprobar su relativa relevancia para el análisis de referencia: PCR cuantitativa. A continuación, en una segunda etapa, este procedimiento se validó directamente en el plasma de pacientes, siempre en comparación con la técnica de referencia.

1. Correlación de PCR frente a fluorimetría sobre el ADN extraído usando un kit en diversos cánceres

Cáncer de próstata

La correlación es excelente, aunque se observa una deformación de la nube de puntos a concentraciones bajas de ADN (fig. 8).

20 Esta deformación se analiza mediante el gráfico de la relación entre los resultados presentados en la fig. 9. Se observa una pronunciada deformación de la nube de puntos. Por debajo de un valor de 100 copias de genoma/ml, la técnica de PCR parece carecer de sensibilidad, al contrario que la fluorimetría sincrónica.

Por encima de este umbral de 100 copias de genoma/ml, la correlación sigue siendo excelente (fig. 10).

Cánceres de próstata y colon en estadios de diferenciación

25 Se tomó una segunda serie de medidas en muestras de pacientes enfermos que presentaban cánceres de próstata o cánceres de colon. Como en la serie previa, se encuentra que el umbral es de 100 copias de genoma/ml con la técnica de PCR cuantitativa (fig. 11).

2. Correlación de PCR frente a fluorimetría en ADN plasmático

30 La investigación también fue validada en muestras biológicas que no se habían sometido a preparación. Los inventores usaron plasmas congelados de pacientes que sufrían cáncer de próstata o de colon. Más especialmente, se utilizaron muestras que tenían un número de copias de genoma ≥ 100 copias/ml ($n = 32$) y el ADN se cuantificó directamente en el plasma (fig. 12).

Se observó que la correlación fue excelente y al mismo nivel que la obtenida con el ADN extraído.

35 e. Determinación del ADN circulante mediante el procedimiento que implica tres puntos de fluorescencia en diversos cánceres (próstata, colon)

Simultáneamente con la medición mediante fluorimetría sincrónica, los inventores analizaron, mediante el procedimiento que implica tres puntos de fluorescencia, la concentración de ADN circulante en cada uno de los plasmas medidos sin preparación previa del ADN (fig. 13).

40 Se encontró que la correlación fue excelente y completamente idéntica a la obtenida con fluorescencia sincrónica. Las dos nuevas técnicas para determinar el ADN circulante son, por tanto, completamente equivalentes y se correlacionan perfectamente con la técnica de referencia: PCR cuantitativa.

Discusión

45 Actualmente, la PCR cuantitativa es el procedimiento más ampliamente utilizado para medir la cantidad de ADN circulante. Sin embargo, este procedimiento es relativamente caro, especializado y poco idóneo para su uso en centros de urgencias médicas.

Debido a su propio principio, la PCR amplifica muy significativamente todo el ADN presente en la muestra. Tiene una gran dificultad para distinguir entre muestras de pacientes que presentan ligeras variaciones en su concentración de

ADN debido a que se amplificarán prácticamente en proporciones idénticas. Sin embargo, en este caso la técnica de PCR carece de sensibilidad. Los pacientes deben presentar aumentos claros en su concentración de ADN para que se distingan de los controles o para que se distingan entre ellos.

En la PCR cuantitativa, además, la fluorescencia se mide en un medio de reacción complejo el cual es rico en enzimas y macromoléculas (cebadores, fragmentos de ADN purificados, fluoróforo, etc.) con el riesgo de inducir interferencias significativas en el análisis. Es sabido que, cuanto más concentrado esté el medio, menos potente es la lectura de fluorescencia. En este contexto, los tipos principales de interferencia posibles son los siguientes:

- Autoinhibición. Puede observarse autoinhibición de la fluorescencia a concentraciones elevadas, debido al aumento en el número de colisiones entre las moléculas que disipan la energía recibida o debido a la formación de polímeros no fluorescentes.

- Inhibición de la fluorescencia o inactivación. En un medio complejo muy concentrado o heterogéneo también existe el riesgo de que se produzca un fenómeno de inhibición o inactivación de la fluorescencia, como resultado de una interacción entre la molécula de fluorescencia y el solvente u otro soluto. El rendimiento de la fluorescencia y/o su duración disminuyen. Desde un punto de vista práctico, esto significa que el compuesto es menos fluorescente cuando está en presencia de una sustancia inhibidora. Este es uno de los inconvenientes durante un análisis en un medio biológico el cual no ha sido purificado de antemano. Además, la extinción no siempre es uniforme.

- Debilitamiento (fotodecaimiento). Este es la pérdida de fluorescencia del fluorocromo debido a la hiperexcitación de la luz que lleva a la destrucción de la molécula o a la ausencia de su reacción mediante conjugación de su forma reactiva con otra molécula.

- Competición. Esta es debida a la autofluorescencia de sustancias específicas o contaminantes del vidrio.

En la PCR cuantitativa, si el ADN se analiza a aproximadamente la misma concentración que con la técnica de fluorescencia sincrónica, el fluoróforo está 1.000 veces más concentrado en este. Además, las moléculas del cebador y de las polimerasas están en las concentraciones adecuadas para interferir por sí solas con la luz emitida.

Esta elevada concentración de moléculas en el medio también promueve el efecto Rayleigh asociado con la dispersión de la luz incidente debido a las moléculas en las soluciones. Cuanto más próximas estén las longitudes de onda de excitación y emisión, que están separadas sólo por 45 nm, más sensible es este, lo que lleva a limitaciones técnicas significativas en la intensidad de la lámpara y en la elección de las ranuras de lectura.

Todos estos elementos llevan a los inventores a pensar en una nueva técnica basada en un análisis en un medio mucho más diluido.

La elección de una técnica de fluorescencia convencional aumenta considerablemente la sensibilidad del análisis y evita las fases de extracción y amplificación, que implican el mayor riesgo de interferencia, variabilidad técnica y errores de manipulación.

La elección de la fluorimetría sincrónica asegura una especificidad excelente del análisis y, permitiendo el uso de longitudes de onda de excitación y emisión máximas, permite el aumento adicional de la sensibilidad de los análisis.

La implementación de este procedimiento reveló la existencia de tres puntos clave en el espectro sincrónico. El análisis de todos los datos también asegura a los inventores la estabilidad de estos puntos. Están siempre presentes y siempre a las mismas longitudes de onda. Por tanto, se ha desarrollado una nueva estrategia de medición midiendo sólo tres intensidades de fluorescencia y desarrollando una fórmula de cálculo para medir con precisión la fluorescencia específica del ADN. Esta nueva técnica tiene las mismas excelentes cualidades analíticas que las desarrolladas en la fluorimetría sincrónica, en particular con respecto a su sensibilidad.

La mejor sensibilidad del análisis de ADN permite la detección precoz del aumento en el seguimiento de los pacientes. Esto es particularmente cierto en el caso de los ancianos (>65 años) donde parece que (datos no mostrados) los valores normales aumentan progresivamente con la edad. Esto permitirá, probablemente, que se extienda el campo de aplicación de este análisis.

Las técnicas desarrolladas son muy satisfactorias. Son muy precisas y el intervalo analizado está muy bien adaptado a los requisitos clínicos. Además, están muy bien correlacionadas con la técnica utilizada con mayor frecuencia: PCR cuantitativa en tiempo real. Las diversas correlaciones llevadas a cabo demostraron la excelente relevancia clínica de nuestros resultados. El umbral de 100 copias de genoma/ml está próximo a las 150 copias del genoma/ml que es actualmente el umbral de decisión patológica en la PCR cuantitativa. Esto se corresponde aproximadamente con 15.000 copias de genoma/ml de ADN mediante nuestra técnica, siendo este el valor que también se encuentra en la bibliografía.

Por tanto, los inventores han sido capaces de definir dos nuevas técnicas para eliminar las etapas de extracción y amplificación del ADN, y esto ha permitido una reducción considerable del tiempo de análisis a unos pocos minutos.

BIBLIOGRAFIA

- Anker P. y col. *Detection of Circulating Tumour DNA in the blood (plasma/serum) of Cancer Patients*. *Cancer Metastasis Rev* 1999, 18:65-73.
- 5 • Boddy J. L. y col. *Prospective Study of Quantitation of plasma DNA Levels in Diagnosis of Malignant versus Benign Prostate Disease*. *Clinical Cancer Res* 2005, 11:1394-1399.
- Chang C. P. *Elevated cell - free serum DNA detected in patients with myocardial infarction*. *Clin Chim Acta* 2003, 327:95-101.
- De Kok J B y col. *Detection of Tumour DNA in Serum of Colorectal Cancer Patients*. *Scand J Lab Clin Invest* 1997, 57:601-4.
- 10 • Fournié G. J. y col. *Plasma DNA as a Marker of Cancerous Cell Death: Investigation in Patients Suffering from Lung Cancer in Nude Mice Bearing Human Tumours*. *Cancer Letters* 1995, 91:221-227.
- Gal S. y col. *Quantitation of Circulating DNA in Serum of Breast Cancer Patients by Real Time PCR*. *British Journal of Cancer* 2004, 90:1211-1215.
- 15 • Greenstock C. L., y col. *Interaction of ethidium bromide with DNA as studied by kinetic spectrophotometry*. *Chem Biol Interact*. 1975, 11:441-7.
- Jahr S y col. *DNA Fragments in the blood Plasma of Cancer Patients: Quantitation and Evidence for their Origin from Apoptotic and Necrotic Cells*. *Cancer Res* 2001, 61:1659-65.
- Jung K. y col. *Increased Cell Free DNA in Plasma of Patients with Metastatic Spread in Prostate Cancer*. *Cancer letters* 2004, 205:173-180.
- 20 • Lam N. Y. y col. *Time Course of Early and Late Changes in Plasma DNA in Trauma Patients*. *Clinical Chemistry* 2003, 49:1286-1291.
- Leon S A, y col. *Radioimmunoassay for nanogram quantities of DNA*. *J Immunol Methods* 1975 9:157-64.
- Leon S. y col. *Free DNA in the Serum of Cancer patients and effects of the Therapy*. *Cancer Res*. 1977, 37:646-650.
- 25 • Mandel P, y Metais P. *Les acides nucléiques du plasma sanguin chez l'homme*. *C. R. Soc Biol* 1948, 142:241.
- Mulder J. *Rapid and simple PCR assay for quantitation of human immunodeficiency virus type 1 RNA in plasma: application to acute retroviral infection*. *J Clin Microbiol* 1994, 32:292-300.
- Shao Z y col. *P 53 Mutation in Plasma DNA and its Prognostic Value in Breast Cancer Patients*. *Clinical Cancer Res* 2001, 7:2222-2227.
- 30 • Shapiro B. y col. *Determination of Circulating DNA Levels in the Patients with Benign or malignant Gastrointestinal Disease*. *Cancer* 1983, 51:2116-2120.
- Siebert P D, y col. *Competitive PCR*. *Nature*. 1992, 359:557-8.
- Sozzi G. y col. *Analysis of Circulating Tumour DNA in Plasma at Diagnosis and Follow - up Lung Cancer Patients*. *Cancer Res* 2001, 61:4675-4678.
- 35 • Sozzi G. y col. *Quantitation of Free Circulating DNA as a Diagnostic Marker in Lung Cancer*. *Journal of Clinical Oncology* 2003, 21:3902-3908.
- Tan E. M. y col. *Deoxyribonucleic acid (DNA) and antibodies to DNA in the serum of patients with systemic lupus erythematosus*. *J Clin Invest* 1966, 45:1732-40.
- 40 • Thijssen M. A. y col. *Difference between Free Circulating Plasma and Serum DNA in Patients with Colorectal Liver Metastasis*. *Anticancer Res* 2002, 22:421-425.
- Wu T. L. y col. *Cell Free DNA: Measurement in Various Carcinomas and Establishment of normal Reference range*. *Clinica Chimica Acta* 2002, 321:77-87.
- Yap E P, y col. *Nonisotopic SSCP and competitive PCR for DNA quantification: p 53 in breast cancer cells*. *Nucleic Acids Res*. 1992, 20:145.
- 45

REIVINDICACIONES

1. Un procedimiento para determinar la cantidad de ácido nucleico presente en una muestra, en el que:
 - se añade un fluoróforo a la muestra,
 - se miden las intensidades de fluorescencia emitidas por el fluoróforo en al menos dos longitudes de onda de emisión en respuesta a las estimulaciones lumínicas en al menos dos longitudes de onda de excitación, y
 - se deduce la cantidad de ácido nucleico presente en la muestra a partir de al menos dos intensidades de fluorescencia medidas.
2. El procedimiento según la reivindicación 1, en el que el ácido nucleico es de origen natural o sintético.
3. El procedimiento según la reivindicación 1 o la reivindicación 2, en el que el ácido nucleico es ADN o ARN.
4. El procedimiento según una cualquiera de las reivindicaciones 1 a 3, en el que la muestra es de origen natural o sintético.
5. El procedimiento según una cualquiera de las reivindicaciones 1 a 4, en el que la muestra es una muestra biológica o un derivado de una muestra biológica.
6. El procedimiento según la reivindicación 5, en el que la muestra se deriva de una muestra biológica por dilución.
7. El procedimiento según una cualquiera de las reivindicaciones 1 a 6, en el que la muestra se origina a partir de un paciente que está sufriendo una situación fisiopatológica en la que puede producirse una rotura celular.
8. El procedimiento según cualquiera de las reivindicaciones 5 a 7, en el que la cantidad de ácidos nucleicos que se ha determinado es utilizado en el contexto de la caracterización de la muerte celular.
9. El procedimiento según una cualquiera de las reivindicaciones 1 a 8, en el que el fluoróforo es un agente intercalante de ácidos nucleicos.
10. El procedimiento según una cualquiera de las reivindicaciones 1 a 9, en el que el fluoróforo es Picogreen® ([N-bis-(3-dimetilaminopropil)-amino]-4-[2,3-dihidro-3-metil-(benzo-1,3-tiazol-2-il)-metiliden]-1-fenil-quinolinium]+).
11. El procedimiento según una cualquiera de las reivindicaciones 1 a 10, en el que se miden las intensidades de fluorescencia (I_1 , I_2 e I_3), emitidas por el fluoróforo en tres longitudes de onda de emisión λ_1 , λ_2 y λ_3 en respuesta a las estimulaciones de luz en tres longitudes de onda de emisión λ'_1 , λ'_2 y λ'_3 , respectivamente, con $\lambda_1 < \lambda_2 < \lambda_3$ y estando predeterminadas λ_1 , λ_2 y λ_3 .
12. El procedimiento según la reivindicación 11, en el que la cantidad de ácido nucleico se deduce del siguiente valor de F:

$$F = I_2 - \left[\frac{I_1 - I_3}{\lambda_1 - \lambda_3} \lambda_2 - \frac{\lambda_1 I_3 - \lambda_3 I_1}{\lambda_1 - \lambda_3} \right]$$

13. El procedimiento según la reivindicación 11 o la reivindicación 12, en el que el fluoróforo es Picogreen® y las longitudes de onda son las siguientes:
 - $\lambda'_1 = 472 \pm 10$ nm $\lambda_1 = 502 \pm 10$ nm
 - $\lambda'_2 = 496 \pm 10$ nm $\lambda_2 = 526 \pm 10$ nm
 - $\lambda'_3 = 538 \pm 10$ nm $\lambda_3 = 568 \pm 10$ nm

14. El procedimiento según una cualquiera de las reivindicaciones 1 a 10, en el que se miden respectivamente las intensidades de fluorescencia I_1 e I_2 , emitidas por el fluoróforo en dos longitudes de onda de emisión λ_1 y λ_2 en respuesta a las estimulaciones lumínicas en dos longitudes de onda de excitación λ'_1 y λ'_2 , respectivamente, estando predeterminadas λ_1 y λ_2 .
15. El procedimiento según la reivindicación 14, en el que la cantidad de ácido nucleico se deduce preferiblemente a partir del valor absoluto de la diferencia entre I_1 e I_2 , es decir, el siguiente valor de F:

$$F = |I_2 - I_1|$$

16. El procedimiento según la reivindicación 14 o la reivindicación 15, en el que el fluoróforo es Picogreen® y las longitudes de onda son las siguientes:

$$\lambda'_1=472\pm 10 \text{ nm} \quad \lambda_1=502\pm 10 \text{ nm y}$$

$$\lambda'_2=496\pm 10 \text{ nm} \quad \lambda_2=526\pm 10 \text{ nm o}$$

5

$$\lambda'_1=496\pm 10 \text{ nm} \quad \lambda_1=526\pm 10 \text{ nm y}$$

$$\lambda'_2=538\pm 10 \text{ nm} \quad \lambda_2=568\pm 10 \text{ nm.}$$

17. El procedimiento según la reivindicación 12 o la reivindicación 15, en el que la cantidad de ácido nucleico en la muestra se deduce a partir del valor de F usando una curva de calibración.

10 18. Fluorímetro adecuado para realizar un procedimiento como se define en cualquiera de las reivindicaciones 10 a 17, **caracterizado porque** comprende:

- uno o más sistemas para la excitación lumínica a dos y/o tres longitudes de onda de excitación λ'_1 , λ'_2 y, opcionalmente, λ'_3 ;

- uno o más sistemas para medir las intensidades de fluorescencia I_1 , I_2 y, opcionalmente I_3 , emitidas a tres longitudes de onda de emisión λ_1 , λ_2 y, opcionalmente λ_3 ;

15

- una calculadora que permite el cálculo del siguiente valor de F:

$$F = [I_2 - I_1] \text{ y/o } F = I_2 - \left[\frac{I_1 - I_3}{\lambda_1 - \lambda_3} \lambda_2 - \frac{\lambda_1 I_3 - \lambda_3 I_1}{\lambda_1 - \lambda_3} \right]$$

19. Fluorímetro según la reivindicación 18, en el que las longitudes de onda de excitación y emisión son las siguientes:

$$\lambda'_1=472\pm 10 \text{ nm} \quad \lambda_1=502\pm 10 \text{ nm}$$

$$\lambda'_2=496\pm 10 \text{ nm} \quad \lambda_2=526\pm 10 \text{ nm}$$

$$\lambda'_3=538\pm 10 \text{ nm} \quad \lambda_3=568\pm 10 \text{ nm.}$$

20

20. Fluorímetro según la reivindicación 18, en el que las longitudes de onda de excitación y emisión son las siguientes:

$$\lambda'_1=472\pm 10 \text{ nm} \quad \lambda_1=502\pm 10 \text{ nm y}$$

$$\lambda'_2=496\pm 10 \text{ nm} \quad \lambda_2=526\pm 10 \text{ nm, o}$$

$$\lambda'_1=496\pm 10 \text{ nm} \quad \lambda_1=526\pm 10 \text{ nm y}$$

$$\lambda'_2=538\pm 10 \text{ nm} \quad \lambda_2=568\pm 10 \text{ nm.}$$

25

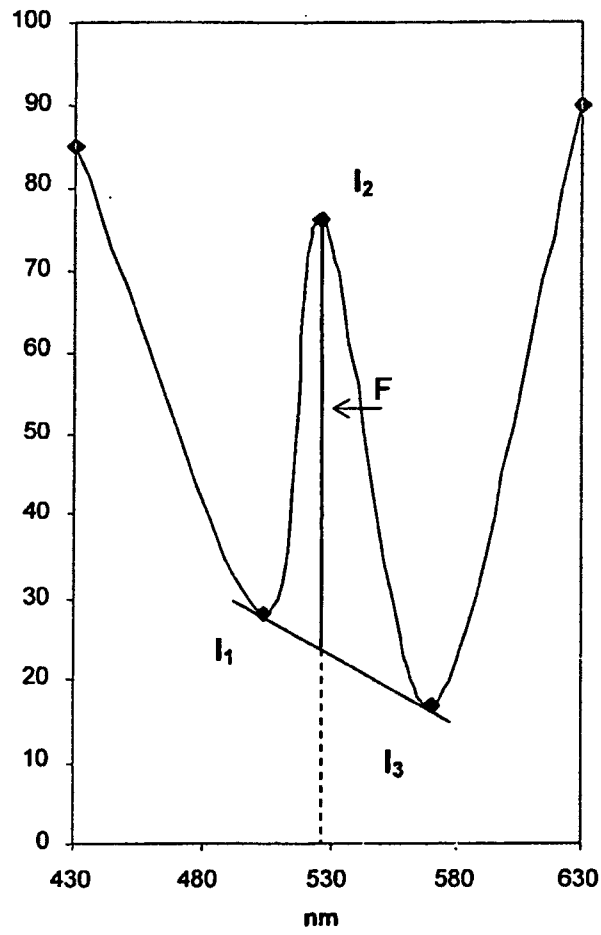


Figura 1

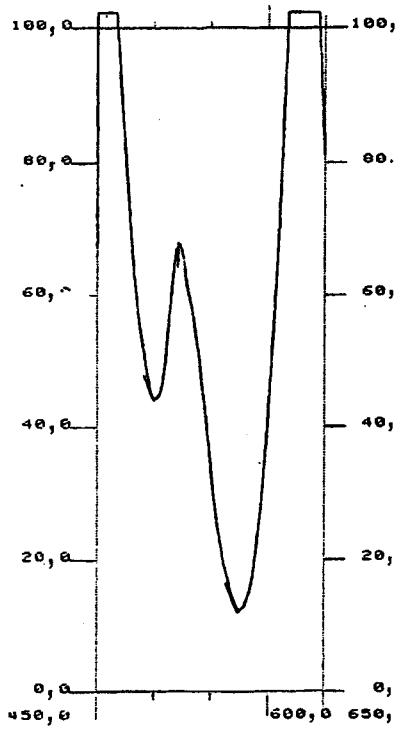


Figura 2

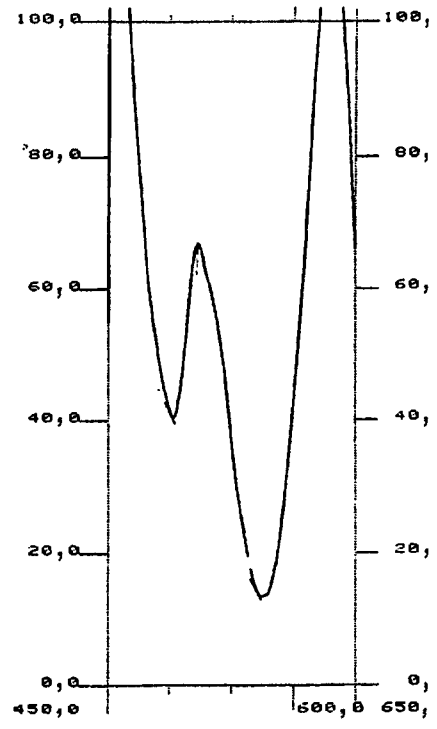


Figura 3

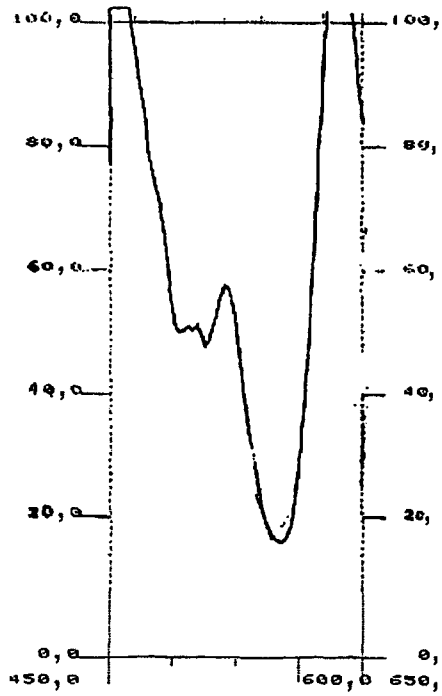


Figura 4

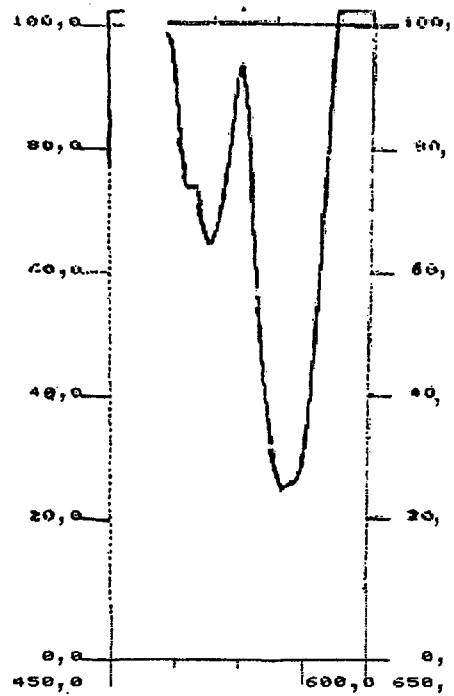


Figura 5

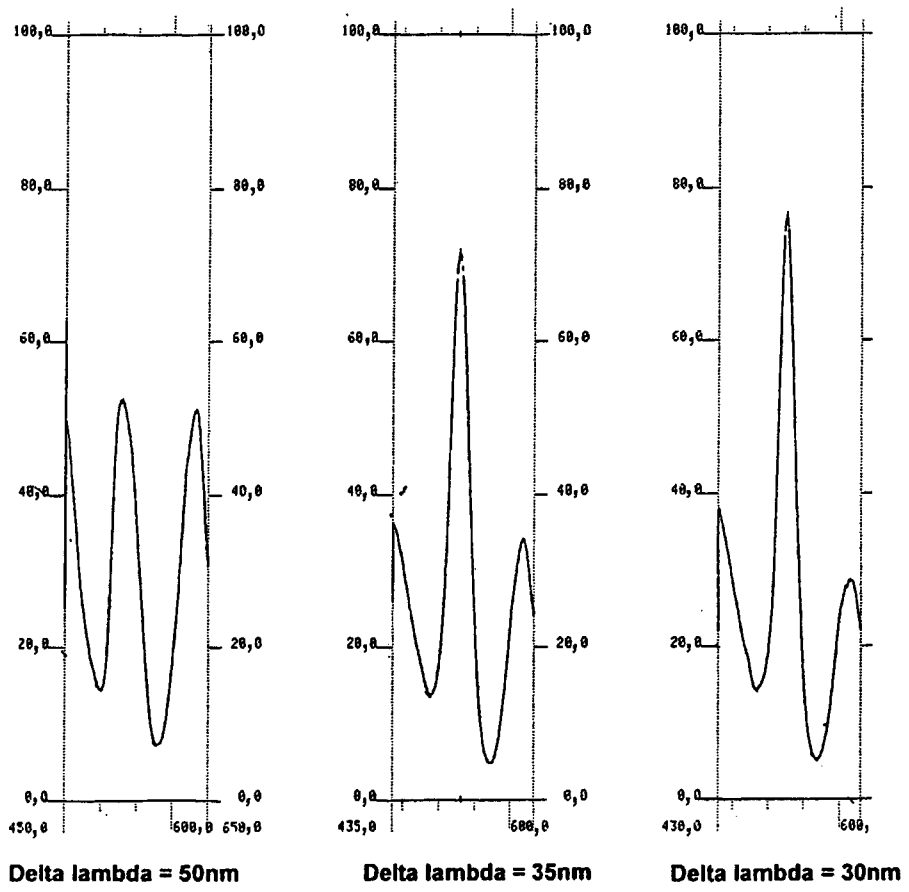


Figure 6

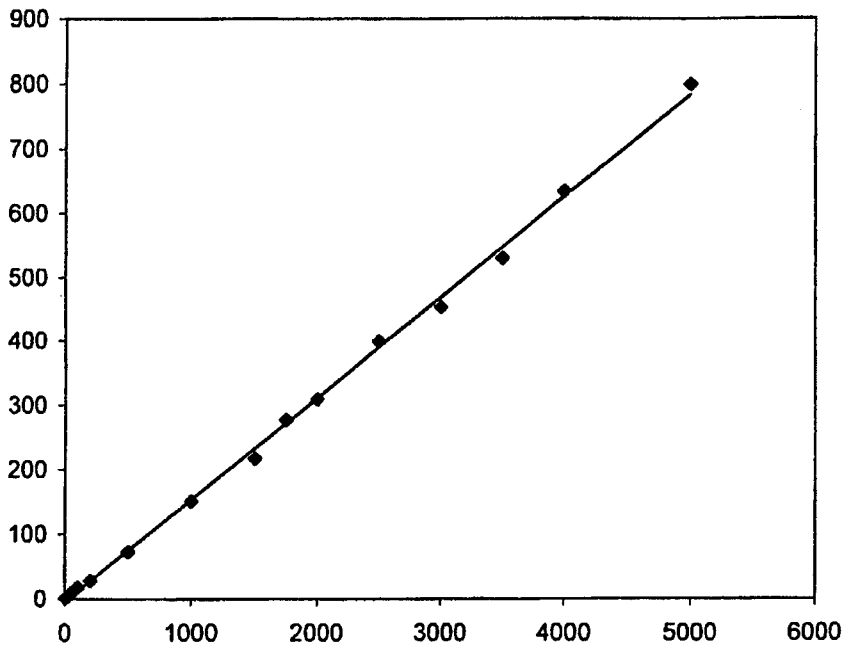


Figura 7

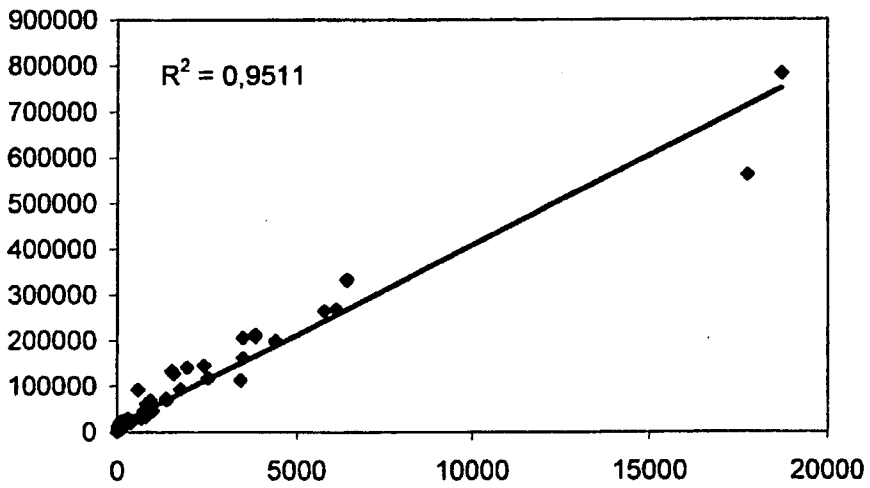


Figura 8

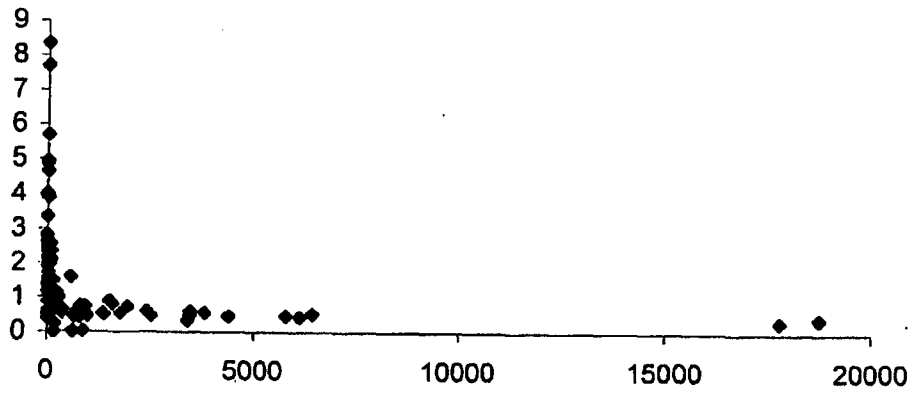


Figura 9

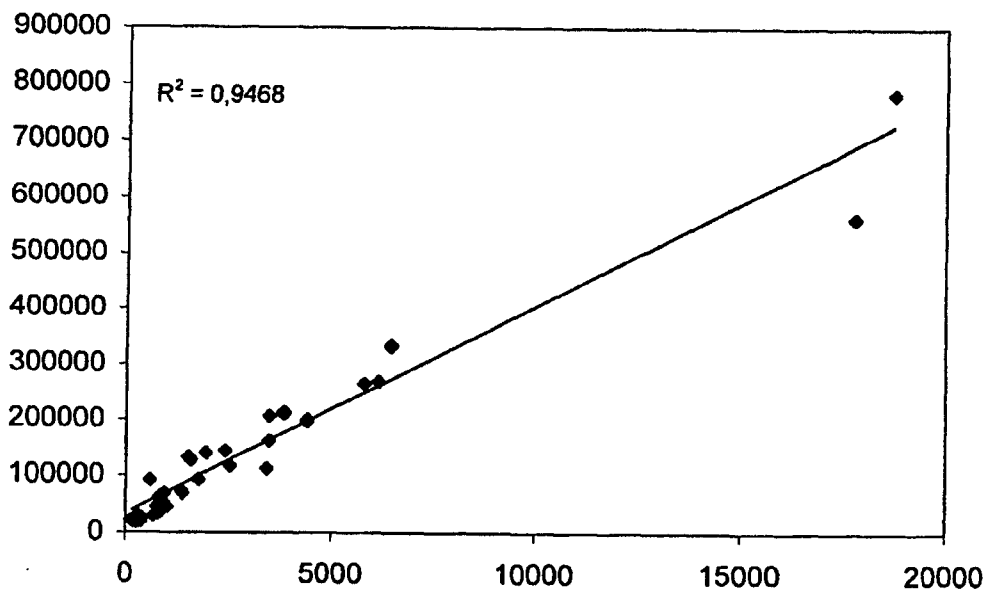


Figura 10

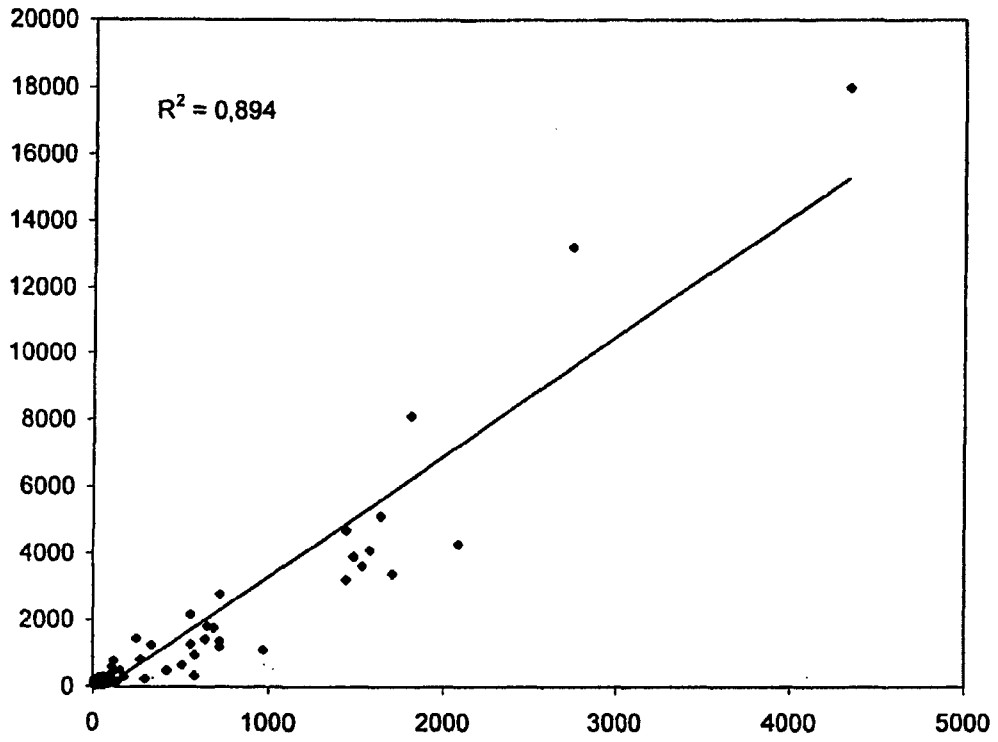


Figura 11

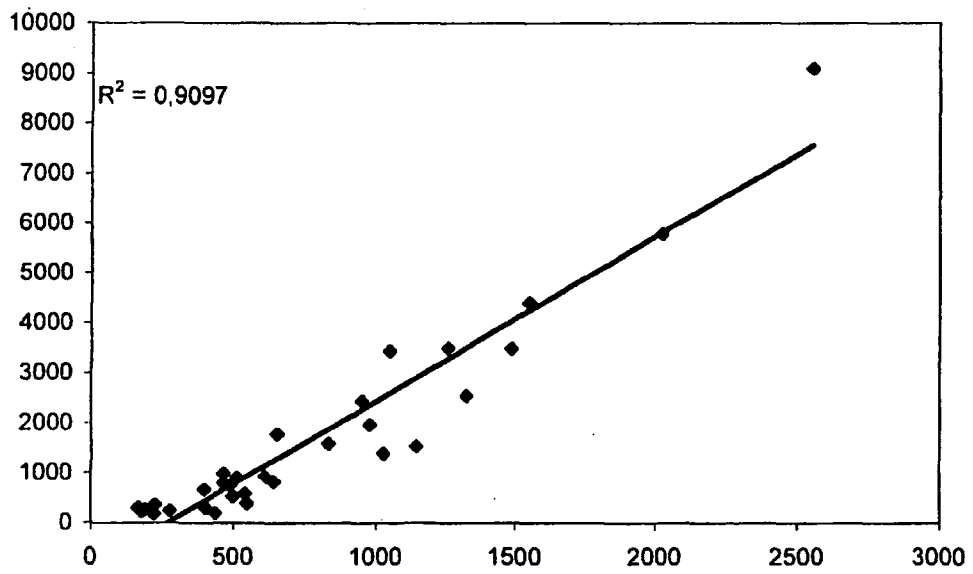


Figura 12

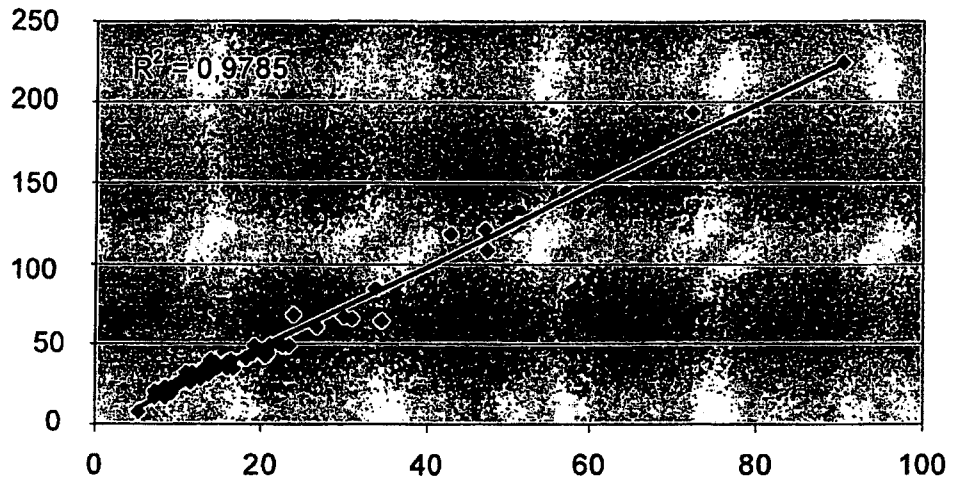


Figura 13

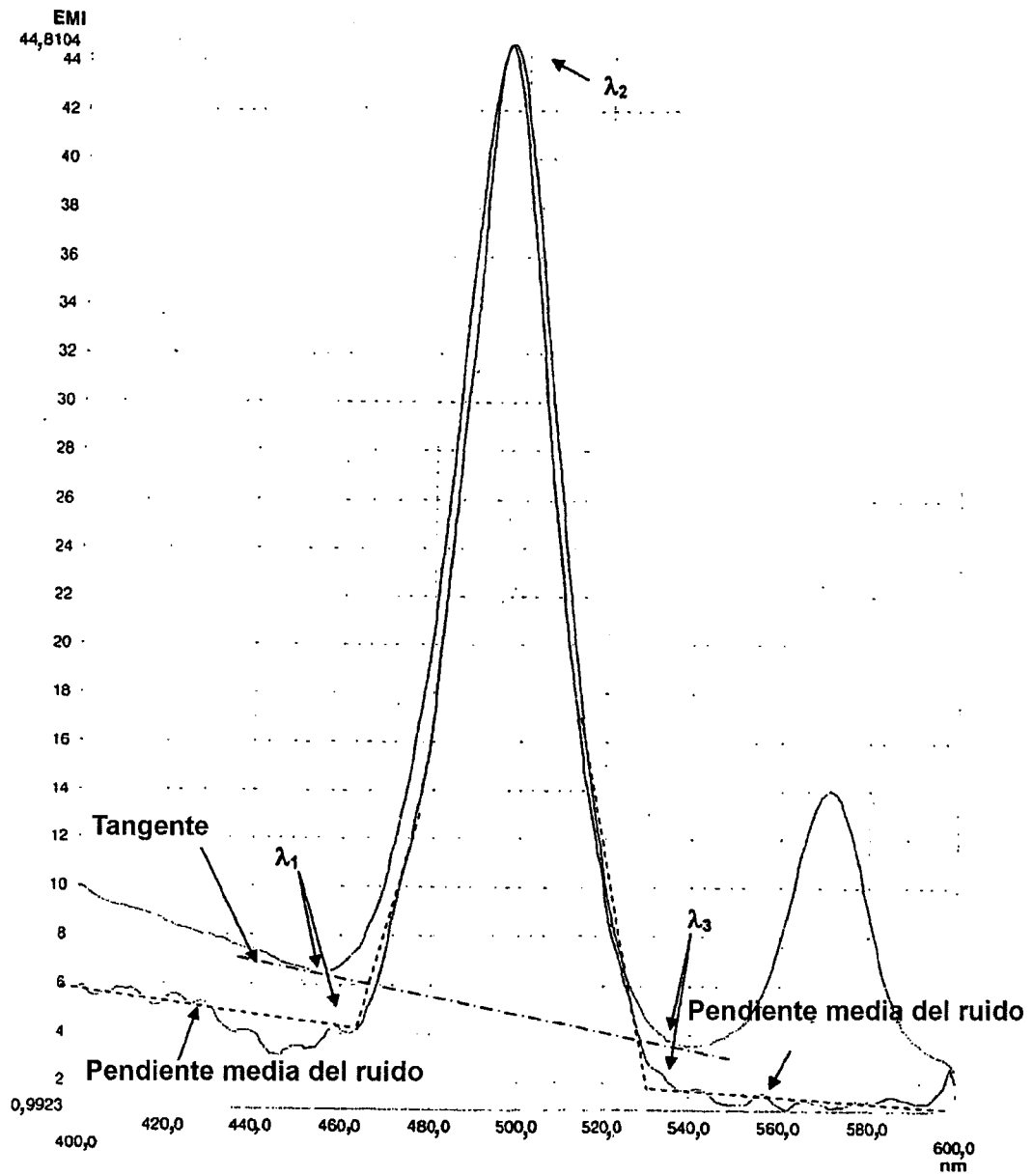


Figura 14

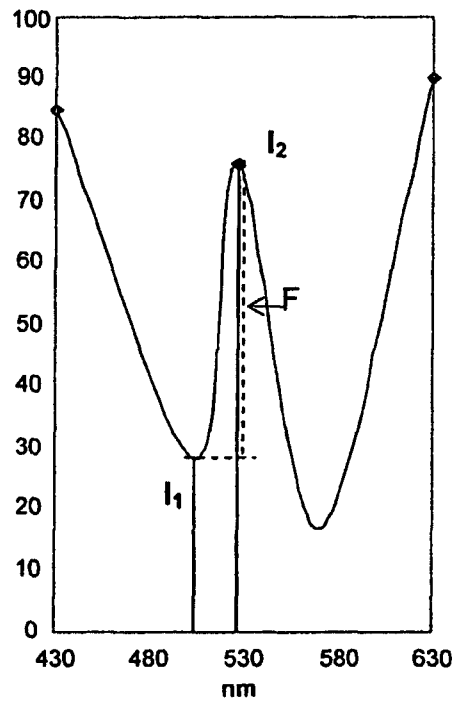


Figura 15

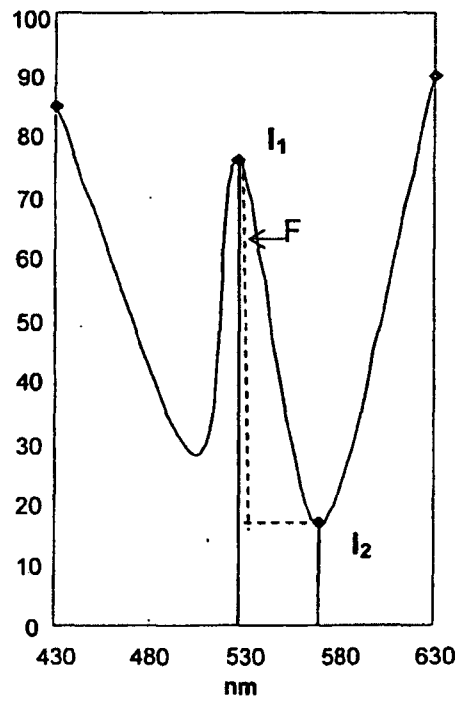


Figura 16

DOCUMENTOS INDICADOS EN LA DESCRIPCIÓN

En la lista de documentos indicados por el solicitante se ha recogido exclusivamente para información del lector, y no es parte constituyente del documento de patente europeo. Ha sido recopilada con el mayor cuidado; sin embargo, la EPA no asume ninguna responsabilidad por posibles errores u omisiones.

Documentos de patente indicados en la descripción

- US 5863753 A [0057]

Literatura no citada en la descripción de la patente

- Lloyd. Synchronised excitation of fluorescence emission spectra. *Nature physical Science*, 1971, vol. 231, 64-5 [0062]
- Ficheux et al. La spectrofluorescence synchrone: théorie et applications. *Toxicorama*, 1991, vol. 3 (1), 8-13 [0062]
- Anker P. et al. Detection of Circulating Tumour DNA in the blood (plasma/serum) of Cancer Patients. *Cancer Metastasis Rev*, 1999, vol. 18, 65-73 [0163]
- Boddy J.L. et al. Prospective Study of Quantitation of plasma DNA Levels in Diagnosis of Malignant versus Benign Prostate Disease. *Clinical Cancer Res*, 2005, vol. 11, 1394-1399 [0163]
- Chang C.P. Elevated cell-free serum DNA detected in patients with myocardial infarction. *Clin Chim Acta*, 2003, vol. 327, 95-101 [0163]
- De Kok JB et al. Detection of Tumour DNA in Serum of Colorectal Cancer Patients. *Scand J Lab Clin Invest*, 1997, vol. 57, 601-4 [0163]
- Fournié G.J. et al. Plasma DNA as a Marker of Cancerous Cell Death : Investigation in Patients Suffering from Lung Cancer in Nude Mice Bearing Human Tumours. *Cancer Letters*, 1995, vol. 91, 221-227 [0163]
- Gal S. et al. Quantitation of Circulating DNA in Serum of Breast Cancer Patients by Real Time PCR. *British Journal of Cancer*, 2004, vol. 90, 1211-1215 [0163]
- Greenstock C.L. et al. Interaction of ethidium bromide with DNA as studied by kinetic spectrophotometry. *Chem Biol Interact.*, 1975, vol. 11, 441-7 [0163]
- Jahr S et al. DNA Fragments in the blood Plasma of Cancer Patients : Quantitation and Evidence for their Origin from Apoptotic and Necrotic Cells. *Cancer Res*, 2001, vol. 61, 1659-65 [0163]
- Jung K. et al. Increased Cell Free DNA in Plasma of Patients with Metastatic Spread in Prostate Cancer. *Cancer letters*, 2004, vol. 205, 173-180 [0163]
- Lam N.Y. et al. Time Course of Early and Late Changes in Plasma DNA in Trauma Patients. *Clinical Chemistry*, 2003, vol. 49, 1286-1291 [0163]
- Leon SA et al. Radioimmunoassay for nanogram quantities of DNA. *J Immunol Methods*, 1975, vol. 9, 157-64 [0163]
- Leon S. et al. Free DNA in the Serum of Cancer patients and effects of the Therapy. *Cancer Res.*, 1977, vol. 37, 646-650 [0163]
- Mandel P ; Metais P. Les acides nucléiques du plasma sanguin chez l'homme. *C. R. Soc Biol*, 1948, vol. 142, 241 [0163]
- Mulder J. Rapid and simple PCR assay for quantitation of human immunodeficiency virus type 1 RNA in plasma: application to acute retroviral infection. *J Clin Microbiol*, 1994, vol. 32, 292-300 [0163]
- Shao Z et al. Mutation in Plasma DNA and its Prognostic Value in Breast Cancer Patients. *Clinical Cancer Res*, 2001, vol. 7, 2222-2227 [0163]
- Shapiro B. et al. Determination of Circulating DNA Levels in the Patients with Benign or malignant Gastrointestinal Disease. *Cancer*, 1983, vol. 51, 2116-2120 [0163]
- Siebert PD et al. Competitive PCR. *Nature*, 1992, vol. 359, 557-8 [0163]
- Sozzi G. et al. analysis of Circulating Tumour DNA in Plasma at Diagnosis and Follow-up Lung Cancer Patients. *Cancer Res*, 2001, vol. 61, 4675-4678 [0163]
- Sozzi G. et al. Quantitation of Free Circulating DNA as a Diagnostic Marker in Lung Cancer. *Journal of Clinical Oncology*, 2003, vol. 21, 3902-3908 [0163]
- Tan E.M. et al. Deoxyribonucleic acid (DNA) and antibodies to DNA in the serum of patients with systemic lupus erythematosus. *J Clin Invest*, 1996, vol. 45, 1732-40 [0163]
- Thijssen M.A. et al. Difference between Free Circulating Plasma and Serum DNA in Patients with Colorectal Liver Metastasis. *Anticancer Res*, 2002, vol. 22, 421-425 [0163]
- Wu T.L. et al. Cell Free DNA : Measurement in Various Carcinomas and Establishment of normal Reference range. *Clinica Chimica Acta*, 2002, vol. 321, 77-87 [0163]
- Yap EP et al. Nonisotopic SSCP and competitive PCR for DNA quantification: p53 in breast cancer cells. *Nucleic Acids Res.*, 1992, vol. 20, 145 [0163]