

19



OFICINA ESPAÑOLA DE
PATENTES Y MARCAS

ESPAÑA



11 Número de publicación: **2 380 923**

51 Int. Cl.:
C12Q 1/68

(2006.01)

12

TRADUCCIÓN DE PATENTE EUROPEA

T3

- 96 Número de solicitud europea: **05715157 .3**
96 Fecha de presentación: **07.04.2005**
97 Número de publicación de la solicitud: **1735459**
97 Fecha de publicación de la solicitud: **27.12.2006**

54 Título: **Procedimientos de cuantificación de microARN y ARN interferentes pequeños**

30 Prioridad:
07.04.2004 DK 200400578
23.07.2004 DK 200401146
11.08.2004 DK 200401218
15.10.2004 DK 200401587
28.01.2005 DK 200500140

45 Fecha de publicación de la mención BOPI:
21.05.2012

45 Fecha de la publicación del folleto de la patente:
21.05.2012

73 Titular/es:
EXIQON A/S
SKELSTEDET 16
2950 VEDBAEK, DK

72 Inventor/es:
JACOBSEN, Nana;
KONGSBAK, Lars;
KAUPPINEN, Sakari;
ECHWALD, Søren, Morgenthaler;
MOURITZEN, Peter;
NIELSEN, Peter, Stein y
NØRHOLM, Mikkel

74 Agente/Representante:
Carpintero López, Mario

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).

ES 2 380 923 T3

DESCRIPCIÓN

Procedimientos de cuantificación de microARN y ARN interferentes pequeños

La presente invención se refiere a ácidos nucleicos, sondas y procedimientos para la detección, la cuantificación, así como el control de la expresión de microARN maduros y ARN interferentes pequeños (ARNip). La invención se refiere además a procedimientos para controlar la expresión de otros ARN no codificantes, variantes de corte y empalme de ARNm, así como la detección y cuantificación de la edición de ARN, variantes alélicas de transcritos individuales, mutaciones, deleciones o duplicaciones de exones particulares en transcritos, por ejemplo, alteraciones asociadas con una enfermedad humana, tal como cáncer. La invención se refiere además a procedimientos para la detección y cuantificación de una secuencia de ADN diana.

Antecedentes de la invención

La presente invención se refiere a la cuantificación de secuencias de nucleótidos diana en una amplia diversidad de muestras de ácido nucleico y, más específicamente, a los procedimientos que emplean el diseño y el uso de sondas oligonucleotídicas que son útiles para detectar y cuantificar secuencias de nucleótidos diana, especialmente secuencias diana de ARN, tales como secuencias diana de microARN y ARNip de interés, y para detectar diferencias entre muestras de ácido nucleico (por ejemplo, tales como muestras de un paciente con cáncer y un paciente sano).

MicroARN

El creciente inventario de bases de datos de secuencias internacionales y la secuenciación concomitante de casi 200 genomas que representan los tres dominios de vida —bacterias, arqueas y eucariotas— han sido los impulsores principales en el procedimiento de deconstrucción de organismos vivos en catálogos moleculares completos de genes, transcritos y proteínas. La importancia de la variación genética dentro de una sola especie se ha hecho evidente, extendiéndose más allá de la conclusión de proyectos genéticos de varios genomas importantes, culminando en la publicación del borrador de trabajo de la secuencia del genoma humano en 2001 (Lander, Linton, Birren y col., 2001 Nature 409: 860-921; Venter, Adams, Myers y col., 2001 Science 291: 1304-1351; Sachidanandam, Weissman, Schmidt y col., 2001 Nature 409: 928-933). Por otro lado, el número creciente de análisis moleculares detallados a gran escala de la transcripción que se origina de los genomas humanos y de ratón, junto con la reciente identificación de varios tipos de ARN no codificantes de proteínas, tales como ARN nucleolares pequeños, ARNip, microARN y ARN antisentido, indica que los transcriptomas de eucariotas superiores son mucho más complejos de lo que se esperaba originariamente (Wong y col. 2001, Genome Research 11: 1975-1977; Kampa y col. 2004, Genome Research 14: 331-342).

Como resultado del Dogma Central: "el ADN genera ARN y el ARN genera proteína", los ARN se han considerado como simples moléculas que sólo traducen la información genética en proteínas. Recientemente, se ha estimado que aunque la mayor parte del genoma se transcribe, casi el 97% del genoma no codifica proteínas en eucariotas superiores, sino supuestos ARN no codificantes (Wong y col. 2001, Genome Research, 11: 1975-1977). Los ARN no codificantes (ARNnc) parecen estar particularmente bien adaptados para papeles reguladores que requieren un reconocimiento de ácido nucleico altamente específico. Por lo tanto, la visión del ARN está cambiando rápidamente desde la molécula simplemente informativa para comprender una amplia diversidad de moléculas estructurales, informativas y catalíticas en la célula.

Recientemente, se han identificado y diseñado un gran número de genes de ARN pequeños no codificantes como microARN (miARN) (para una revisión, véase Ke y col. 2003, Curr. Opin. Chem. Biol. 7: 516-523). Los primeros miARN que se descubrieron fueron el lin-4 y el let-7, que son genes de cambio heterocrónico esenciales para el control temporal normal de diversos acontecimientos de desarrollo (Lee y col. 1993, Cell 75: 843-854; Reinhart y col. 2000, Nature 403: 901-906) en el verme redondo *C. elegans*. Los miARN se han conservado evolutivamente a lo largo de una amplia variedad de especies y muestran diversidad en sus perfiles de expresión, sugiriendo que ocupan una amplia diversidad de funciones reguladoras y ejercen efectos significativos sobre el crecimiento y el desarrollo celular (Ke y col. 2003, Curr. Opin. Chem. Biol. 7: 516-523). Un trabajo reciente ha demostrado que los miARN pueden regular la expresión génica a muchos niveles, representando un mecanismo regulador de genes novedoso y confirmando la idea de que el ARN es capaz de realizar papeles reguladores similares a los de las proteínas. La comprensión de esta regulación basada en ARN contribuirá a que los presentes inventores entiendan la complejidad del genoma en eucariotas superiores, así como a que entiendan las complejas redes reguladoras de genes.

Los miARN son ARN de 21-25 nucleótidos (nt) que se procesan a partir de transcritos de horquilla endógenos más largos (Ambros y col 2003, RNA 9: 277-279). Hasta la fecha se han identificado más de 719 microARN en seres humanos, vermes, moscas de la fruta y plantas de acuerdo con la base de datos de registro de miARN alojada por el Sanger Institute, Reino Unido, y también se han identificado muchos miARN que corresponden a supuestos genes. Algunos miARN tienen múltiples loci en el genoma (Reinhart y col. 2002, Genes Dev. 16: 1616-1626) y, ocasionalmente, varios genes de miARN se disponen en grupos en tándem (Lagos-Quintana y col. 2001, Science 294: 853-858). El hecho de que muchos de los miARN descritos hasta la fecha se hayan aislado sólo una vez

sugiere que se descubrirán muchos nuevos miARN en el futuro. Un reciente análisis transcripcional en profundidad de los cromosomas humanos 21 y 22 descubrió que el 49% de la transcripción observada estaba fuera de cualquier anotación conocida, y además que estos nuevos transcritos eran ARN tanto codificantes como no codificantes (Kampa y col. 2004, *Genome Research* 14: 331-342). Los miARN identificados hasta la fecha representan muy probablemente la punta del iceberg, y el número de miARN podría resultar ser muy grande.

Las características combinadas de los microARN caracterizados hasta la fecha (Ke y col. 2003, *Curr. Opin. Chem. Biol.* 7: 516-523; Lee y col. 1993, *Cell* 75: 843-854; Reinhart y col. 2000, *Nature* 403: 901-906) pueden resumirse como:

1. Los miARN son ARN monocatenarios de aproximadamente 21-25 nt.
2. Se escinden a partir de un precursor de horquilla bicatenario endógeno más largo mediante la enzima Dicer.
3. Los miARN coinciden con precisión con las regiones genómicas que pueden codificar potencialmente ARN precursores en forma de horquillas bicatenarias.
4. Los miARN y sus estructuras secundarias precursoras predichas están conservados filogenéticamente.

Varias líneas de pruebas sugieren que las enzimas Dicer y Argonaute son participantes cruciales en la biosíntesis, la maduración y la función de los miARN (Grishok y col. 2001, *Cell* 106: 23-24). Las mutaciones en genes necesarios para la biosíntesis de miARN conducen a defectos genéticos del desarrollo, que al menos en parte, proceden del papel de generar miARN. La visión actual es que los miARN se escinden mediante Dicer a partir del precursor de horquilla en forma de dúplex, inicialmente con salientes de 2 ó 3 nt en los extremos 3', y se denominan pre-miARN. Los cofactores se unen al pre-miRNP y desenrollan los pre-miARN en miARN monocatenarios, y los pre-miRNP se transforman después en miRNP. Los miARN pueden reconocer dianas reguladoras mientras sean parte del complejo de miRNP. Existen varias similitudes entre los miRNP y el complejo de silenciamiento inducido por ARN, RISC, incluyendo tamaños similares y que ambos contienen ARN helicasa y las proteínas PPD. Por lo tanto, se ha propuesto que los miRNP y RISC son el mismo RNP con múltiples funciones (Ke y col. 2003, *Curr. Opin. Chem. Biol.* 7: 516-523). Diferentes efectores dirigen a los miARN hacia diversas rutas. La estructura de los pre-miARN concuerda con la observación de que dúplex de ARN de 22 nt con salientes de 2 ó 3 nt en los extremos 3' son beneficiosos para la reconstitución del complejo proteico y podrían ser necesarios para una unión de alta afinidad del dúplex de ARN corto con los componentes proteicos (para una revisión, véase Ke y col. 2003, *Curr. Opin. Chem. Biol.* 7: 516-523).

Las pruebas crecientes sugieren que los miARN desempeñan papeles cruciales en la regulación de genes eucariotas. Los primeros genes de miARN que se descubrieron, *lin-4* y *let-7*, muestran un emparejamiento de bases incompleto con elementos repetidos en las regiones no traducidas (UTR) 3' de otros genes heterocrónicos y regulan la traducción directamente y de forma negativa mediante la interacción de ARN-ARN antisentido (Lee y col. 1993, *Cell* 75: 843-854; Reinhart y col. 2000, *Nature* 403: 901-906). Se cree que otros miARN interaccionan con ARNm diana también mediante una traducción suprimida y complementaria limitada (Lagos-Quintana y col. 2001, *Science* 294: 853-858; Lee y Ambros 2001, *Science* 294: 858-862). Sin embargo, muchos estudios han demostrado que, dada una perfecta complementariedad entre los miARN y su ARN diana, podrían conducir a una degradación del ARN diana más que a inhibir la traducción (Hut-vanger y Zamore 2002, *Science* 297: 2056-2060), sugiriendo que el grado de complementariedad determina sus funciones. Por identificación de secuencias con una complementariedad cercana, se han predicho varias dianas, la mayoría de las cuales parecen ser factores de transcripción potenciales que son cruciales en el crecimiento y el desarrollo celular. El alto porcentaje de dianas de miARN predichas que actúan como reguladores del desarrollo y la conservación de sitios diana sugieren que los miARN están implicados en una amplia variedad de decisiones del desarrollo y comportamiento de organismos y del destino celular (para una revisión, véase Ke y col. 2003, *Curr. Opin. Chem. Biol.* 7: 516-523).

MicroARN y enfermedad humana

El análisis de la localización genómica de miARN indica que desempeñan papeles importantes en el desarrollo y la enfermedad en seres humanos. Ya se han señalado varias enfermedades humanas en las que podrían estar implicados miARN o su maquinaria de procesamiento. Una de ellas es la atrofia muscular espinal (AME), una enfermedad neurodegenerativa pediátrica causada por niveles de proteína reducidos o mutaciones de pérdida de función del gen de la supervivencia de las motoneuronas (SMN) (Paushkin y col. 2002, *Curr. Opin. Cell Biol.* 14: 305-312). Dos proteínas (Gemin3 y Gemin4), que son parte del complejo de SMN, también son componentes de miRNP, mientras que todavía está por ver si la biogénesis o la función del miARN está desregulada en la AME, y qué efecto tiene esto sobre la patogénesis. Otra enfermedad neurológica relacionada con miARN/ARNip es el retraso mental ligado a X frágil (RMXF) causado por la ausencia de o mutaciones de la proteína del retraso mental ligado a X frágil (FMRP) (Nelson y col. 2003, *TIBS* 28: 534-540), y hay indicios adicionales de que los miARN podrían desempeñar un papel en otras enfermedades neurológicas. Otro descubrimiento interesante más es que el locus del gen de miR-224 se encuentra dentro de la región mínima candidata de dos enfermedades neurológicas diferentes: Parkinsonismo de aparición temprana y retraso mental ligado a X (Dostie y col. 2003, *RNA* 9: 180-186). También se han descrito recientemente relaciones entre el cáncer y los miARN. La anomalía genética individual más frecuente

en la leucemia linfocítica crónica (LLC) es una delección localizada en el cromosoma 13q14 (50% de los casos). Un estudio reciente determinó que dos genes de miARN diferentes (miR15 y miR16) están agrupados y localizados dentro del intrón de LEU2, que se encuentra dentro de la región mínima delecionada del locus supresor de tumor de la leucemia linfocítica crónica de linfocitos B (LLC-B), y ambos genes están delecionados o regulados negativamente en la mayoría de casos de LLC (Calin y col. 2002, Proc. Natl. Acad. Sci. U.S.A. 99: 15524-15529). Se ha previsto que las relaciones entre los miARN y las enfermedades humanas sólo se fortalecerán en paralelo con el conocimiento de los miARN y las redes de genes que controlan. Además, la comprensión de la regulación de la expresión génica mediada por ARN está conduciendo al desarrollo de nuevas estrategias terapéuticas que probablemente revolucionarán la práctica de la medicina (Nelson y col. 2003, TIBS 28: 534-540).

ARN interferentes pequeños e iARN

Parte de la reciente atención prestada a los ARN pequeños en el intervalo de tamaño de 21 a 25 nt se debe al fenómeno de la interferencia de ARN (iARN) en la que el ARN bicatenario conduce a la degradación de cualquier ARN que sea homólogo (Fire y col. 1998, Nature 391: 806-811). La iARN depende de un complejo y antiguo mecanismo celular que probablemente se ha desarrollado para la protección frente al ataque viral y elementos genéticos móviles. Una etapa crucial en el mecanismo de la iARN es la generación de ARN interferentes pequeños (ARNip), ARN bicatenarios que son de aproximadamente 22 nt de longitud cada uno. Los ARNip conducen a la degradación del ARN diana homólogo y a la producción de más ARNip contra el mismo ARN diana (Lipardi y col. 2001, Cell 107: 297-307). La presente visión para la ruta de degradación del ARNm de la iARN es que dímeros de Dicer antiparalelos escinden ARNbc bicatenarios largos para formar ARNip de una forma dependiente de ATP. Después, los ARNip se incorporan en el complejo de silenciamiento inducido por ARN (RISC) y el desenrollamiento dependiente de ATP de los ARNip activa a RISC (Zhang y col. 2002, EMBO J. 21: 5875-5885; Nykänen y col. 2001, Cell 107: 309-321). El complejo de RISC activo está por lo tanto guiado para degradar los ARNm diana específicos.

Detección y análisis de microARN y ARNip

La visión actual de que los miARN pueden representar una capa de regulación génica oculta recién descubierta ha dado como resultado un gran interés entre los investigadores alrededor del mundo en el descubrimiento de miARN, sus dianas y su mecanismo de acción. Sin embargo, la detección y análisis de estos ARN pequeños no es trivial. Por lo tanto, el descubrimiento de más de 700 miARN hasta la fecha ha requerido aprovecharse de sus características especiales. En primer lugar, los grupos de investigación han usado el pequeño tamaño de los miARN como un criterio primario para el aislamiento y la detección. Por consiguiente, las genotecas de ADNc convencionales carecerían de miARN, principalmente porque los ARN que son pequeños normalmente se excluyen por selección de tamaño en el procedimiento y construcción de genotecas de ADNc. El ARN total de embriones de mosca, vermes o células HeLa se ha fraccionado por tamaño de modo que sólo se capturasen moléculas de 25 nucleótidos o más pequeñas (Moss 2002, Curr. Biology 12: R138-R140). Después, los oligómeros sintéticos se han ligado directamente con las combinaciones de ARN usando ARN ligasa de T4. Después, las secuencias se han sometido a transcripción inversa, se han amplificado por PCR, se han clonado y se han secuenciado (Moss 2002, Curr. Biology 12: R138-R140). Las bases de datos de genoma se han consultado posteriormente con las secuencias, confirmando el origen de los miARN de estos organismos, así como poniendo los genes de miARN físicamente en el contexto de otros genes en el genoma. La amplia mayoría de las secuencias clonadas se ha localizado en regiones intrónicas o entre genes, ocasionalmente en grupos, sugiriendo que los miARN dispuestos en tándem se procesan a partir de un solo transcrito para permitir una regulación coordinada. Además, las secuencias genómicas han puesto de manifiesto las estructuras replagadas de los precursores de miARN (Moss 2002, Curr. Biology 12: R138-R140).

El tamaño y a veces el bajo nivel de expresión de los diferentes miARN requieren el uso de herramientas de análisis sensibles y cuantitativas. Debido a su pequeño tamaño de 21-25 nt, se excluye el uso de PCR a tiempo real cuantitativa para controlar la expresión de miARN maduros. Por lo tanto, la mayoría de los investigadores de miARN usan actualmente análisis de transferencia de Northern combinados con geles de poliacrilamida para examinar la expresión tanto de los miARN maduros como de los pre-miARN (Reinhart y col. 2000, Nature 403: 901-906; Lagos-Quintana y col. 2001, Science 294: 853-858; Lee y Ambros 2001, Science 294: 862-864). También se ha usado la extensión de cebadores para detectar el miARN maduro (Zeng y Cullen 2003, RNA 9: 112-123). La desventaja de todos los ensayos basados en gel (transferencia de Northern, extensión de cebadores, ensayos de protección frente a ARNasa, etc.) como herramientas para controlar la expresión de miARN incluye un bajo rendimiento y una escasa sensibilidad. Las micromatrices de ADN parecerían ser una buena alternativa al análisis de transferencia de Northern para cuantificar miARN ya que las micromatrices tienen un rendimiento excelente. Sin embargo, los inconvenientes de las micromatrices son la necesidad de altas concentraciones de diana aportada para una hibridación y generación de señales eficaz, la escasa sensibilidad para dianas poco frecuentes y la necesidad de validación post-matriz usando ensayos más sensibles tales como PCR cuantitativa a tiempo real, que no es factible. Un informe reciente usaba micromatrices de ADNc para controlar la expresión de miARN durante el desarrollo neuronal con una alícuota de 5 a 10 µg de ARN total aportado como diana, pero los miARN maduros tenían que separarse de los miARN precursores usando micro-concentradores antes de las hibridaciones de micromatrices (Krichevsky y col. 2003, RNA 9: 1274-1281). También se ha usado una estrategia de PCR para determinar los niveles de expresión de los miARN maduros (Grad y col. 2003, Mol. Cell 11: 1253-1263). Este procedimiento es útil para clonar miARN, pero altamente impráctico para una generación de perfiles de expresión de miARN de rutina, puesto que implica el aislamiento de gel de ARN pequeños y la ligación con oligonucleótidos de enganche. Schmittgen

y col. (2004, Nucleic Acids Res. 32: e43) describen un procedimiento alternativo al análisis de transferencia de Northern en el que usan ensayos de PCR a tiempo real para cuantificar la expresión de precursores de miARN. La desventaja de este procedimiento es que sólo permite la cuantificación de los miARN precursores, lo que no necesariamente refleja los niveles de expresión de los miARN maduros. Para caracterizar completamente la expresión de grandes cantidades de miARN, es necesario cuantificar los miARN maduros, tales como los expresados en una enfermedad humana, en la que las alteraciones en la biogénesis de miARN producen niveles de miARN maduros que son muy diferentes de los del miARN precursor. Por ejemplo, los precursores de 26 miARN se expresaban por igual en tejidos colorrectales cancerosos y no cancerosos de pacientes, mientras que la expresión de miR143 y miR145 humanos maduros estaba enormemente reducida en tejidos cancerosos en comparación con tejidos no cancerosos, sugiriendo un procesamiento alterado para miARN específicos en enfermedades humanas (Michael y col. 2003, Mol. Cancer Res. 1: 882-891). Por otro lado, los descubrimientos recientes en el maíz con miR166 y miR165 en *Arabidopsis thaliana* indican que los microARN actúan como señales para especificar la polaridad de las hojas en plantas y pueden incluso formar señales móviles que emanan de un centro de señalización por debajo de la hoja incipiente (Juarez y col. 2004, Nature 428: 84-88; Kidner y Martienssen 2004, Nature 428: 81-84).

En conclusión, el mayor reto en la medición de los miARN maduros, así como de los ARNip usando PCR cuantitativa a tiempo real es su pequeño tamaño de 21-25 nt. El procedimiento descrito de la invención aborda los problemas prácticos mencionados anteriormente en la detección y cuantificación de moléculas de ARN pequeñas, miARN así como ARNip, y tiene como objetivo asegurar el desarrollo de ensayos flexibles, convenientes y económicos para una cuantificación precisa y específica de transcritos de miARN y ARNip.

Edición y corte y empalme alternativo de ARN

La edición de ARN se usa para describir cualquier cambio específico en la secuencia primaria de una molécula de ARN, excluyendo otros procedimientos mecánicamente definidos tales como corte y empalme alternativo o poliadenilación. Las alteraciones del ARN debidas a la edición se incluyen en dos amplias categorías, dependiendo de si el cambio se produce a nivel de base o nucleótido (Gott 2003, C. R. Biologies 326 901-908). La edición de ARN está bastante generalizada, produciéndose en mamíferos, virus, marsupiales, plantas, moscas, ranas, vermes, calamares, hongos, mohos del fango, dinoflagelados, protozoos cinetoplástidos y otros eucariotas unicelulares. La lista actual representa muy probablemente sólo la punta del iceberg, basándose en la distribución de homólogos de enzimas de edición conocidas, ya que la edición de ARN se produce casi con toda seguridad en muchas otras especies, incluyendo todos los metazoos. Puesto que la edición del ARN puede regularse de una forma específica de tejido o de desarrollo, probablemente desempeña un papel significativo en la etiología de enfermedades humanas (Gott 2003, C. R. Biologies 326 901-908).

Una característica común para los genes eucariotas es que están compuestos por exones codificantes de proteínas e intrones. Los intrones se caracterizan por escindir de la molécula de pre-ARNm en el corte y empalme de ARN, ya que las secuencias a cada lado del intrón se cortan y empalman juntas. El corte y empalme de ARN no sólo proporciona un ARNm funcional, sino que también es responsable de generar una diversidad adicional. Este fenómeno se denomina corte y empalme alternativo, que da como resultado la producción de diferentes ARNm a partir del mismo gen. Los ARNm que representan isoformas que surgen de un solo gen pueden diferir mediante el uso de exones alternativos o la retención de un intrón que interrumpa dos exones. Este procedimiento conduce con frecuencia a diferentes productos proteicos que pueden tener funciones celulares relacionadas o radicalmente diferentes, incluso antagonistas. Existen pruebas crecientes que indican que el corte y empalme alternativo está muy generalizado (Croft y col. Nature Genetics, 2000). Estudios recientes han puesto de manifiesto que al menos el 80% de los aproximadamente 35.000 genes en el genoma humano se cortan y empalman de forma alternativa (Kampa y col. 2004, Genome Research 14: 331-342). Claramente, por combinación de diferentes tipos de modificaciones y, por lo tanto, generación de diferentes combinaciones posibles de transcritos de diferentes genes, el corte y empalme alternativo junto con la edición de ARN son mecanismos potentes para generar diversidad de proteínas.

El análisis de las variantes de corte y empalme alternativas y la edición de ARN, a su vez, representa una nueva estrategia a la genómica funcional, el diagnóstico de enfermedades y la farmacogenómica.

Control perdido del corte y empalme alternativo como agente causal de enfermedad humana

La detección de la estructura detallada del resultado transcripcional es un objetivo importante para la caracterización molecular de una célula o tejido. Sin la capacidad para detectar y cuantificar las variantes de corte y empalme presentes en un tejido, el contenido de transcritos o el contenido de proteína no puede describirse con exactitud. La investigación médica molecular muestra que muchos cánceres dan como resultado niveles alterados de variantes de corte y empalme, de modo que es necesario un procedimiento preciso para detectar y cuantificar estos transcritos. Las mutaciones que producen una forma de corte y empalme aberrante también pueden ser la causa principal de dichas enfermedades graves, tales como distrofia muscular espinal y fibrosis quística.

Gran parte del estudio de enfermedades humanas, de hecho gran parte de la genética se basa en el estudio de unos cuantos organismos de modelo. La estabilidad evolutiva de los patrones de corte y empalme alternativo y el grado con el que los cambios de corte y empalme de acuerdo con mutaciones y condiciones ambientales y celulares

influyen en la importancia de estos sistemas de modelo. En la actualidad, existe una escasa comprensión de las tasas a las que cambian los patrones de corte y empalme alternativo o la edición del ARN, y de los factores que influyen en estas tasas.

Anteriormente, se han realizado otros procedimientos de análisis con el objetivo de detectar el corte y empalme de transcritos de ARN de por sí en levaduras, o de detectar supuestos acontecimientos de corte y empalme saltándose exones en tejidos de rata, pero ninguna de estas estrategias tenía una resolución suficiente para estimar cantidades de variantes de corte y empalme, un factor que podría ser esencial para una comprensión de los cambios en el ciclo vital de la célula y la enfermedad. Por lo tanto, son necesarios procedimientos mejorados para la amplificación, hibridación y cuantificación de ácido nucleico. El presente procedimiento de la invención permite distinguir entre variantes de corte y empalme de ARNm, así como transcritos de ARN editado, y cuantificar la cantidad de cada variante en una muestra de ácido nucleico, tal como una muestra derivada de un paciente.

Transcripción antisentido en eucariotas

La regulación génica mediada por ARN está generalizada en eucariotas superiores, y fenómenos genéticos complejos como la interferencia de ARN, la cosupresión, el silenciamiento transgénico, la generación de huellas genéticas, la metilación y posiblemente la variedad del efecto de la posición y la transvección, implican todos rutas que se crucen basadas en o conectadas con la señalización del ARN (Mattick 2001; EMBO reports 2, 11: 986-991). Estudios recientes indican que la transcripción antisentido es un fenómeno muy común en los genomas de ratón y seres humanos (Okazaki y col. 2002; Nature 420: 563-573; Yelin y col. 2003, Nature Biotechnol.). Por lo tanto, la modulación antisentido de la expresión génica en células eucariotas, por ejemplo, células humanas parece ser un mecanismo regulador común. A la luz de esto, la presente invención proporciona un procedimiento para la cuantificación de ARN antisentido no codificantes, así como un procedimiento para el mapeo altamente preciso de las regiones solapantes entre unidades de transcripción con sentido-antisentido.

Sumario de la invención

Los retos de establecer la función del genoma y comprender las capas de información ocultas en los transcriptomas complejos de eucariotas superiores requieren nuevas tecnologías mejoradas para la detección, el análisis y la cuantificación de moléculas de ARN en muestras de ácido nucleico complejas. Por lo tanto, sería muy deseable ser capaz de detectar y cuantificar la expresión de microARN maduros, ARNip, transcritos de ARN editado, así como variantes de corte y empalme altamente homólogas en los transcriptomas de eucariotas usando procedimientos basados en sondas de detección oligonucleotídicas específicas y sensibles en un sistema de ensayo homogéneo.

La presente invención resuelve los problemas actuales afrontados por las aproximaciones convencionales a ensayos homogéneos resumidas anteriormente, proporcionando un procedimiento para la determinación cuantitativa de un ARN de longitud corta que tiene una longitud de como mucho 100 nucleótidos, que comprende:

- a) preparar, a partir de una muestra que comprende dicho ARN de longitud corta, un polinucleótido de molde que consiste en 1) una secuencia diana monocatenaria que consiste en la secuencia de dicho ARN de longitud corta, su secuencia de ADN correspondiente o una secuencia de nucleótidos complementaria a la secuencia de dicho ARN de longitud corta y 2) una secuencia de nucleótidos adyacente 5' y/o 3', donde dicha secuencia de nucleótidos adyacente 5' y/o 3' es un polinucleótido que consiste en nucleótidos idénticos,
- b) usar dicho polinucleótido de molde en una transcripción inversa o una polimerización de nucleótidos para obtener una cadena de ADNc, y
- c) realizar una PCR a tiempo real cuantitativa (qPCR) incluyendo como molde o moldes dicho ADNc y, opcionalmente, el polinucleótido de molde, en la que

1) los cebadores usados para la qPCR en la etapa c se seleccionan de

- al menos 2 oligonucleótidos, en la que al menos uno de dichos oligonucleótidos corresponde a o es complementario a una secuencia en la secuencia de nucleótidos adyacente 5' o 3' y
- al menos 2 nucleótidos, en la que al menos uno de dichos oligonucleótidos corresponde a o es complementario a una secuencia contigua en el polinucleótido de molde constituida por parte de la secuencia diana monocatenaria y parte de la secuencia de nucleótidos 5' o 3' adyacente, o en la que

2) la reacción de la etapa (b) utiliza un cebador de transcripción inversa o un cebador de polimerización de ADN que corresponde a o es complementario a una secuencia contigua en el polinucleótido de molde constituida por parte de la secuencia diana monocatenaria y parte de la secuencia de nucleótidos 5' o 3' adyacente.

Los presentes procedimientos de la invención son muy útiles y aplicables para la detección y la cuantificación de moléculas de ARN pequeñas individuales en mezclas complejas compuestas por cientos de miles de diferentes ácidos nucleicos, tales como la detección de miARN maduros o ARNip, cuando se combinan con un conjunto de sondas de etiquetado específicas de diana de miARN o ARNip y una sonda de detección de miARN o ARNip. Las secuencias de reconocimiento en el conjunto de sondas de etiquetado, así como la sonda de detección, se sintetizan por sustitución de análogos de nucleótidos de alta afinidad, por ejemplo, LNA y, preferentemente, oxi-LNA,

permitiendo que se produzca una hibridación y ligación altamente sensible y específica a temperaturas elevadas. Mediante el uso de sondas de detección cortas de la invención, sustituidas con análogos de nucleótidos de alta afinidad, por ejemplo, LNA, LNA diaminopurina y LNA 2-tiotimidina, los amplicones cortos correspondientes a miARN maduros o ARNip, incluyendo los sitios de cebadores de anclaje del conjunto de sondas de etiquetado pueden controlarse directamente en ensayos de PCR cuantitativa a tiempo real convencionales. El presente procedimiento es además altamente útil en la detección y cuantificación de ARN no codificantes distintos de miARN o ARNip, transcritos de ARN antisentido, transcritos de ARN editado o transcritos de corte y empalme alternativo altamente homólogos en muestras de ácido nucleico complejas, tales como los transcriptomas de ser humano, ratón, rata, *C. elegans*, *Drosophila melanogaster*, *Arabidopsis thaliana*, arroz y maíz compuestos por cientos de miles de ácidos ribonucleicos diferentes en sus transcriptomas respectivos. El procedimiento también es directamente aplicable a la detección, ensayo, diagnóstico o cuantificación de miARN, ARNip, otros ARN no codificantes, transcritos de ARN editado o variantes de corte y empalme de ARNm alternativo implicados en o conectados con una enfermedad humana en muestras de ácido nucleico humanas complejas, por ejemplo, de pacientes con cáncer.

Breve descripción de los dibujos

La Fig. 1 es una presentación esquemática de un procedimiento de la invención para la cuantificación de microARN por RT-PCR cuantitativa a tiempo real específica de secuencia.

La Fig. 2A muestra la representación de la amplificación por PCR cuantitativa a tiempo real para la secuencia diana de microARN miR-15a humano. Las sondas de etiquetado de microARN modificadas con LNA específicas de secuencia se aparearon, se ligaron y, posteriormente, las sondas de etiquetado ligadas se detectaron usando PCR a tiempo real, cebadores de PCR de anclaje y una sonda de detección doblemente marcada modificada con LNA para el microARN miR-15a (cuadrados rellenos) usando un menos molde como control negativo (cruces). La especificidad de la reacción se ensayó usando una reacción sin ligasa (cuadrados en blanco). El ciclo umbral (Ct) para las sondas de microARN ligadas usando el molde de microARN miR-15a era de 35,0, mientras que no fueron detectables valores de Ct para los experimentos de control negativo (menos molde y menos ligasa). La ΔRn es la señal de indicador normalizada corregida por la medida basal (Rn) y representa la Rn menos la señal basal establecida en los primeros cuantos ciclos de PCR. La Fig. 2B muestra el análisis de punto final de las reacciones de PCR a tiempo real en una electroforesis en gel de agarosa al 2% teñido con Gelstar (dilución 1:10000, Cambrex Bio Science, Estados Unidos). El molde de sondas de etiquetado de miR-15a ligadas muestra un fragmento de PCR en el carril 1 (~65 pb). Los experimentos de control negativo (menos molde (carril 2) y menos ligasa (carril 3)) mostraban fragmentos más cortos con un menor peso molecular que para el molde de sondas de etiquetado de miR-15a ligadas. El control sin molde (NTC) en la reacción de PCR a tiempo real estaba sin ningún fragmento en la electroforesis en gel de agarosa (no se muestra).

La Fig. 3 muestra la representación de la amplificación por PCR cuantitativa a tiempo real para la secuencia diana de microARN miR-15a humano y la diana bloqueada en 3' de ADN correspondiente. El molde de ARN (cuadrados rellenos) se sustituyó por un molde de ADN bloqueado químicamente con un fosfato en el extremo 3' (triángulos rellenos). Sin ligasa (triángulos en blanco), el molde de ADN bloqueado no podía detectarse en el ensayo de PCR a tiempo real específico de secuencia de LNA. Los valores de Ct para el molde de ARN y el molde de ADN eran de 35,0 y 33,3, respectivamente.

La Fig. 4 muestra las representaciones de la amplificación por PCR cuantitativa a tiempo real para las secuencias diana de microARN miR-15a humano y miR-16 humano. El reconocimiento de secuencia diana de microARN específico de secuencia del procedimiento de la invención se evaluó usando la diana de microARN miR-15a (cuadrados rellenos) en comparación con la diana de miR-16 (círculos en blanco) que tiene una identidad de secuencia del 72% con la secuencia diana de miR-15a. Ni el control menos molde (cruces) ni el NTC en la reacción de PCR a tiempo real (línea vertical negra) demostraron proporcionar ninguna señal. Las condiciones de hibridación para el apareamiento de las sondas de etiquetado específicas de secuencia diana de miR-15a modificadas con LNA hacia la diana de miR-15a dieron como resultado un valor de Ct de 36,2, mientras que el uso de las mismas sondas de etiquetado para el miR-16 altamente homólogo dio como resultado un valor de Ct de 39,9, correspondiente a una diferencia discriminatoria de 13 veces.

La Fig. 5 muestra las representaciones de la amplificación por PCR cuantitativa a tiempo real para la secuencia diana de microARN miR-15a humano usando dos sondas de detección doblemente marcadas modificadas con LNA diferentes. Se diseñaron dos sondas de detección por PCR a tiempo real modificadas con LNA diferentes para la secuencia diana de microARN miR-15a humano usando las mismas sondas de etiquetado modificadas con LNA ligadas mediante el kit de ligación de ADN de T4 Quick. El uso de las sondas de detección modificadas con LNA EQ15866 (cuadrados rellenos) y EQ15867 (triángulos rellenos) en los ensayos de PCR a tiempo real dio como resultado valores de Ct de 38,2 y 32,2, respectivamente. No se detectaron señales a partir de ambos controles menos ligasa (EQ15866 cuadrados en blanco; EQ15867 triángulos en blanco).

La Fig. 6 muestra las representaciones de la amplificación por PCR cuantitativa a tiempo real para la secuencia diana de miR-15a humano usando diferentes proporciones molares entre la diana y las sondas de etiquetado de miR-15a. Las proporciones molares entre la diana y las sondas de etiquetado que eran de 1:1 (cuadrado relleno) dieron como resultado la mayor señal de fluorescencia de punto final (valor de ΔRn), mientras que las proporciones

molares de 1:5 (rombos en blanco) dieron como resultado la menor señal de punto final (valor de ΔR_n). Un exceso molar de las sondas de etiquetado de miR-15a (proporción molar de 1:5 (rombos rellenos)) también dio como resultado una señal de punto final específica, mientras que no se detectó señal de fluorescencia a partir del NTC en la reacción de PCR.

La Fig. 7 muestra las representaciones de la amplificación por PCR cuantitativa a tiempo real para la secuencia diana de miR-15a humano añadida a un fondo complejo de ARN total de levadura *Torulla* usando las sondas de etiquetado de miR-15a y la sonda de detección modificada con LNA de mejor modo. El microARN miR-15a se adicionó a 10 μ g de ARN total de levadura a concentraciones de 2,4 μ M (cuadrados en blanco) y 1 μ M (círculos en blanco), se apareó con las sondas de etiquetado de miR-15a a concentraciones equimolares, respectivamente, seguido de ligación y detección de miR-15a por PCR a tiempo real cuantitativa. La mayor señal de fluorescencia se observó a partir del control de secuencia diana de miR-15a (sin el fondo de ARN total de levadura complejo (cuadrados rellenos), mientras que no se detectaron señales de fluorescencia a partir de la muestra de ARN total de levadura (línea vertical). No se observó contaminación de los ensayos de PCR a tiempo real, como se demuestra con el NTC (cruces).

La Fig. 8 muestra la representación de la amplificación por PCR cuantitativa a tiempo real para la secuencia diana de microARN miR-15a humano. Las sondas de etiquetado de microARN modificadas con LNA específicas de secuencia se aparearon, se ligaron y los moldes ligados se detectaron posteriormente usando PCR a tiempo real, los cebadores de PCR de anclaje y detección con verde SYBR (cuadrados rellenos), usando un menos molde como control negativo (cruces). La especificidad de la reacción se ensayó usando una reacción sin ligasa (rombos en blanco).

La Fig. 9 es una presentación esquemática de un procedimiento de la invención para la cuantificación de microARN por RT-PCR cuantitativa a tiempo real específica de secuencia.

La Fig. 10 muestra las estructuras de nucleósidos de ADN, LNA y ARN.

La Fig. 11 es una presentación esquemática de un procedimiento de la invención para la cuantificación de microARN mediante RT-PCR cuantitativa a tiempo real específica de secuencia.

La Fig. 12 muestra las estructuras de nucleósidos de LNA 2,6-diaminopurina y LNA 2-tiotimidina.

Fig. 13. Muestra las representaciones de la amplificación por PCR cuantitativa a tiempo real para el microARN miR-15a humano usando una ligación con molde de microARN con tres parejas diferentes de sondas de etiquetado de miR-15a (I; EQ16311/EQ16452, II; EQ16453/EQ16307 y III; EQ164471EQ16307)). Pareja I: molde de miR-15a (cuadrados rellenos), sin molde (cuadrados en blanco) y sin ADN ligasa de T4 (rombos en blanco), pareja II: molde de miR-15a (triángulos rellenos), sin molde (triángulos en blanco) y sin ADN ligasa de T4 (línea de puntos), pareja III: molde de miR-15a (círculos rellenos), sin molde (círculos en blanco) y sin ADN ligasa de T4 (línea negra).

Fig. 14. Muestra las representaciones de la amplificación por PCR cuantitativa a tiempo real que demuestran una detección mejorada para el microARN miR-15a humano por ligación con molde de microARN y sondas de detección de miR-15a mejoradas con LNA 2,6-diaminopurina. La sonda de detección EQ16580 cuadrados rellenos, EQ16581 triángulos rellenos, EQ16582 círculos rellenos y EQ16583 cruces, y controles sin molde correspondientes; EQ16580 cuadrados en blanco, EQ16581 triángulos en blanco, EQ16582 círculos en blanco y EQ16583 línea negra.

Fig. 15. Curva patrón para el ensayo de PCR cuantitativa a tiempo real de miR-15a humano. Las sondas de etiquetado de microARN miR-15a humano modificadas con LNA EQ16311/EQ16452 (pareja I) se usaron en reacciones de ligación con molde de miR-15a, en las que la concentración de molde de miR-15a humano eran de 50, 5, 0,5, 0,05 ó 0,005 nM, respectivamente. Los moldes ligados se detectaron posteriormente usando PCR a tiempo real mediante los cebadores de PCR de anclaje y la sonda de detección doblemente marcada modificada con LNA EQ15866 para el microARN miR-15a usando un menos molde como control negativo. La representación de los valores del umbral de ciclo frente al logaritmo del número de copias de molde se usó para generar la curva patrón.

Fig. 16. Muestra las representaciones de la amplificación por PCR cuantitativa a tiempo real que demuestran la detección para el microARN miR-15a humano usando una reacción de RT-PCR con molde de microARN miR-15a y sondas de etiquetado ancladas modificadas con LNA diferentes y una sonda de detección doblemente marcada modificada con LNA. Se seleccionaron tres parejas diferentes de sondas de etiquetado de RT-PCR de microARN, pareja IV: EQ16591/EQ16311, molde de miR-15 (cuadrados rellenos), sin molde (marca negra); pareja V: EQ16591/EQ16314, molde de miR-15 (rombos rellenos), sin molde (triángulo en blanco); y pareja VI: EQ16589/EQ16314, molde de miR-15 (círculos rellenos), sin molde (línea negra). Los círculos en blanco representan el control de mezcla sin enzima de RT-PCR.

Fig. 17. Muestra las representaciones de la amplificación por PCR cuantitativa a tiempo real que demuestran una detección mejorada del miR-15a humano mediante reacción de RT-PCR con molde microARN usando sondas de detección de miR-15a mejoradas con LNA 2,6-diaminopurina. Las sondas de detección doblemente marcadas diferentes se muestran a continuación: sondas de detección EQ16580 (triángulos rellenos), EQ16581 (cuadrados rellenos), EQ16582 (cuadrados rellenos) y control negativo sin molde (línea continua).

Fig. 18. Curva patrón para el ensayo de PCR cuantitativa a tiempo real de miR-15a humano. Las sondas de etiquetado de microARN modificadas con LNA EQ16624/EQ16620 (pareja VII) para miR-15a humano se usaron como cebador de transcripción inversa (sonda de etiquetado de RT) y sonda de etiquetado de 2ª cadena. Las reacciones de RT-PCR se realizaron con una concentración variable de molde de miR-15a de 50, 5, 0,5, 0,05 ó 0,005 nM, respectivamente. El miR-15a se detectó posteriormente usando PCR a tiempo real usando los cebadores de PCR de anclaje y una sonda de detección doblemente marcada modificada con LNA (EQ16582) para el microARN miR-15a. La representación de los valores del umbral de ciclo frente al logaritmo del número de copias de molde se usó para generar la curva patrón.

Fig. 19. Muestra las representaciones de la amplificación por PCR cuantitativa a tiempo real que demuestran la detección del miR-15a humano mediante reacción de RT-PCR con molde de microARN usando temperaturas de apareamiento variadas de 60°C (triángulos rellenos), 55°C (cuadrados rellenos) y 50°C (rombos rellenos). No se detectaron señales para el control de mezcla sin enzima de RT-PCR y el control negativo sin molde.

Fig. 20. Muestra las representaciones de la amplificación por PCR cuantitativa a tiempo real que demuestran la detección para el microARN miR-15a humano usando una reacción de RT-PCR con molde de microARN miR-15a y sondas de detección doblemente marcadas modificadas con LNA diferentes. Las sondas de detección doblemente marcadas diferentes se muestran a continuación: sonda de detección y PCR a tiempo real con molde de miR-15a EQ16582 (triángulos rellenos), sonda de detección y PCR a tiempo real con molde de miR-16 desordenada EQ16582 (triángulos en blanco), sonda de detección y PCR a tiempo real con molde de miR-15a EQ16679 (círculos rellenos), sonda de detección y PCR a tiempo real con molde de miR-16 desordenada EQ16679 (círculos en blanco), y no se detectaron señales para los controles de mezcla sin enzima de RT-PCR y los controles negativos sin molde.

Fig. 21. Muestra las representaciones de la amplificación por PCR cuantitativa a tiempo real que demuestran la detección para el microARN miR-15a humano usando reacción de PCR y RT con molde de microARN miR-15a y sondas de etiquetado ancladas modificadas con LNA y una sonda de detección doblemente marcada modificada con LNA. Las muestras se muestran de la forma siguiente: PCR a tiempo real con molde de miR-15a (triángulos rellenos), PCR a tiempo real con molde de miR-16 desordenada (cuadrados rellenos), el control negativo sin Superscript III (cuadrados en blanco) y el control negativo sin molde (triángulos en blanco).

La Fig. 22 es una presentación esquemática de un procedimiento de la invención para la cuantificación de microARN por RT-PCR cuantitativa a tiempo real específica de secuencia.

Fig. 23. Muestra las representaciones de la amplificación por PCR cuantitativa a tiempo real que demuestran una detección mejorada del miR-15a humano por reacción de RT-PCR con molde de microARN usando sondas de detección de miR-15a mejoradas con LNA 2,6-diaminopurina. Las gráficas representan la diana de microARN miR-15a (círculos en blanco) en comparación con la diana de miR-16 (triángulos rellenos) que tiene una identidad de secuencia del 72% con la secuencia diana de miR-15a. Los controles negativos eran sin sonda de etiquetado bloqueada de microARN (triángulos en blanco), sin sonda de etiquetado con LNA de segunda cadena (cuadrados rellenos) y sin enzima Fragmento Klenow (3' → 5' exo-) (cuadrados en blanco), mientras que no eran detectables valores de Ct para el control sin cebador inverso 2 de hsa-miR-15a (línea) o el control de mezcla sin enzima de RT-PCR OneStep de Qiagen (línea) en la reacción de PCR a tiempo real.

Fig. 24. Las representaciones de la amplificación y la curva patrón (gráfica pequeña) para el ensayo de PCR cuantitativa a tiempo real de miR-15a humano. Las sondas de etiquetado de microARN miR-15a humano modificadas con LNA EQ1695 y EQ16624 (pareja IX) se usaron en reacciones de RT-PCR con molde de miR-15a con una sonda de etiquetado modificada con LNA bloqueada en 3' como captura, en las que el molde de miR-15a humano maduro era de 500, 50, 5, 0,5 ó 0,05 fmol, respectivamente, en las reacciones individuales. Los moldes se detectaron posteriormente usando PCR a tiempo real mediante los cebadores de PCR de anclaje y la sonda de detección doblemente marcada modificada con LNA EQ15866 para el microARN miR-15a usando un menos molde como control negativo. La representación de los valores del umbral de ciclo frente al logaritmo del número de copias de molde se usó para generar la curva patrón.

Fig. 25. Muestra las representaciones de la amplificación por PCR cuantitativa a tiempo real que demuestran la detección de la reacción de RT-PCR con molde de ARNnp U6 humano usando sonda de detección de LNA, 1 µl de molde de ADNc (cuadrados rellenos), 5 µl de ADNc (cuadrados en blanco) y control negativo sin molde (triángulos en blanco).

La Fig. 26 muestra las representaciones de la amplificación por PCR cuantitativa a tiempo real que demuestran que la detección de la RT-PCR con molde de hsa miR-7a producía una representación de amplificación sigmoidea con cantidad abundante de señal y un valor de Ct de 18,5.

La Fig. 27 es una presentación esquemática de un procedimiento de la invención para la cuantificación de microARN por RT-PCR cuantitativa a tiempo real específica de secuencia.

La Fig. 28 es una presentación esquemática de un procedimiento de la invención para la cuantificación de microARN

por RT-PCR cuantitativa a tiempo real específica de secuencia.

La Fig. 29 muestra parte de la secuencia precursora de Hsa miR-15a, la secuencia de Hsa miR-15a maduro y una presentación esquemática de un procedimiento de la invención para la cuantificación de microARN por RT-PCR cuantitativa a tiempo real específica de secuencia.

- 5 La Fig. 30 muestra parte de la secuencia precursora de Hsa miR-143, la secuencia de Hsa miR-143 maduro y una presentación esquemática de un procedimiento de la invención para la cuantificación de microARN por RT-PCR cuantitativa a tiempo real específica de secuencia.

La Fig. 31 es una presentación esquemática de un procedimiento de la invención para la cuantificación de microARN por RT-PCR cuantitativa a tiempo real específica de secuencia.

- 10 La Fig. 32 muestra la representación de la amplificación por PCR cuantitativa a tiempo real para la secuencia diana de microARN miR 143 humano. El ensayo se realizó de acuerdo con la representación esquemática de la Figura 31 y como se describe en el Ejemplo 30. Los cuadrados en blanco representan la reacción con purificación de la etapa 2 del Ejemplo 30, los cuadrados rellenos representan la reacción sin purificación de la etapa 2 del Ejemplo 30. Las curvas que no surgen de las medidas basales representan los controles "sin miR" correspondientes.

- 15 La Fig. 33 muestra una presentación esquemática de un procedimiento de la invención para la cuantificación de microARN por RT-PCR cuantitativa a tiempo real específica de secuencia.

La Fig. 34 muestra parte de la secuencia precursora de Hsa miR-143, la secuencia de Hsa miR-143 maduro y una presentación esquemática de un procedimiento de la invención para la cuantificación de microARN por RT-PCR cuantitativa a tiempo real específica de secuencia.

- 20 La Fig. 35 muestra las representaciones de la amplificación por PCR cuantitativa a tiempo real que demuestran la ligación de un adaptador de ARN a microARN maduro, seguida de transcripción inversa y PCR a tiempo real usando una sonda de detección modificada con LNA con inactivador Q2. El hsa-let-7a cuadrados en blanco, el hsa-let-7g cuadrados rellenos, sin miARN triángulos en blanco y control sin molde de PCR triángulos rellenos.

- 25 La Fig. 36 muestra una presentación esquemática de un procedimiento de la invención para la cuantificación de microARN por RT-PCR cuantitativa a tiempo real específica de secuencia.

La Fig. 37 muestra una presentación esquemática de un procedimiento de la invención para la cuantificación de microARN por RT-PCR cuantitativa a tiempo real específica de secuencia.

Definiciones

- 30 Para los fines de la posterior descripción detallada de la invención se proporcionan las definiciones siguientes para términos específicos que se usan en la divulgación de la presente invención:

- 35 En lo siguiente, la expresión "sonda de bloqueo" o "sondas de bloqueo" se refiere a una sonda o sondas que comprenden una secuencia de reconocimiento complementaria a la secuencia diana, por ejemplo, una secuencia diana de ARN corto, un oligonucleótido, un cebador. Dicha sonda de bloqueo se usa para prevenir la hibridación de moléculas de idéntica secuencia hacia la secuencia diana complementaria. En general, la sonda de bloqueo contiene uno, dos o más monómeros de LNA y el extremo 3'-terminal de la sonda de bloqueo se modifica para prohibir la incorporación de la sonda de bloqueo en un producto de extensión de cebador. Este "bloqueo" puede conseguirse mediante el uso de bases no complementarias o por adición de un resto químico, tal como biotina, o un grupo fosfato al grupo 3'-hidroxilo del último nucleótido.

- 40 En lo siguiente, el término "dNTP" significa una mezcla de 2'-desoxiadenosina-5'-trifosfato, 2'-desoxicitidina-5'-trifosfato, 2'-desoxiguanosina-5'-trifosfato y 2'-desoxitimidina-5'-trifosfato.

- 45 La expresión "cebador de RT" se refiere a un cebador que comprende una secuencia de reconocimiento, complementaria a una secuencia en la secuencia de ácido ribonucleico y/o desoxirribonucleico diana, por ejemplo, con el extremo 3' del microARN maduro o ARNip, o con un resto químico de ARN-ADN, o con una secuencia localizada 3' a un nucleótido de ARN editado, unión de corte y empalme, polimorfismo de un solo nucleótido o mutación puntual en la secuencia de ácido ribonucleico diana, y una secuencia de anclaje esencial para la posterior captura o amplificación por PCR. Dicho cebador de RT se usa como un cebador anclado en una reacción de transcripción inversa para generar un producto de extensión de cebadores complementario a la secuencia de ARN diana usando una enzima transcriptasa inversa.

- 50 La expresión "sondas de captura" o "sonda de captura" se refiere a una sonda o sondas que comprenden una secuencia de reconocimiento complementaria a la secuencia diana, por ejemplo, una secuencia diana de ARN corto y una secuencia de anclaje esencial para la posterior captura, reacción de transcripción inversa o amplificación por PCR. La secuencia de anclaje funciona como sitios de cebado para los cebadores de RT o PCR en la posterior reacción de transcripción inversa, PCR a tiempo real o como etiquetas para ensayos de captura.

En el presente contexto, el término “engarce” significa un grupo generador de distancia termoquímicamente y fotoquímicamente inactivo que se usa para unir dos o más restos de nucleótidos diferentes de los tipos definidos anteriormente. Los engarces se seleccionan basándose en una diversidad de características incluyendo su hidrofobicidad, hidrofiliidad, flexibilidad molecular y longitud (por ejemplo, véase Hermanson y col., “Immobilized Affinity Ligand Techniques”, Academic Press, San Diego, California (1992), pág. 137-ff). En general, la longitud de los engarces es inferior a o de aproximadamente 400 angströms, en algunas aplicaciones preferentemente inferior a 100 angströms. El engarce, por lo tanto, comprende una cadena de átomos de carbono opcionalmente interrumpida o terminada con uno o más heteroátomos, tales como átomos de oxígeno, átomos de nitrógeno y/o átomos de azufre. Por lo tanto, el engarce puede comprender una o más funcionalidades amida, éster, amino, éter y/o tioéter y, opcionalmente, hidrocarburos aromáticos o mono/poliinsaturados, polioxietileno tal como polietilenglicol, oligo/poliamidas tales como poli-(3-alanina, poliglicina, polilisina y péptidos en general, oligosacáridos, oligo/polifosfatos. Además el engarce puede consistir en unidades combinadas de los mismos. La longitud del engarce puede variar, teniendo en cuenta la colocación y orientación espacial deseadas o necesarias de la parte “activa/funcional” del grupo en cuestión en relación con el anillo de 5 ó 6 miembros. En realizaciones particularmente interesantes, el engarce incluye un grupo químicamente escindible. Los ejemplos de dichos grupos químicamente escindibles incluyen grupos disulfuro escindibles en condiciones reductoras, fragmentos peptídicos escindibles por peptidasas, etc.

En el presente contexto, un “soporte sólido” puede seleccionarse de una amplia variedad de materiales poliméricos, por ejemplo, CPG (vidrio de tamaño de poro controlado), polipropileno, poliestireno, policarbonato o polietileno, y puede adoptar una diversidad de formas tales como un tubo, una placa de pocillos de microtitulación, una barra, una perla, una partícula, un filtro, etc. El oligonucleótido puede inmovilizarse en el soporte sólido mediante su extremo 5' o 3' (o mediante el extremo terminal de un engarce unido al extremo 5' o 3') por una diversidad de procedimientos químicos o fotoquímicos habitualmente empleados en la inmovilización de oligonucleótidos o por acoplamiento no covalente, por ejemplo, mediante la unión de un oligonucleótido biotinilado a estreptavidina inmovilizada.

Un “cebador con bucle” se refiere a una sonda que comprende una secuencia de reconocimiento complementaria a una secuencia en la secuencia de ácido desoxirribonucleico diana, siendo dicha secuencia de reconocimiento complementaria a la secuencia de nucleótidos extendida con transcriptasa inversa correspondiente al extremo 5' del microARN maduro o ARNip o localizada 5' al nucleótido de ARN editado, unión de corte y empalme, polimorfismo de un solo nucleótido o mutación puntual en la secuencia diana de ácido ribonucleico inicial, y una secuencia de anclaje esencial para la posterior captura o amplificación por PCR. Dicho cebador con bucle se usa como cebador de anclaje para generar la segunda cadena de ácido nucleico, que es complementaria al producto de extensión de cebadores. Otro aspecto del cebador con bucle es que la secuencia de anclaje forma una estructura de horquilla intramolecular a la temperatura de ensayo seleccionada mediada por secuencias complementarias en el extremo 5' y 3' del oligonucleótido. La especificidad de la reacción se basa en el uso secuencial de las dos sondas de etiquetado ancladas con secuencias de reconocimiento no solapantes, hibridación con regiones de extremo 3' y extremo 5' complementarias del ARN diana y secuencias de ADN complementarias, respectivamente.

Una “estructura de horquilla” se refiere a una estructura intramolecular de un oligonucleótido a la temperatura de ensayo seleccionada mediada por la hibridación de secuencias complementarias en el extremo 5' y 3' del oligonucleótido.

“U” se refiere a una unidad de enzima definida como la cantidad de enzima necesaria para convertir una cantidad dada de reactivos en un producto usando un tiempo y una temperatura definidos.

En el presente contexto, el término “ligando” significa algo que se une. Los ligandos comprenden biotina y grupos funcionales tales como: grupos aromáticos (tales como benceno, piridina, naftaleno, antraceno y fenantreno), grupos heteroaromáticos (tales como tiofeno, furano, tetrahidrofurano, piridina, dioxano y pirimidina), ácidos carboxílicos, ésteres de ácido carboxílico, haluros del ácido carboxílico, azidas del ácido carboxílico, hidrazidas del ácido carboxílico, ácidos sulfónicos, ésteres del ácido sulfónico, haluros del ácido sulfónico, semicarbazidas, tiosemicarbazidas, aldehídos, cetonas, alcoholes primarios, alcoholes secundarios, alcoholes terciarios, fenoles, haluros de alquilo, tioles, disulfuros, aminas primarias, aminas secundarias, aminas terciarias, hidrazinas, epóxidos, maleimidas, grupos alquilo C₁-C₂₀ opcionalmente interrumpidos o terminados con uno o más heteroátomos tales como átomos de oxígeno, átomos de nitrógeno y/o átomos de azufre, que contienen opcionalmente hidrocarburos aromáticos o mono/poliinsaturados, polioxietileno tal como polietilenglicol, oligo/poliamidas tales como poli-β-alanina, poliglicina, polilisina, péptidos, oligo/polisacáridos, oligo/polifosfatos, toxinas, antibióticos, venenos celulares y esteroides, y también “ligandos de afinidad”, es decir, grupos funcionales o biomoléculas que tienen una afinidad específica por sitios en proteínas particulares, anticuerpos, poli- y oligosacáridos y otras biomoléculas.

Las formas en singular “un”, “uno/a” y “el/la” incluyen referencias al plural a menos que el contexto dicte claramente otra cosa. Por ejemplo, el término “una célula” incluye una pluralidad de células, incluyendo mezclas de las mismas. La expresión “una molécula de ácido nucleico” incluye una pluralidad de moléculas de ácido nucleico.

El término “transcriptoma” se refiere a una colección completa de unidades de transcripción del genoma de cualquier especie. Además de ARNm codificantes de proteínas, también representa ARN no codificantes, tales como ARN nucleolares pequeños, ARNip, microARN y ARN antisentido, que comprenden papeles estructurales y reguladores

importantes en la célula.

El término “amplicón” se refiere a fragmentos de ADN replicantes pequeños.

El término “muestra” se refiere a una muestra de células, o tejido o fluido aislado de un organismo u organismos, incluyendo, pero sin limitación, por ejemplo, piel, plasma, suero, líquido cefalorraquídeo, fluido linfático, fluido sinovial, orina, lágrimas, células sanguíneas, órganos, tumores, y también a muestras de constituyentes de cultivo celular *in vitro* (incluyendo, pero sin limitación, el medio acondicionado resultante del crecimiento de células en medio de cultivo celular, células recombinantes y componentes celulares).

Un “organismo” se refiere a una entidad viva, incluyendo pero sin limitación, por ejemplo, seres humanos, ratón, rata, *Drosophila*, *C. elegans*, levadura, *Arabidopsis thaliana*, maíz, arroz, pez cebra, primates, animales domésticos, etc.

Las “sondas de etiquetado” o “sonda de etiquetado” se refieren a una sonda o sondas que comprenden una secuencia de reconocimiento complementaria a la secuencia diana, por ejemplo, una secuencia diana de ARN corto y una secuencia de anclaje esencial para la posterior captura o amplificación por PCR. Las expresiones “dos sondas de etiquetado” o una “pareja de sondas de etiquetado” se refieren a dos sondas de etiquetado ancladas, cada una diseñada para detectar en combinación una secuencia diana complementaria corta, por ejemplo, una secuencia de ARN corto, donde la secuencia de reconocimiento de la primera sonda de etiquetado hibrida con una primera región dentro de una secuencia diana y la secuencia de reconocimiento de la segunda sonda de etiquetado hibrida con una segunda región dentro de la misma secuencia diana complementaria, por ejemplo, una secuencia diana de ARN corto que es adyacente a la primera región. En el procedimiento de la invención, una de las sondas de etiquetado está 5'-fosforilada, permitiendo el acoplamiento covalente de las dos sondas oligonucleotídicas de etiquetado no solapantes contiguas hibridadas con la secuencia diana complementaria mediante una ligasa para formar una sola secuencia oligonucleotídica. Las secuencias de anclaje unidas a las sondas de etiquetado se diseñan de modo que no presenten hibridación cruzada con ningún ácido nucleico diana en un transcriptoma dado, o entre sí en las condiciones de hibridación usadas en el procedimiento de la invención. Las secuencias de anclaje funcionan como sitios de cebado para los cebadores de PCR en la PCR cuantitativa a tiempo real posterior, o como etiquetas para ensayos de captura.

La expresión “sonda de etiquetado de RT” se refiere a una sonda que comprende una secuencia de reconocimiento complementaria a una secuencia en la secuencia de ácido ribonucleico diana, por ejemplo, al extremo 3' del microARN maduro o ARNip, o a una secuencia localizada 3' a un nucleótido de ARN editado, unión de corte y empalme, polimorfismo de un solo nucleótido o mutación puntual en la secuencia de ácido ribonucleico diana, y una secuencia de anclaje esencial para la posterior captura o amplificación por PCR. Dicha sonda de etiquetado de RT se usa como cebador anclado en una reacción de transcripción inversa para generar un producto de extensión de cebadores, complementario a la secuencia de ARN diana usando una enzima transcriptasa inversa. La expresión “sonda de etiquetado de 2ª cadena” se refiere a una sonda de etiquetado anclada, cuya secuencia de reconocimiento es complementaria a la secuencia de nucleótidos extendida con transcriptasa inversa correspondiente al extremo 5' del microARN maduro o ARNip, o localizada 5' al nucleótido de ARN editado, unión de corte y empalme, polimorfismo de un solo nucleótido o mutación puntual en la secuencia diana de ácido ribonucleico inicial. La sonda de etiquetado de 2ª cadena se usa como cebador anclado para generar la segunda cadena de ácido nucleico, que es complementaria al producto de extensión de cebadores. La especificidad de la reacción se basa en el uso secuencial de las dos sondas de etiquetado ancladas con secuencias de reconocimiento no solapantes, hibridación con regiones de extremo 3' y extremo 5' complementarias del ARN diana y secuencias de ADN complementarias, respectivamente.

Las expresiones “dos sondas de etiquetado” o una “pareja de sondas de etiquetado” se refieren a dos sondas de etiquetado ancladas, cada una diseñada para detectar en combinación una secuencia diana complementaria corta, por ejemplo, una secuencia de ARN corto, en las que la secuencia de reconocimiento de la primera sonda de etiquetado hibrida con una primera región dentro de una secuencia diana y la secuencia de reconocimiento de la sonda de etiquetado de 2ª cadena reconoce una secuencia que es complementaria a la secuencia de nucleótidos extendida con transcriptasa inversa correspondiente al extremo 5' del microARN maduro o ARNip, o localizada 5' al nucleótido de ARN editado, unión de corte y empalme, polimorfismo de un solo nucleótido o mutación puntual en la secuencia diana de ácido ribonucleico inicial. La sonda de etiquetado de 2ª cadena se usa como cebador anclado para generar la segunda cadena de ácido nucleico, que es complementaria al producto de extensión de cebadores.

Las secuencias de anclaje unidas a cada de las dos sondas de etiquetado se diseñan de modo que no presenten hibridación cruzada con ningún ácido nucleico diana en un transcriptoma dado o entre sí en las condiciones de hibridación usadas en el procedimiento de la invención. Las secuencias de anclaje funcionan como sitios de cebado para los cebadores de PCR en la PCR cuantitativa a tiempo real posterior, o como etiquetas para ensayos de captura.

El término “cebador” puede referirse a más de un cebador, y se refiere a un oligonucleótido, ya sea de origen natural, como en una digestión de restricción purificada o producido sintéticamente, que es capaz de actuar como punto de inicio de la síntesis a lo largo de una cadena complementaria cuando se pone en condiciones en las que se cataliza la síntesis de un producto de extensión de cebadores que es complementario a una cadena de ácido

nucleico. Dichas condiciones incluyen la presencia de cuatro desoxirribonucleósidos trifosfato diferentes y un agente inductor de la polimerización tal como ADN polimerasa o transcriptasa inversa, en un tampón adecuado (el término “tampón” incluye sustituyentes que son cofactores o que afectan al pH, a la fuerza iónica, etc.) y a una temperatura adecuada. El cebador es preferentemente monocatenario para una eficacia máxima en la amplificación mediante una polimerasa o transcriptasa inversa en un tampón adecuado (el término “tampón” incluye sustituyentes que son cofactores o que afectan al pH, a la fuerza iónica, etc.) y a una temperatura adecuada. El cebador es preferentemente monocatenario para una eficacia máxima en la amplificación.

Las expresiones “sondas de detección” o “sonda de detección” se refieren a un oligonucleótido marcado que forma una estructura de dúplex con una secuencia dentro del ácido nucleico diana amplificado, por ejemplo, secuencia diana de ARN corto, debido a la complementariedad de la sonda con una secuencia en la región diana. La sonda de detección, preferentemente, no contiene una secuencia complementaria a una secuencia o secuencias usadas para cebar la reacción en cadena de la polimerasa. Generalmente, el extremo 3' terminal de la sonda estará “bloqueado” para prohibir la incorporación de la sonda en un producto de extensión de cebadores. El “bloqueo” puede conseguirse usando bases no complementarias o por adición de un resto químico tal como biotina o un grupo fosfato al 3'-hidroxilo del último nucleótido, que puede servir, dependiendo del resto seleccionado, para un doble propósito actuando también como marcador.

Los términos “miARN” y “microARN” se refieren a ARN no codificantes de 21-25 nt derivados de genes endógenos. Se procesan a partir de precursores de tipo horquilla más largos (aproximadamente 75 nt) denominados pre-miARN. Los microARN se ensamblan en complejos denominados miRNP y reconocen sus dianas por complementariedad antisentido. Si los microARN coinciden al 100% con su diana, es decir, la complementariedad es completa, el ARNm diana se escinde y el miARN actúa como un ARNip. Si la coincidencia es incompleta, es decir, la complementariedad es parcial, entonces la traducción del ARNm diana se bloquea.

Las expresiones “ARN interferentes pequeños” o “ARNip” se refieren a ARN de 21-25 nt derivados del procesamiento de ARN bicatenarios lineales. Los ARNip se ensamblan en complejos denominados RISC (complejo de silenciamiento inducido por ARN) y secuencias de ARN homólogas diana para escisión endonucleolítica. Los ARNip sintéticos también reclutan RISC y son capaces de escindir secuencias de ARN homólogas.

La expresión “interferencia de ARN” (iARN) se refiere a un fenómeno en el que ARN bicatenario homólogo a un ARNm diana conduce a la degradación del ARNm diana. Más ampliamente definido como degradación de ARNm diana por ARNip homólogos.

La expresión “secuencia de reconocimiento” se refiere a una secuencia de nucleótidos que es complementaria a una región dentro de la secuencia de nucleótidos diana esencial para la hibridación específica de secuencia entre la secuencia de nucleótidos diana y la secuencia de reconocimiento. Las sondas de etiquetado, así como las sondas de detección de la invención contienen una secuencia de reconocimiento específica de secuencia diana.

La expresión “secuencias de anclaje” se refiere a dos secuencias de nucleótidos unidas de forma contigua a la pareja de sondas de etiquetado, estando dichas secuencias de anclaje diseñadas de modo que no presenten hibridación cruzada entre sí o con una secuencia de nucleótidos diana o cualquier secuencia de nucleótidos en la muestra de ácido nucleico que contiene la secuencia de nucleótidos diana.

El término “marcador”, como se usa en el presente documento, se refiere a cualquier átomo o molécula que puede usarse para proporcionar una señal detectable (preferentemente cuantificable) y que puede unirse a un ácido nucleico o proteína. Los marcadores pueden proporcionar señales detectables por fluorescencia, radiactividad, colorimétricas, difracción de rayos X o absorción, magnetismo, actividad enzimática y similares.

Un marcador es un grupo indicador detectable de por sí o como parte de una serie de detección. Son ejemplos de partes funcionales de grupos indicadores biotina, digoxigenina, grupos fluorescentes (grupos que son capaces de absorber radiación electromagnética, por ejemplo, luz o rayos X, de una cierta longitud de onda, y que posteriormente reemiten la energía absorbida como radiación de mayor longitud de onda; son ejemplos ilustrativos DANSYL (5-dimetilamino)-1-naftalenosulfonilo), DOXYL (N-oxil-4,4-dimetiloxazolidina), PROXYL (N-oxil-2,2,5,5-tetrametilpirrolidina), TEMPO (N-oxil-2,2,6,6-tetrametilpiperidina), dinitrofenilo, acridinas, cumarinas, Cy3 y Cy5 (marcas comerciales para Biological Detection Systems, Inc.), eritrosina, ácido cumárico, umbeliferona, rojo Texas, rodamina, tetrametil rodamina, Rox, 7-nitrobenzo-2-oxa-1-diazol (NBD), pireno, fluoresceína, Europio, Rutenio, Samario y otros metales de tierras raras), marcadores radioisotópicos, marcadores quimioluminiscentes (marcadores que son detectables mediante la emisión de luz durante una reacción química), marcadores de espín (un radical libre (por ejemplo, nitróxidos orgánicos sustituidos) u otras sondas paramagnéticas (por ejemplo, Cu^{2+} , Mg^{2+}) unidas a una molécula biológica que es detectable mediante el uso de espectroscopía de resonancia de espín electrónico). Son ejemplos especialmente interesantes biotina, fluoresceína, Rojo Texas, rodamina, dinitrofenilo, digoxigenina, Rutenio, Europio, Cy5, Cy3, etc.

Las expresiones “ligación” o “acoplamiento covalente” se refieren al acoplamiento covalente de dos secuencias de nucleótidos adyacentes, por ejemplo, las secuencias de sondas oligonucleotídicas de etiquetado de la invención, para formar una sola secuencia de nucleótidos. La reacción está catalizada por la enzima ligasa, que forma un

enlace fosfodiéster entre el extremo 5' de una secuencia de nucleótidos y el extremo 3' de la secuencia de nucleótidos adyacente, por ejemplo, entre las dos sondas de etiquetado adyacentes de la invención, apareadas con su secuencia de ácido nucleico diana complementaria.

La expresión "ligación de oligonucleótido con molde de ARN" se refiere al acoplamiento covalente de dos secuencias de sondas oligonucleotídicas adyacentes apareadas con una secuencia diana de ARN complementaria para formar una sola secuencia de nucleótidos. La reacción está catalizada por la enzima ligasa, que forma un enlace fosfodiéster entre el extremo 5' de una secuencia de nucleótidos y el extremo 3' de la secuencia de nucleótidos adyacente, por ejemplo, entre las dos sondas de etiquetado adyacentes de la invención.

Las expresiones "reacción de PCR", "amplificación por PCR", "PCR", "pre-PCR" y "PCR cuantitativa a tiempo real" son expresiones intercambiables usadas para significar el uso de un sistema de amplificación de ácido nucleico que multiplica los ácidos nucleicos diana que se detectan. Los ejemplos de dichos sistemas incluyen el sistema de reacción en cadena de la polimerasa (PCR) y el sistema de reacción en cadena de la ligasa (LCR). Otros procedimientos descritos recientemente y conocidos por los expertos en la materia son la amplificación basada en la secuencia de ácido nucleico (NASBA™, Cangene, Mississauga, Ontario) y los sistemas de Q beta replicasa. Los productos formados por dicha reacción de amplificación pueden o no controlarse a tiempo real, o sólo después de la reacción como medición de punto final.

Como se usan en el presente documento, los términos "ácido nucleico", "polinucleótido" y "oligonucleótido" se refieren a cebadores, sondas, fragmentos oligoméricos a detectar, controles oligoméricos y oligómeros de bloqueo sin marcar, y serán genéricos para polidesoxirribonucleótidos (que contienen 2-desoxi-D-ribosa), polirribonucleótidos (que contienen D-ribosa) y cualquier otro tipo de polinucleótido que sea un N-glicósido de una base de purina o pirimidina, o bases de purina o pirimidina modificadas. No se pretende ninguna distinción en longitud entre los términos "ácido nucleico", "polinucleótido" y "oligonucleótido", y estos términos se usarán indistintamente. Estos términos se refieren solamente a la estructura primaria de la molécula. Por lo tanto, estos términos incluyen ADN bi- y monocatenario, así como ARN bi- y monocatenario. El oligonucleótido está compuesto por una secuencia de aproximadamente al menos 3 nucleótidos, preferentemente al menos aproximadamente 6 nucleótidos y, más preferentemente, al menos aproximadamente 8-30 nucleótidos correspondientes a una región de la secuencia de nucleótidos diana designada. El término "correspondiente" significa idéntico a o complementario a la secuencia designada. El oligonucleótido no procede necesariamente físicamente de cualquier secuencia natural o existente, sino que puede generarse de cualquier forma, incluyendo síntesis química, replicación de ADN, transcripción inversa o una combinación de las mismas.

Los términos "oligonucleótido" o "ácido nucleico" se dirigen a un polinucleótido de ADN genómico o ARN, ADNc, de origen semisintético o sintético que, en virtud de su origen o manipulación: (1) no está asociado con todo o una porción del polinucleótido con el que está asociado en la naturaleza; y/o (2) está unido a un polinucleótido distinto de aquel con el que está unido en la naturaleza; y (3) no se encuentra en la naturaleza. Debido a que los mononucleótidos se hacen reaccionar para generar oligonucleótidos de una forma tal que el fosfato 5' de un anillo de pentosa de mononucleótido se une al oxígeno 3' de su vecino en una dirección mediante un enlace fosfodiéster, un extremo de un oligonucleótido se denomina "extremo 5'" si su fosfato 5' no está unido al oxígeno 3' de un anillo de pentosa de mononucleótido, y "extremo 3'" si su oxígeno 3' no está unido a un fosfato 5' de un anillo de pentosa de mononucleótido posterior. Como se usa en el presente documento, una secuencia de ácido nucleico, incluso si es interna a un oligonucleótido de mayor tamaño, también puede decirse que tiene extremos 5' y 3'. Cuando dos oligonucleótidos no solapantes diferentes se aparean con diferentes regiones de la misma secuencia de ácido nucleico complementaria lineal, el extremo 3' de un oligonucleótido apunta hacia el extremo 5' del otro; el primero puede denominarse oligonucleótido "cadena arriba" y el último oligonucleótido "cadena abajo".

Mediante las expresiones "nucleobases SBC" se entienden nucleobases "complementarias de unión selectiva", es decir, nucleobases modificadas que pueden estabilizar enlaces de hidrógeno con sus nucleobases complementarias, pero son incapaces de estabilizar enlaces de hidrógeno con otras nucleobases SBC. Como ejemplo, la nucleobase SBC A' puede generar una pareja unida por enlace de hidrógeno estable con su nucleobase no modificada complementaria, T. Asimismo, la nucleobase SBC T' puede generar una pareja unida por enlace de hidrógeno estable con su nucleobase no modificada complementaria, A. Sin embargo, las nucleobases SBC A' y T' formarán una pareja unida por enlace de hidrógeno inestable en comparación con los pares de bases A'-T y A-T'. Asimismo, una nucleobase SBC de C se denomina C' y puede generar una pareja unida por enlace de hidrógeno estable con su nucleobase no modificada complementaria G, y una nucleobase SBC de G se denomina G' y puede generar una pareja unida por enlace de hidrógeno estable con su nucleobase no modificada complementaria C, aunque C' y G' formarán una pareja unida por enlace de hidrógeno inestable en comparación con los pares de bases C'-G y C-G'. Se obtiene una pareja unida por enlace de hidrógeno estable cuando se forman 2 o más enlaces de hidrógeno, por ejemplo, la pareja entre A' y T, A y T', C y G' y C' y G. Se obtiene una pareja unida por enlace de hidrógeno inestable cuando se forma 1 o ningún enlace de hidrógeno, por ejemplo, la pareja entre A' y T', y C' y G'. Son nucleobases SBC especialmente interesantes 2,6-diaminopurina (A', también denominada D) junto con 2-tio-uracilo (U', también denominado ²⁵U) (2-tio-4-oxo-pirimidina) y 2-tiotimina (T', también denominada ²⁵T) (2-tio-4-oxo-5-metil-pirimidina). La Fig. 4 ilustra que las parejas A'-²⁵T y D-T tienen 2 o más de 2 enlaces de hidrógeno, mientras que la pareja D-²⁵T forma un solo enlace de hidrógeno (inestable). Asimismo, las nucleobases SBC pirrolo-[2,3-d]pirimidina-2(3H)-ona (C', también denominada PyrroloPyr) e hipoxantina (G', también denominada 1) (6-oxo-purina) se

muestran en la Fig. 9, donde las parejas PyrroloPyr-G y C-1 tienen 2 enlaces de hidrógeno cada una, mientras que la pareja PyrroloPyr-I forma un solo enlace de hidrógeno.

La expresión "oligómero de LNA SBC" se refiere a un "oligómero de LNA" que contiene al menos un monómero de LNA en el que la nucleobase es una "nucleobase SBC". Por "monómero de LNA con una nucleobase SBC" se entiende un "monómero de LNA SBC". Hablando en general, los oligómeros de LNA SBC incluyen oligómeros que aparte del monómero o monómeros de LNA SBC contienen otros nucleótidos o nucleósidos de origen natural o modificados. Por "monómero SBC" se entiende un monómero distinto de LNA con una nucleobase SBC. Por "oligonucleótido isosecuencial" se entiende un oligonucleótido con la misma secuencia en un sentido Watson-Crick que el oligonucleótido modificado correspondiente, por ejemplo, la secuencia agTtcATg es igual a agTscD²⁵Ug, donde s es igual al monómero de ADN SBC 2-tio-t o 2-tio-u, D es igual al monómero de LNA SBC LNA-D y ²⁵U es igual al monómero de LNA SBC LNA ²⁵U.

La complementaria a una secuencia de ácido nucleico, como se usa en el presente documento, se refiere a un oligonucleótido que, cuando se alinea con la secuencia de ácido nucleico de modo que el extremo 5' de una secuencia se empareja con el extremo 3' de la otra, está en "asociación antiparalela". Pueden incluirse bases que no se encuentran comúnmente en ácidos nucleicos naturales en los ácidos nucleicos de la presente invención e incluyen, por ejemplo, inosina y 7-desazaguanina. La complementariedad puede no ser perfecta; los dúplex estables pueden contener pares de bases emparejadas erróneamente o bases no emparejadas. Los expertos en la materia de la tecnología de ácidos nucleicos pueden determinar empíricamente la estabilidad de dúplex considerando varias variables incluyendo, por ejemplo, la longitud del oligonucleótido, el porcentaje de concentración de bases de citosina y guanina en el oligonucleótido, la fuerza iónica y la incidencia de pares de bases emparejadas erróneamente.

La temperatura de fusión o "T_m" mide la estabilidad de un dúplex de ácido nucleico. La T_m de un dúplex de ácido nucleico particular en las condiciones especificadas es la temperatura a la que la mitad de los dúplex se han disociado.

Como se define en el presente documento, la "actividad nucleasa 5'→3'" o la "actividad nucleasa de 5' a 3'" se refiere a esa actividad de una polimerasa de ácido nucleico específica de molde que incluye una actividad exonucleasa 5'→3' tradicionalmente asociada con algunas ADN polimerasas, por lo que se eliminan nucleótidos del extremo 5' de un oligonucleótido de una forma secuencial (es decir, la ADN polimerasa I de *E. coli* tiene esta actividad, mientras que el fragmento Klenow no la tiene) o una actividad endonucleasa 5'-3' en la que la escisión se produce a más de un nucleótido del extremo 5', o ambas.

La expresión "polimerasa de ácido nucleico termoestable" se refiere a una enzima que es relativamente estable al calor cuando se compara, por ejemplo, con polimerasas de *E. coli*, y que cataliza la polimerización de nucleósidos. En general, la enzima iniciará la síntesis en el extremo 3' del cebador apareado con la secuencia diana y avanzará en la dirección 5' a lo largo del molde, y si posee una actividad nucleasa 5' a 3', hidrolizando o desplazando una sonda apareada intermedia para liberar fragmentos de sonda tanto marcados como no marcados o sonda intacta, hasta que termine la síntesis. Una enzima termoestable representativa aislada de *Thermus aquaticus* (Taq) se describe en la Patente de Estados Unidos N° 4.889.818 y un procedimiento para usarla en PCR convencional se describe en Saiki y col., (1988), Science 239: 487.

La expresión "transcriptasa inversa termoestable" se refiere a una enzima transcriptasa inversa que es más termoestable en comparación con, por ejemplo, la transcriptasa inversa del Virus del Mieloma Aviar (AMV) o la transcriptasa inversa del Virus de la Leucemia de Mono de Moloney (MMLV).

El término "nucleobase" abarca las nucleobases de origen natural adenina (A), guanina (G), citosina (C), timina (T) y uracilo (U), así como nucleobases de origen no natural tales como xantina, diaminopurina, 8-oxo-N⁶-metiladenina, 7-desazaxantina, 7-desazaguanina, N⁴,N⁴-etanocitosina, N⁶,N⁶-etano-2,6-diaminopurina, 5-metilcitosina, 5-(C³-C⁶)-alquilil-citosina, 5-fluorouracilo, 5-bromouracilo, pseudoisocitosina, 2-hidroxi-5-metil-4-triazolopiridina, isocitosina, isoguanina, inosina y las nucleobases de "origen no natural" descritas en Benner y col., Patente de Estados Unidos N° 5.432.272 y Susan M. Freier y Karl-Heinz Altmann, Nucleic Acid Research, 25: 4429-4443, 1997. El término "nucleobase" incluye por lo tanto no sólo los heterociclos de purina y pirimidina conocidos, sino también análogos heterocíclicos y tautómeros de los mismos. Las nucleobases de origen natural y no natural adicionales incluyen las desveladas en la Patente de Estados Unidos N° 3.687.808; en el capítulo 15 por Sanghvi, en Antisense Research and Application, Ed. S. T. Crooke y B. Lebleu, CRC Press, 1993; en Englisch, y col., Angewandte Chemie, International Edition, 30: 613-722, 1991 (véanse especialmente las páginas 622 y 623, y en la Concise Encyclopedia of Polymer Science and Engineering, J. I. Kroschwitz Ed., John Wiley & Sons, páginas 858-859, 1990, Cook, Anti-Cancer Drug Design 6: 585-607, 1991, cada una de las cuales se incorpora en el presente documento por referencia en su totalidad).

La expresión "base nucleosídica" o "análogo de nucleobase" pretende incluir además compuestos heterocíclicos que pueden servir como bases nucleosídicas incluyendo ciertas "bases universales" que no son bases nucleosídicas en el sentido más clásico, pero que sirven como bases nucleosídicas. Se menciona especialmente como base universal 3-nitropirrol o un 5-nitroindol. Otros compuestos preferidos incluyen derivados de pireno y piridiloxazol, derivados de

pirenilo, pirenilmetilglicerol y similares. Otras bases universales preferidas incluyen derivados de pirrol, diazol o triazol, incluyendo las bases universales conocidas en la técnica.

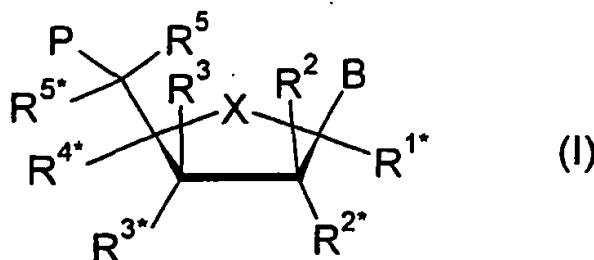
La expresión "base universal" se refiere a un compuesto o resto de origen natural, o de forma deseable de origen no natural, que puede emparejarse con al menos una y preferentemente todas las bases naturales (por ejemplo, adenina, guanina, citosina, uracilo y/o timina) y que tiene una T_m diferencial de 15, 12, 10, 8, 6, 4 ó 2°C o menos, como se describe en el presente documento.

Por "oligonucleótido", "oligómero" u "oligo" se entiende una cadena sucesiva de monómeros (por ejemplo, glucósidos de bases heterocíclicas) conectados por enlaces internucleosídicos. El enlace entre dos monómeros sucesivos en el oligo consiste en de 2 a 4, de forma deseable 3, grupos/átomos seleccionados de -CH₂-, -O-, -S-, -NRH-, >C=O, >C=NRH, >C=S, -Si(R'')₂-, -SO-, -S(O)₂-, -P(O)₂-, -PO(BH₃)-, -P(O,S)-, -P(S)₂-, -PO(R'')-, -PO(OCH₃)- y -PO(NHRH)-, donde RH se selecciona de hidrógeno y alquilo C1-4, y R'' se selecciona de alquilo C1-6 y fenilo. Son ejemplos ilustrativos de dichos enlaces -CH₂-CH₂-CH₂-, -CH₂-CO-CH₂-, -CH₂-CHOH-CH₂-, -O-CH₂-O-, -O-CH₂-CH₂-, -O-CH₂-CH= (incluyendo R₅ cuando se usa como un enlace a un monómero sucesivo), -CH₂-CH₂-O-, -NRH-CH₂-CH₂-, -CH₂-CH₂-NRH-, -CH₂-NRH-CH₂-, -O-CH₂-CH₂-NRH-, -NRH-CO-O-, -NRH-CO-NRH-, -NRH-CS-NRH-, -NRH-C(=NRH)-NRH-, -NRH-CO-CH₂-NRH-, -O-CO-O-, -O-CO-CH₂-O-, -O-CH₂-CO-O-, -CH₂-CO-NRH-, -O-CO-NRH-, -NRH-CO-CH₂-, -O-CH₂-CO-NRH-, -O-CH₂-CH₂-NRH-, -CH=N-O-, -CH₂-NRH-O-, -CH₂-O-N= (incluyendo R₅ cuando se usa como un enlace a un monómero sucesivo), -CH₂-O-NRH-, -CO-NRH-CH₂-, -CH₂-NRH-O-, -CH₂-NRH-CO-, -O-NRH-CH₂-, -O-NRH-, -O-CH₂-S-, -S-CH₂-O-, -CH₂-CH₂-S-, -O-CH₂-CH₂-S-, -S-CH₂-CH= (incluyendo R₅ cuando se usa como un enlace a un monómero sucesivo), -SCH₂-CH₂-, -S-CH₂-CH₂-O-, -S-CH₂-CH₂-S-, -CH₂-S-CH₂-, -CH₂-SO-CH₂-, -CH₂-SO₂-CH₂-, -O-SO-O-, -O-S(O)₂-O-, -O-S(O)₂-CH₂-, -O-S(O)₂-NRH-, -NRH-S(O)₂-CH₂-, -O-S(O)₂-CH₂-, -O-P(O)₂-O-, -O-P(O,S)-O-, -O-P(S)₂-O-, -S-P(O)₂-O-, -S-P(O,S)-O-, -S-P(S)₂-O-, -O-P(O)₂-S-, -O-P(O,S)-S-, -O-P(S)₂-S-, -S-P(O)₂-S-, -S-P(O,S)-S-, -S-P(S)₂-S-, -O-PO(R'')-O-, -O-PO(OCH₃)-O-, -O-PO(OCH₂CH₃)-O-, -O-PO(OCH₂CH₂S-R)-O-, -O-PO(BH₃)-O-, -O-PO(NHRN)-O-, -OP(O)₂-NRH-, -NRH-P(O)₂-O-, -O-P(O,NRH)-O-, -CH₂-P(O)₂-O-, -O-P(O)₂-CH₂- y -O-Si(R'')₂-O-; entre los que -CH₂-CO-NRH-, -CH₂-NRH-O-, -S-CH₂-O-, -OP(O)₂-O-, -O-P(O,S)-O-, -O-P(S)₂-O-, -NRH-P(O)₂-O-, -O-P(O,NRH)-O-, -O-PO(R'')-O-, -O-PO(OCH₃)-O- y -O-PO(NHRN)-O-, donde RH se selecciona de hidrógeno y alquilo C1-4 y R'' se selecciona de alquilo C1-6 y fenilo, son especialmente deseables. Se proporcionan ejemplos ilustrativos adicionales en Mesmaeker y col., Current Opinion in Structural Biology 1995, 5, 343-355 y Susan M. Freier y Karl-Heinz Altmann, Nucleic Acids Research, 1997, vol 25, págs. 4429-4443. El lado a la izquierda del enlace internucleosídico está unido al anillo de 5 miembros como sustituyente P* en la posición 3', mientras que el lado a la derecha está unido a la posición 5' de un monómero precedente.

Por "LNA" o "monómero de LNA" (por ejemplo, un nucleósido de LNA o nucleótido de LNA) o un oligómero de LNA (por ejemplo, un oligonucleótido o ácido nucleico) se entiende un análogo de nucleósido o nucleótido que incluye al menos un monómero de LNA. Los monómeros de LNA como se desvelan en la publicación PCT WO 99/14226 son en general ácidos nucleicos modificados particularmente deseables para su incorporación en un oligonucleótido de la invención. Además, los ácidos nucleicos pueden modificarse en el extremo 3' y/o 5' por cualquier tipo de modificación conocida en la técnica. Por ejemplo, cualquiera o ambos extremos pueden protegerse terminalmente con un grupo protector, unirse a un grupo de enlace flexible, unirse a un grupo reactivo para contribuir a la unión a la superficie de sustrato, etc. También se desvelan monómeros de LNA deseables y su procedimiento de síntesis en los documentos US 6.043.060, US 6.268.490, Publicaciones PCT WO 01/07455, WO 01/00641, WO 98/39352, WO 00/56746, WO 00/56748 y WO 00/66604, así como en los artículos siguientes: Morita y col., Bioorg. Med. Chem. Lett. 12(1): 73-76, 2002; Hakansson y col., Bioorg. Med. Chem. Lett. 11(7): 935-938, 2001; Koshkin y col., J. Org. Chem. 66(25): 8504-8512, 2001; Kvaerno y col., J. Org. Chem. 66(16): 5498-5503, 2001; Hakansson y col., J. Org. Chem. 65(17): 5161-5166, 2000; Kvaerno y col., J. Org. Chem. 65 (17): 5167-5176, 2000; Pfundheller y col., Nucleosides Nucleotides 18(9): 2017-2030, 1999; y Kumar y col., Bioorg. Med. Chem. Lett. 8(16): 2219-2222, 1998.

Los monómeros de LNA preferidos también denominados "oxi-LNA" son monómeros de LNA que incluyen compuestos bicíclicos como se desvelan en la Publicación PCT WO 03/020739, en los que el puente entre R^{4*} y R^{2*} como se muestra en la fórmula (I) a continuación designan juntos -CH₂-O- o -CH₂-CH₂-O-.

Por "oligonucleótido modificado con LNA" u "oligonucleótido sustituido con LNA" se entiende un oligonucleótido que comprende al menos un monómero de LNA de fórmula (I), descrita a continuación, que tiene los ejemplos ilustrativos de modificaciones descritos a continuación:



en la que X se selecciona de -O-, -S-, -N(R^N)-, -C(R⁶R^{6*})-, -O-C(R⁷R^{7*})-, -C(R⁶R^{6*})-O-, -S-C(R⁷R^{7*})-, -C(R⁶R^{6*})-S-, -N(R^N)-C(R⁷R^{7*})-, -C(R⁶R^{6*})-N(R y -C(R⁶R^{6*})-C(R⁷R^{7*})).

B se selecciona de una base modificada, como se ha analizado anteriormente, por ejemplo, un arilo carbocíclico opcionalmente sustituido tal como pireno opcionalmente sustituido o pirenilmetilgliclerol opcionalmente sustituido, o un heteroalíclico opcionalmente sustituido o heteroaromático opcionalmente sustituido, tal como piridioxazol opcionalmente sustituido, pirrol opcionalmente sustituido, diazol opcionalmente sustituido o restos triazol opcionalmente sustituidos; hidrógeno, hidroxilo, alcoxi C₁₋₄ opcionalmente sustituido, alquilo C₁₋₄ opcionalmente sustituido, aciloxi C₁₋₄ opcionalmente sustituido, nucleobases, intercalantes de ADN, grupos fotoquímicamente activos, grupos termoquímicamente activos, grupos quelantes, grupos indicadores y ligandos.

P designa la posición de radical para un enlace internucleosídico con un monómero sucesivo, o un grupo 5'-terminal, incluyendo opcionalmente dicho enlace internucleosídico o grupo 5'-terminal el sustituyente R⁵. Uno de los sustituyentes R², R^{2*}, R³ y R^{3*} es un grupo P* que designa un enlace internucleosídico con un monómero precedente, o un grupo 2'/3'-terminal. Los sustituyentes de R^{1*}, R^{4*}, R⁵, R^{5*}, R⁶, R^{6*}, R⁷, R^{7*}, R^N y los de R², R^{2*}, R³ y R^{3*} que no designan P*, designan cada uno un birradical que comprende aproximadamente 1-8 grupos/átomos seleccionados de -C(R^aR^b)-, -C(R^a)=C(R^a)-, -C(R^a)=N-, -C(R^a)-O-, -O-, -Si(R^a)₂-, -C(R^a)-S-, -S-, -SO₂-, -C(R^a)-N(R^b)-, -N(R^a)- y >C=Q, en los que Q se selecciona de -O-, -S- y -N(R^a)-, y R^a y R^b se seleccionan cada uno independientemente de hidrógeno, alquilo C₁₋₁₂ opcionalmente sustituido, alqueno C₂₋₁₂ opcionalmente sustituido, alquino C₂₋₁₂ opcionalmente sustituido, hidroxilo, alcoxi C₁₋₁₂, alquenoiloxi C₂₋₁₂, carboxi, alcoxycarbonilo C₁₋₁₂, alquilcarbonilo C₁₋₁₂, formilo, arilo, ariloxi-carbonilo, ariloxi, arilcarbonilo, heteroarilo, heteroariloxi-carbonilo, heteroariloxi, heteroarilcarbonilo, amino, mono- y di(alquilo C₁₋₆)amino, carbamoilo, mono- y di(alquilo C₁₋₆)amino-carbonilo, amino-alquilo C₁₋₆-aminocarbonilo, mono- y di(alquilo C₁₋₆)amino-alquilo C₁₋₆-aminocarbonilo, alquilo C₁₋₆-carbonilamino, carbamido, alcanoiloxi C₁₋₆, sulfono, alquilsulfoniloxi C₁₋₆, nitro, azido, sulfanilo, alquiltio C₁₋₆, halógeno, intercalantes de ADN, grupos fotoquímicamente activos, grupos termoquímicamente activos, grupos quelantes, grupos indicadores y ligandos, donde arilo y heteroarilo pueden estar opcionalmente sustituidos, y donde dos sustituyentes geminales R^a y R^b juntos pueden designar metileno opcionalmente sustituido (=CH₂), y en los que dos sustituyentes geminales o no geminales seleccionados de R^a, R^b y cualquiera de los sustituyentes R^{1*}, R², R^{2*}, R³, R^{3*}, R^{4*}, R⁵, R^{5*}, R⁶ y R^{6*}, R⁷ y R^{7*}, que están presentes y no implicados en P, P* o el birradical o birradicales juntos pueden formar un birradical asociado seleccionado de birradicales de la misma clase que se ha definido anteriormente; formando por lo tanto la pareja o parejas de sustituyentes no geminales una entidad mono- o bicíclica junto con (i) los átomos a los que se unen dichos sustituyentes no geminales y (ii) cualquier átomo intermedio.

Cada uno de los sustituyentes R^{1*}, R², R^{2*}, R³, R^{4*}, R⁵, R^{5*}, R⁶ y R^{6*}, R⁷ y R^{7*} que están presentes y no implicados en P, P* o el birradical o birradicales, se selecciona independientemente de hidrógeno, alquilo C₁₋₁₂ opcionalmente sustituido, alqueno C₂₋₁₂ opcionalmente sustituido, alquino C₂₋₁₂ opcionalmente sustituido, hidroxilo, alcoxi C₂₋₁₂, alquenoiloxi C₂₋₁₂, carboxi, alcoxycarbonilo C₂₋₁₂, alquilcarbonilo C₂₋₁₂, formilo, arilo, ariloxi-carbonilo, ariloxi, arilcarbonilo, heteroarilo, heteroariloxi-carbonilo, heteroariloxi, heteroarilcarbonilo, amino, mono- y di(alquilo C₁₋₆)amino, carbamoilo, mono- y di(alquilo C₁₋₆)aminocarbonilo, amino-alquilo C₁₋₆-aminocarbonilo, mono- y di(alquilo C₁₋₆)amino-alquilo C₁₋₆-aminocarbonilo, alquilo C₁₋₆-carbonilamino, carbamido, alcanoiloxi C₁₋₆, sulfono, alquilsulfoniloxi C₁₋₆, nitro, azido, sulfanilo, alquiltio C₁₋₆, halógeno, intercalantes de ADN, grupos fotoquímicamente activos, grupos termoquímicamente activos, grupos quelantes, grupos indicadores y ligandos, donde arilo y heteroarilo pueden estar opcionalmente sustituidos, y donde dos sustituyentes geminales pueden designar en conjunto oxo, tioxo, imino o metileno opcionalmente sustituido, o juntos pueden formar un birradical espiro que consiste en una cadena de alqueno de 1-5 átomos de carbono que está opcionalmente interrumpida y/o terminada por uno o más heteroátomos/grupos seleccionados de -O-, -S- y -(NR^N)-, donde R^N se selecciona de hidrógeno y alquilo C₁₋₄, y donde dos sustituyentes adyacentes (no geminales) pueden designar un enlace adicional que dé como resultado un doble enlace; y R^{N*}, cuando está presente y no implicado en un birradical, se selecciona de hidrógeno y alquilo C₁₋₄; y sales básicas y sales de adición de ácido de los mismos.

Los grupos 5', 3' y/o 2' terminales ejemplares incluyen -H, -OH, halo (por ejemplo, cloro, fluoro, yodo o bromo), arilo opcionalmente sustituido, (por ejemplo, fenilo o bencilo), alquilo (por ejemplo, metilo o etilo), alcoxi (por ejemplo, metoxi), acilo (por ejemplo, acetilo o benzoilo), aroilo, aralquilo, hidroxilo, hidroxialquilo, alcoxi, ariloxi, aralcoxi, nitro, ciano, carboxi, alcoxycarbonilo, ariloxycarbonilo, aralcoxycarbonilo, acilamino, aroilamino, alquilsulfonilo, arilsulfonilo, heteroarilsulfonilo, alquilsulfonilo, arilsulfonilo, heteroarilsulfonilo, alquiltio, ariltio, heteroariltio, aralquiltio, heteroaralquiltio, amidino, amino, carbamoilo, sulfamoilo, alqueno, alquino, grupos protectores (por ejemplo, sililo, 4,4'-dimetoxitritilo, monometoxitritilo o tritilo(trifenilmetilo)), engarces (por ejemplo, un engarce que contiene una amina, etilenglicol, quinona tal como antraquinona), marcadores detectables (por ejemplo, radiomarcadores o marcadores fluorescentes) y biotina.

Se entiende que las referencias en el presente documento a una unidad de ácido nucleico, resto de ácido nucleico, monómero de LNA o término similar incluyen tanto unidades de nucleósidos y unidades de nucleótidos individuales como unidades de nucleósidos y unidades de nucleótidos dentro de un oligonucleótido.

Una "base modificada" u otros términos similares se refieren a una composición (por ejemplo, una nucleobase o base nucleosídica de origen no natural) que puede emparejarse con una base natural (por ejemplo, adenina, guanina, citosina, uracilo y/o timina) y/o puede emparejarse con una nucleobase o base nucleosídica de origen no

natural. De forma deseable, la base modificada proporciona una T_m diferencial de 15, 12, 10, 8, 6, 4 ó 2°C o menos, como se describe en el presente documento. Se describen bases modificadas ejemplares en los documentos EP 1 072 679 y WO 97/12896.

La expresión “resto químico” se refiere a un parte de una molécula. La expresión “modificado por un resto químico” se refiere por lo tanto a una modificación de la estructura molecular convencional por inclusión de una estructura química poco habitual. La unión de dicha estructura puede ser covalente o no covalente.

La expresión “inclusión de un resto químico” en una sonda oligonucleotídica se refiere por lo tanto a la unión de una estructura molecular. Dicho resto químico incluye, pero sin limitación, agentes de unión a hendidura menor (MGB) unidos covalente y/o no covalentemente y/o ácidos nucleicos intercalantes (INA) seleccionados de un grupo que consiste en colorantes de cianina asimétrica, DAPI, SYBR Green I, SYBR Green II, SYBR Gold, PicoGreen, naranja de tiazol, Hoechst 33342, Bromuro de Etidio, 1-O-(1-pirenilmetil)glicerol y Hoechst 33258. Otros restos químicos incluyen las nucleobases modificadas, bases nucleosídicas u oligonucleótidos modificados con LNA.

La expresión “sonda doblemente marcada” se refiere a un oligonucleótido con dos marcadores unidos. En un aspecto, un marcador se une al extremo 5' de la molécula de sonda, mientras que el otro marcador se une al extremo 3' de la molécula. Un aspecto particular de la invención contiene una molécula fluorescente unida a un extremo y una molécula que es capaz de inactivar este fluoróforo por transferencia de energía por resonancia de fluorescencia (FRET) unido al otro extremo. Las sondas de ensayo de nucleasa 5' y algunas balizas moleculares son ejemplos de sondas doblemente marcadas.

La expresión “sonda de ensayo de nucleasa 5'” se refiere a una sonda doblemente marcada que puede hidrolizarse por la actividad exonucleasa 5'-3' de una ADN polimerasa. Una sonda de ensayo de nucleasa 5' no se hidroliza necesariamente por la actividad exonucleasa 5'-3' de una ADN polimerasa en las condiciones empleadas en el ensayo de PCR particular. La denominación “ensayo de nucleasa 5'” se usa independientemente del grado de hidrólisis observado y no indica ninguna expectativa por parte del experimentador. Las expresiones “sonda de ensayo de nucleasa 5'” y “ensayo de nucleasa 5'” se refieren simplemente a ensayos en los que no se ha tenido un cuidado particular para evitar la hidrólisis de la sonda implicada. Las “sondas de ensayo de nucleasa 5'” se denominan con frecuencia “sondas de ensayo TaqMan”, y el “ensayo de nucleasa 5'”, “ensayo TaqMan”. Estos nombres se usan indistintamente en esta solicitud.

Un “análogo oligonucleotídico” se refiere a una molécula de unión a ácido nucleico capaz de reconocer una secuencia de nucleótidos diana particular. Un análogo oligonucleotídico particular es un ácido peptidonucleico (PNA) en el que la cadena principal de azúcar fosfato de un oligonucleótido se sustituye por una cadena principal de tipo proteína. En el PNA, las nucleobases se unen a la cadena principal de poliamida sin carga produciendo una estructura quimérica de pseudopéptido-ácido nucleico que es homomorfa respecto a las formas de ácido nucleico.

La expresión “baliza molecular” se refiere a una sonda individual o doblemente marcada que probablemente no se verá afectada por la actividad exonucleasa 5'-3' de una ADN polimerasa. Se han realizado modificaciones especiales en la sonda, la polimerasa o las condiciones de ensayo para evitar la separación de los marcadores o nucleótidos constituyentes por la actividad exonucleasa 5'-3' de una ADN polimerasa. El principio de detección depende por lo tanto de una diferencia detectable en la señal generada por el marcador tras la unión de la baliza molecular a su secuencia diana. En un aspecto de la invención, la sonda oligonucleotídica forma una estructura de horquilla intramolecular a la temperatura de ensayo seleccionada mediada por secuencias complementarias en el extremo 5' y 3' del oligonucleótido. El oligonucleótido puede tener una molécula fluorescente unida a un extremo y una molécula unida al otro, que sea capaz de inactivar el fluoróforo cuando se ponen en estrecha proximidad entre sí en la estructura de horquilla. En otro aspecto de la invención, una estructura de horquilla no se forma basándose en la estructura complementaria en los extremos de la secuencia de sonda, en su lugar, el cambio de señal detectado tras la unión puede ser el resultado de la interacción entre uno o ambos de los marcadores con la estructura de dúplex formada o de un cambio general de conformación espacial de la sonda tras la unión —o de una interacción reducida entre los marcadores después de la unión. Un aspecto particular de la baliza molecular contiene varios restos de LNA para inhibir la hidrólisis por la actividad exonucleasa 5'-3' de una ADN polimerasa.

La expresión “análogo de nucleótido de alta afinidad” se refiere a un análogo de nucleótido de origen no natural que aumenta la “afinidad de unión” de una sonda oligonucleotídica hacia su secuencia de reconocimiento complementaria cuando se sustituye con al menos uno de dichos análogos de nucleótidos de alta afinidad.

Como se usa en el presente documento, una sonda con una “afinidad de unión” aumentada por una secuencia de reconocimiento en comparación con una sonda que comprende la misma secuencia pero no comprende un nucleótido estabilizante, se refiere a una sonda para la que la constante de asociación (K_a) del segmento de reconocimiento de sonda es superior que la constante de asociación de las cadenas complementarias de una molécula bicatenaria. En otra realización preferida, la constante de asociación del segmento de reconocimiento de sonda es superior que la constante de disociación (K_d) de la cadena complementaria de la secuencia de reconocimiento en la secuencia diana en una molécula bicatenaria.

Se dice que los monómeros son “complementarios” si contienen nucleobases que pueden formar enlaces de

hidrógeno de acuerdo con las normas de emparejamiento de bases de Watson-Crick (por ejemplo, G con C, A con T o A con U) u otros motivos de formación de enlaces de hidrógeno tales como, por ejemplo, diaminopurina con T, 5-metil C con G, 2-tiotimidina con A, inosina con C, pseudoisocitosina con G, etc.

La expresión "monómero sucesivo" se refiere al monómero vecino en la dirección 5'-terminal y el "monómero precedente" se refiere al monómero vecino en la dirección 3'-terminal.

La expresión "ácido nucleico diana" o "ácido ribonucleico diana" se refiere a cualquier ácido nucleico relevante de una sola secuencia específica, por ejemplo, un ácido nucleico biológico, por ejemplo, obtenido de un paciente, un animal (un ser humano o animal no humano), una planta, una bacteria, un hongo, una arquea, una célula, un tejido, un organismo, etc. Por ejemplo, cuando el ácido ribonucleico o ácido nucleico diana procede de una bacteria, arquea, planta, animal no humano, célula, hongo u organismo no humano, el procedimiento comprende opcionalmente además seleccionar la bacteria, arquea, planta, animal no humano, célula, hongo u organismo no humano basándose en la detección del ácido nucleico diana. En una realización, el ácido nucleico diana procede de un paciente, por ejemplo, un paciente humano. En esta realización, la invención incluye opcionalmente además seleccionar un tratamiento, diagnosticar una enfermedad o diagnosticar una predisposición genética a una enfermedad basándose en la detección del ácido nucleico diana.

La expresión "secuencia diana" se refiere a una secuencia de ácido nucleico específica dentro de cualquier ácido nucleico diana.

La expresión "condiciones rigurosas", como se usa en el presente documento, es la "rigurosidad" que aparece dentro de un intervalo de aproximadamente $T_m - 5^{\circ}\text{C}$ (5°C por debajo de la temperatura de fusión (T_m) de la sonda) a aproximadamente 20°C a 25°C por debajo de la T_m . Como entenderán los expertos en la materia, la rigurosidad de la hibridación puede alterarse para identificar o detectar secuencias polinucleotídicas idénticas o relacionadas. Se describen en general técnicas de hibridación en Nucleic Acid Hybridization, A Practical Approach, Ed. Hames, B. D. and Higgins, S. J., IRL Press, 1985; Gall y Pardue, Proc. Natl. Acad. Sci., USA 63: 378-383, 1969; y John, y col. Nature 223: 582-587, 1969.

La presente invención también proporciona un kit para el aislamiento, purificación, amplificación, detección, identificación, cuantificación o captura de ácidos nucleicos naturales o sintéticos, donde el kit comprende un cuerpo de reacción y uno o más oligonucleótidos modificados con LNA (oligómeros) como se definen en el presente documento. Los oligonucleótidos modificados con LNA están preferentemente inmovilizados en dichos cuerpos de reacción.

Para los kits de acuerdo con la invención, el cuerpo de reacción es preferentemente un material de soporte sólido, por ejemplo, seleccionado de vidrio de borosilicato, vidrio de sosa-cal, poliestireno, policarbonato, polipropileno, polietileno, polietilenglicol tereftalato, polivinilacetato, polivinilpirrolidona, polimetilmetacrilato y polivinilcloruro, preferentemente poliestireno y policarbonato. El cuerpo de reacción puede estar en forma de un tubo de muestra, un vial, un portaobjetos, una lámina, una película, una perla, un gránulo, un disco, una placa, un anillo, una varilla, una red, un filtro, una bandeja, una placa de microtitulación, una barra o una barra multifilo.

Una hoja de instrucciones escritas que indica las condiciones óptimas para el uso del kit acompaña típicamente a los kits.

Descripción detallada de la invención

La presente invención proporciona procedimientos para la detección y cuantificación de microARN o ARN interferentes pequeños, que tienen una alta sensibilidad y buena selectividad. De acuerdo con la invención, la cuantificación de microARN y ARN interferentes pequeños es detectable a niveles de 10 fmol a 10 amol de diana de ARN o menos (10 zmol) en la muestra correspondiente a una concentración de diana de ARN de 100 pM a 10 fM o menos (10 aM).

En una realización preferida la invención comprende las etapas siguientes, como se muestran en la Fig. 1 y Fig. 9:

1) Se diseñan y sintetizan dos sondas de etiquetado de modo que cada una consiste en una secuencia de nucleótidos de alta afinidad complementaria a 10-12 nt de la secuencia diana, por ejemplo, un miARN maduro, y una secuencia de ADN de anclaje sin ninguna complementariedad con la secuencia diana o entre sí. Las dos sondas de etiquetado que contienen elementos de reconocimiento se hibridan en condiciones rigurosas en combinación con la secuencia diana en una muestra de ácido nucleico compleja en solución, poniendo de este modo a las dos sondas de etiquetado en estrecha proximidad como se define por la diana, en la que el extremo 5' de una sonda de etiquetado es adyacente al extremo 3' de la otra sonda de etiquetado.

2) Las sondas de etiquetado específicas de diana se unen por ligación ya que el extremo 5' de una de las sondas está fosforilado, usando una ADN ligasa y la secuencia diana, por ejemplo, un miARN, como molde. La reacción de ligación puede llevarse a cabo a temperaturas elevadas usando ligasas termoestables y, por lo tanto, someterse a ciclado para aumentar el número de copias de las moléculas de molde para la posterior amplificación por PCR.

3) Después de la ligación con molde de secuencia diana de las sondas de etiquetado de alta afinidad, las moléculas de sonda ligadas se usan como moldes para PCR a tiempo real cuantitativa, usando una sonda de detección corta con una estabilidad de dúplex suficiente para permitir la unión al amplicón, y empleando cualquiera de una diversidad de principios de detección usados en ensayos homogéneos.

5 En una realización preferida adicional de la invención, la detección y la cuantificación comprenden las etapas que se muestran en la Fig. 27:

a) poner en contacto la secuencia de ácido ribonucleico diana con una sonda de captura oligonucleotídica, en la que la secuencia de nucleótidos de reconocimiento es complementaria a una secuencia en la secuencia diana;

10 b) síntesis de una cadena complementaria a la secuencia de nucleótidos de anclaje en la sonda de captura usando una enzima ADN polimerasa y la secuencia de ácido ribonucleico diana como cebador,

c) inmovilización del dúplex formado sobre un soporte sólido y enriquecimiento de la muestra diana, seguido de una liberación de la secuencia diana del soporte sólido;

15 d) síntesis de una cadena de ADN complementaria al ácido ribonucleico diana por transcripción inversa usando una enzima transcriptasa inversa y la secuencia de nucleótidos de anclaje en la sonda de etiquetado como sitio de unión de cebador;

20 e) sustitución de la secuencia de ácido ribonucleico en el heterodúplex por síntesis de una segunda cadena usando una ADN polimerasa y una segunda sonda de etiquetado como cebador, en la que dicha segunda sonda de etiquetado consiste en una secuencia de nucleótidos de anclaje y una secuencia de nucleótidos de reconocimiento, en la que dicha secuencia de nucleótidos de reconocimiento es complementaria a una secuencia en la secuencia de ácido nucleico extendida con transcriptasa inversa;

f) cuantificar los ácidos nucleicos resultantes mediante PCR a tiempo real usando los cebadores correspondientes a las secuencias de nucleótidos de anclaje unidas a las sondas de etiquetado oligonucleotídicas y una sonda de detección marcada, que comprende una secuencia de reconocimiento diana y un resto de detección.

25 En una realización preferida adicional de la invención, la detección y la cuantificación comprenden las etapas mostradas en la Fig. 28:

a) poner en contacto la secuencia de ácido ribonucleico diana con una sonda de captura oligonucleotídica, en la que la secuencia de nucleótidos de reconocimiento es complementaria a una secuencia en la secuencia diana;

30 b) síntesis de una cadena complementaria a la secuencia de nucleótidos de anclaje en la sonda de captura usando una enzima ADN polimerasa y la secuencia de ácido ribonucleico diana como cebador,

c) inmovilización del dúplex formado sobre un soporte sólido y enriquecimiento de la muestra diana,

d) síntesis de una cadena de ADN complementaria al ácido ribonucleico diana por transcripción inversa usando una enzima transcriptasa inversa y la sonda de captura como cebador,

35 e) sustitución de la secuencia de ácido ribonucleico en el heterodúplex por síntesis de una segunda cadena usando una ADN polimerasa y una segunda sonda de etiquetado como cebador, y en la que dicha segunda sonda de etiquetado consiste en una secuencia de nucleótidos de anclaje y una secuencia de nucleótidos de reconocimiento, en la que dicha secuencia de nucleótidos de reconocimiento es complementaria a una secuencia en la secuencia de ácido nucleico extendida con transcriptasa inversa;

40 f) seguido de la amplificación por PCR con molde de secuencia diana usando una ADN polimerasa y una pareja de cebadores;

e) cuantificar los ácidos nucleicos resultantes mediante PCR a tiempo real usando cebadores correspondientes a las secuencias de nucleótidos de anclaje unidas a las sondas de etiquetado oligonucleotídicas y una sonda de detección marcada, que comprende una secuencia de reconocimiento diana y un resto de detección.

45 Una ventaja para los procedimientos de sonda de captura inmovilizada es que el enriquecimiento inicial de la muestra de ARN total para ARN no codificantes de proteína, tales como ARN nucleolares pequeños, ARNip, microARN y ARN antisentido, no es necesario. Preferentemente, la sonda de captura hibridará con la diana específica en solución. En segundo lugar, cuando la sonda de captura se inmoviliza en el soporte sólido, el material no unido puede eliminarse y de este modo se ha realizado el enriquecimiento para la diana específica.

En otra realización preferida adicional, la invención comprende las etapas que se muestran en la Fig. 11:

50 1) Dos sondas de etiquetado, la sonda de etiquetado de RT y la sonda de etiquetado de 2ª cadena, se diseñan y se sintetizan de modo que cada una consiste en una secuencia de reconocimiento de nucleótidos

correspondiente a 6-12 nt de la secuencia de ácido ribonucleico diana, por ejemplo, un miARN maduro, y una secuencia de anclaje sin ninguna complementariedad con la secuencia diana o entre sí. La secuencia de reconocimiento de la sonda de etiquetado de RT o ambas sondas de RT y 2ª cadena están modificadas por análogos de nucleótidos de alta afinidad, por ejemplo, LNA. La secuencia de reconocimiento en la sonda de etiquetado de RT es complementaria a una secuencia en la secuencia de ácido ribonucleico diana, por ejemplo, al extremo 3' del microARN maduro o ARNip, o a una secuencia localizada 3' a un nucleótido de ARN editado, unión de corte y empalme, polimorfismo de un solo nucleótido o mutación puntual en la secuencia de ácido ribonucleico diana. La sonda de etiquetado de RT se hibrida con la secuencia de ARN diana en una muestra de ácido nucleico compleja en condiciones de hibridación rigurosas y se usa como cebador anclado en una reacción de transcripción inversa para generar un producto de extensión de cebador anclado, complementario a la secuencia de ARN diana usando una enzima transcriptasa inversa.

2) La sonda de etiquetado de 2ª cadena comprende una secuencia de reconocimiento, que es complementaria a la secuencia de nucleótidos extendida con transcriptasa inversa correspondiente al extremo 5' del microARN maduro o ARNip o localizada 5' al nucleótido de ARN editado, unión de corte y empalme, polimorfismo de un solo nucleótido o mutación puntual en la secuencia diana de ácido ribonucleico inicial. La sonda de etiquetado de 2ª cadena se hibrida con los productos de reacción de RT en condiciones de hibridación rigurosas y posteriormente se usan como cebador anclado para generar la segunda cadena mediante una ADN polimerasa, por ejemplo, una ADN polimerasa termoestable, que es complementaria al producto de extensión de cebadores. La especificidad de la reacción se basa en el uso secuencial de las sondas de etiquetado de RT y 2ª cadena ancladas con secuencias de reconocimiento no solapantes, que hibridan con regiones de extremo 3' y extremo 5' complementarias del ARN diana y secuencias de ADN complementarias, respectivamente. Las secuencias de anclaje unidas a las sondas de etiquetado se diseñan de modo que no presenten hibridación cruzada con ningún ácido nucleico diana en un transcriptoma dado o entre sí en las condiciones de hibridación usadas en el procedimiento de la invención. Las secuencias de anclaje funcionan como sitios de cebado para los cebadores de PCR en la PCR cuantitativa a tiempo real posterior, o como etiquetas para ensayos de captura. La reacción de transcripción inversa, así como la reacción de segunda cadena, pueden llevarse a cabo a temperaturas elevadas debido al uso de análogos de nucleótidos de alta afinidad en las secuencias de reconocimiento, lo cual es un componente novedoso de la invención, usando transcriptasas inversas termoestables y ADN polimerasas termoestables, aumentando por lo tanto la especificidad en la generación de las moléculas de molde para la posterior amplificación por PCR. Otro componente novedoso de la invención es el descubrimiento de que dichas secuencias de reconocimiento de alta afinidad, modificadas, por ejemplo, por LNA, pueden usarse como cebadores mediante una transcriptasa inversa o una ADN polimerasa, y además de que dichas secuencias de reconocimiento de alta afinidad pueden usarse como molde para sintetizar una cadena complementaria mediante una ADN polimerasa.

3) Después de de las reacciones de transcripción inversa específica de secuencia de ARN diana y de síntesis de 2ª cadena, las moléculas bicatenarias se usan como moldes para PCR a tiempo real cuantitativa, usando una sonda de detección corta con una estabilidad de dúplex suficiente para permitir la unión al amplicón, y empleando cualquiera de una diversidad de principios de detección usados en ensayos homogéneos.

La detección de unión es directa, mediante un cambio medible en las propiedades de uno o más de los marcadores después de la unión a la diana (por ejemplo, un ensayo de tipo baliza molecular con o sin estructura de tallo), o indirecta, mediante una reacción posterior después de la unión, por ejemplo, escisión por la actividad nucleasa 5' de la ADN polimerasa en ensayos de nucleasa 5'. La sonda de detección es otro componente novedoso más de la presente invención. Comprende un resto oligonucleotídico corto cuya secuencia se ha seleccionado para permitir la detección específica de las moléculas de ADN amplificadas cortas correspondientes a la secuencia diana en el segmento de núcleo y las secuencias ancladas usadas como sitios de apareamiento para los cebadores de PCR.

Las sondas de detección cortas novedosas diseñadas para detectar secuencias diana, por ejemplo, diferentes moléculas diana de miARN maduro, se posibilitan por el descubrimiento de que sondas de mezcla de monómeros químicos de LNA-ADN de 8-12 monómeros muy cortas son compatibles con ensayos basados en PCR a tiempo real. En un aspecto de la presente invención, se incorporan análogos de nucleobases o modificados, bases nucleosídicas o nucleótidos en las sondas de etiquetado, así como en la sonda de detección, posiblemente junto con agentes de unión a hendidura menor y otras modificaciones, que tienen todos como objetivo estabilizar el dúplex formado entre las sondas y la molécula diana, de modo que las secuencias de sonda más cortas posibles puedan usarse para hibridar y detectar las moléculas diana. En un aspecto preferido de la invención, las modificaciones son la incorporación de restos de LNA para reducir la longitud de la sonda de detección a 8 ó 9 ó 10 u 11 ó 12 a 14 nucleótidos, al tiempo que se mantiene una estabilidad suficiente del dúplex formado para que sea detectable en las condiciones de ensayo de PCR a tiempo real convencionales. En otro aspecto preferido de la invención, las secuencias de reconocimiento diana en una o ambas sondas de etiquetado para la reacción de ligación, o la secuencia de reconocimiento en la sonda de etiquetado de RT, o las secuencias de reconocimiento, tanto en la sonda de etiquetado de RT como en la sonda de etiquetado de 2ª cadena para la reacción de RT-PCR, se sustituyen con monómeros de LNA en cada segunda, cada tercera o cada cuarta posición de nucleótido con al menos un nucleótido de ADN en los extremos 3' de ambas sondas, respectivamente, permitiendo una hibridación altamente específica y sensible incluso a temperaturas elevadas debido a la estabilidad de dúplex aumentada de las sondas oligonucleotídicas modificadas con LNA con sus moléculas diana complementarias, particularmente moléculas de

ARN diana.

En una realización preferida adicional de la invención, la detección y la cuantificación comprenden las etapas mostradas en la Fig. 22:

- a) poner en contacto la secuencia de ácido ribonucleico diana con una sonda de etiquetado oligonucleotídica de la reivindicación 1 a 3, en la que la secuencia de nucleótidos de reconocimiento es complementaria a una secuencia en la secuencia diana;
- b) síntesis de una cadena complementaria a la secuencia de nucleótidos de anclaje en la sonda de etiquetado usando una enzima ADN polimerasa y la secuencia de ácido nucleico diana como cebador,
- c) síntesis de una cadena de ADN complementaria al ácido ribonucleico diana por transcripción inversa usando una enzima transcriptasa inversa y la secuencia de nucleótidos de anclaje en la sonda de etiquetado como sitio de unión a cebador;
- d) sustitución de la secuencia de ácido ribonucleico en el heterodúplex por síntesis de una segunda cadena usando una ADN polimerasa y una segunda sonda de etiquetado como cebador, en la que dicha segunda sonda de etiquetado consiste en una secuencia de nucleótidos de anclaje y una secuencia de nucleótidos de reconocimiento, en la que dicha secuencia de nucleótidos de reconocimiento es complementaria a una secuencia en la secuencia de ácido nucleico extendida con transcriptasa inversa;
- e) cuantificar los ácidos nucleico resultantes mediante PCR a tiempo real usando los cebadores correspondientes a las secuencias de nucleótidos de anclaje unidas a las sondas de etiquetado oligonucleotídicas y una sonda de detección marcada que comprende una secuencia de reconocimiento diana y un resto de detección.

En una realización preferida adicional, la invención comprende las etapas que se muestran en la Fig. 29.

En una realización preferida adicional, la invención comprende las etapas que se muestran en la Fig. 30.

Una realización adicional comprende el uso de una "sonda de bloqueo" que contiene LNA para impedir la unión del cebador de RT a moldes que superen la longitud del transcrito de miARN maduro. La sonda de bloqueo está diseñada para unirse a secuencias complementarias a las regiones de miARN no maduro dentro de la secuencia de miARN pri-/precursor que flanquea la región 3' de la secuencia de miARN maduro. La sonda de bloqueo está diseñada adicionalmente para solapar en parte con la secuencia madura, impidiendo por lo tanto la unión del cebador de RT (como se describe en los Ejemplos 12-16 y como se representa en la Fig. 11, etapa 1) a la secuencia pri-/precursora, y permitiendo que la sonda de etiquetado de RT se aparee con las secuencias de miARN maduro solamente. Las etapas de reacción se representan en la Fig. 33, etapa I y en la Fig. 22.2-22.4.

En otra realización que emplea una secuencia de miARN maduro (similar a la secuencia de Hsa miR-15a, Fig. 29), se detecta utilizando un cebador de RT diseñado para inhibir la unión a moldes que superen una longitud determinada, es decir, tal como la longitud de miARN pri- y prematuro. El bloqueo se obtiene, por ejemplo, por incorporación de una estructura molecular grande en el cebador de RT, o por apareamiento de una sonda que contiene LNA corta (sonda de bloqueo) con el cebador para introducir una estructura de dúplex, situada para impedir la unión del cebador con moldes que superen la longitud del miARN maduro. El diseño de cebador bloqueado permite que sólo se aparee una secuencia de miARN maduro, mientras que moldes de mayor longitud no se aparean. Las etapas de reacción se representan en la Fig. 29.

En otra realización, el cebador de RT de la realización anterior también comprende uno de los cebadores de PCR en la reacción. Opcionalmente, el otro cebador de PCR también puede estar diseñado para inhibir la unión a moldes que superen una longitud determinada. Las etapas de reacción se representan en la Fig. 29b.

Otra realización emplea la adición de un molde oligonucleotídico artificial a la reacción. En los casos en los que el miARN se expresa a partir del extremo 3' lejano de la molécula precursora (similar a la secuencia de Hsa miR-143, Fig. 30), el molde de miARN maduro así como precursor contiene un extremo 3' adecuado para la extensión por una polimerasa, por ejemplo, el fragmento Klenow. Mediante el empleo de un cebador de RT como se representa en la Fig. 31, que se extiende posteriormente mediante una ADN polimerasa dirigida por ARN (por ejemplo, transcriptasa inversa), el molde resultante diferirá en longitud dependiendo de si el transcrito de miARN maduro o precursor sirve como molde. La sonda de etiquetado de 2ª cadena descrita en los Ejemplos 12-16 y que se representa en la Fig. 11 etapa 2 se ha cambiado por un molde oligonucleotídico artificial bloqueado en 3' representado en la Fig. 31 para permitir que la extensión del transcrito de RT se origine a partir del miARN maduro solamente. El oligonucleótido artificial bloqueado en 3' se usa posteriormente como molde para generar el sitio de cebador para la amplificación por PCR posterior.

En otra realización en la que el miARN se expresa a partir del extremo 3' lejano de la molécula precursora (similar a la secuencia de Hsa miR-143, Fig. 30), el miARN maduro se detecta utilizando un cebador de PCR que hibrida con el extremo 3' del miARN sometido a transcripción inversa (el extremo 5' original del miARN maduro) y diseñado para

inhibir la unión a moldes que superen una longitud determinada, es decir, tal como la longitud del miARN pri-/precursor sometido a transcripción inversa. Este bloqueo se obtiene, por ejemplo, por incorporación de una estructura molecular grande en este cebador de PCR —por ejemplo, siendo un cebador con bucle— manteniendo una secuencia de anclaje y formando una estructura de horquilla intramolecular, mediada por secuencias complementarias en el extremo 5' y 3' del oligonucleótido, a la temperatura de ensayo seleccionada, o por apareamiento de una sonda que contiene LNA corta (sonda de bloqueo) con el cebador para introducir una estructura de dúplex, situada para impedir la unión del cebador a moldes que superen la longitud del miARN maduro. El cebador está diseñado específicamente para permitir que sólo se aparee una secuencia de miARN procesado maduro, mientras que moldes de mayor longitud no se aparean. Las etapas de reacción se representan en la Fig. 34.

En células, las moléculas de microARN aparecen tanto como moléculas precursoras como precursoras de mayor longitud (más de 70 nucleótidos), así como en la forma activa de miARN maduros (17-25 nucleótidos). Un desafío en la detección de moléculas de microARN es detectar la forma madura de la molécula solamente, que es una molécula de ARN monocatenaria de 17-25 pb de longitud.

En una realización preferida de la presente invención, el miARN maduro funciona como cebador, es decir, el miARN se hibrida con un molde y se extiende por una enzima capaz de síntesis de ADN dirigida por ADN cebada con ARN. En segundo lugar, la detección depende de la aparición de esta extensión y además la aparición de la extensión depende de tener una terminación -OH en el extremo 3' del miARN disponible a la distancia esperada del sitio de apareamiento con el molde, que se usa para asegurar la detección de moléculas de miARN maduro procesado solamente. El principio de usar la diana (en este caso miARN) como cebador en la reacción de detección puede aplicarse a otros formatos de detección usando otras dianas (tanto ADN como ARN).

Aspecto general de la invención

Muchas moléculas de ARN no codificantes, tales como moléculas de microARN, son muy cortas y no alojan la colocación de cebadores para tanto transcriptasa inversa como amplificación por PCR, y opcionalmente una sonda de detección marcada para la amplificación y detección por PCR. Una solución para el alojamiento es, de acuerdo con la presente invención, añadir una secuencia adicional al microARN, preferentemente por un procedimiento que permita el diseño de ensayos específicos de maduros.

Como se describe (consúltense los Ejemplos), dichas secuencia o secuencias pueden añadirse por medio de proporcionar (por hibridación específica de secuencia) un molde para una reacción de polimerasa con el microARN, y proporcionar una polimerasa (por ejemplo, una polimerasa Klenow) y nucleótidos para permitir la extensión, conduciendo a la adición al microARN maduro de una secuencia similar en parte a la del molde proporcionado. Dichas secuencias añadidas pueden alojar en parte cebadores para transcriptasa inversa, para amplificación por PCR o para una sonda de detección marcada, en solitario o en combinación con la secuencia de ácido nucleico del microARN.

Otros medios de adición de una secuencia adicional pueden ser el de una reacción de ligación. En dicha reacción, una secuencia de ácido nucleico adaptadora puede unirse al extremo 3', al extremo 5' o a ambos extremos de la molécula de microARN por medio de una reacción de ligación. A dicha reacción de ligación puede contribuirse proporcionando una secuencia de ácido nucleico "de formación de puente" que comprende una secuencia de nucleótidos específica para una parte terminal de una secuencia de ARN diana madura y una secuencia de nucleótidos específica para la parte terminal de dicha molécula adaptadora, de modo que la diana de ARN maduro y dicha molécula adaptadora se ponen en estrecha proximidad entre sí tras la hibridación específica de secuencia. Dicha secuencia añadida por ligación puede alojar en parte cebadores para transcriptasa inversa, para amplificación por PCR o para una sonda de detección marcada, en solitario o en combinación con la secuencia de ácido nucleico del microARN.

Otro medio más de añadir una secuencia adicional a una molécula de ARN pequeña diana puede ser el de una reacción de polimerasa independiente de molde. En una realización de este tipo una muestra de moléculas de ARN diana pequeño se somete a una reacción de polimerasa, proporcionando una cola poliA a todos los microARN presentes en la muestra. Esto podría realizarse, por ejemplo, usando una polimerasa de poliA. En otra realización de este tipo, una muestra de moléculas de ARN diana pequeño se somete a una reacción de enzima transferasa terminal capaz de proporcionar una cola polinucleotídica de A, C, G o T a todos los microARN presentes en la muestra cuando se añaden los dATP, dCTP, dGTP o dTTP respectivos. Dicha muestra de microARN proporcionada con una cola de nucleótidos de nucleótidos similares puede convertirse en ADNc usando un cebador que comprende los nucleótidos similares complementarios en una reacción de transcriptasa inversa, proporcionando por lo tanto una muestra de ADNc de microARN con una cola polinucleotídica añadida de nucleótidos similares. Por solapamiento de parte de la secuencia de microARN el cebador de RT también puede ser específico para un microARN específico o un grupo o familia de microARN. Dicha muestra de ADNc puede servir posteriormente como molde para una reacción de amplificación por PCR usando cebadores específicos para las secuencias de microARN específicas incluidas dentro de la secuencia de microARN maduro o en parte solapantes con la secuencia añadida por medio de una reacción de polimerasa independiente de molde.

Un ejemplo de este tipo se describe en la Fig. 37, en la que una muestra de ARN total o una fracción de muestra de ARN que contiene solamente ARN de un tamaño por debajo de 200 nucleótidos se somete a una polimerasa de poliA para añadir a todas las moléculas diana de microARN una cola de nucleótidos poliA. Posteriormente, se usa un cebador de poliT como cebador en una reacción de transcripción inversa para convertir la muestra de ARN en ADNc. Dicha reacción de RT puede volverse además específica de secuencia permitiendo que la secuencia de cebador de RT solape en parte con la secuencia de microARN específica para un microARN específico o grupo o familia de microARN. Posteriormente, dicha muestra de ADNc se somete a una amplificación por PCR usando cebadores de PCR específicos para una diana de microARN específica y, opcionalmente, una sonda de detección marcada. Dichos cebadores de PCR pueden solapar parcialmente en su totalidad o en parte con la secuencia añadida.

La invención se refiere por lo tanto a un procedimiento para la determinación cuantitativa de un ARN de longitud corta (que puede ser cualquiera de los tipos de ARN pequeños descritos en el presente documento), que tiene una longitud de como mucho 100 nucleótidos, que comprende

a) preparar, a partir de una muestra que comprende dicho ARN de longitud corta, un polinucleótido de molde que consiste en 1) una secuencia diana monocatenaria que consiste en la secuencia de dicho ARN de longitud corta, su secuencia de ADN correspondiente o una secuencia de nucleótidos complementaria a la secuencia de dicho ARN de longitud corta y 2) una secuencia de nucleótidos adyacente 5' y/o 3', donde dicha secuencia de nucleótidos adyacente 5' y/o 3' es un polinucleótido que consiste o consisten en nucleótidos idénticos,

b) usar dicho polinucleótido de molde en una transcripción inversa o una polimerización de nucleótidos para obtener una cadena de ADNc y

c) realizar una PCR a tiempo real cuantitativa (qPCR) que incluye como molde o moldes dicho ADNc y, opcionalmente, el polinucleótido de molde, en la que

1) los cebadores usados para la qPCR en la etapa c se seleccionan de

- al menos 2 oligonucleótidos, en la que al menos uno de dichos oligonucleótidos corresponde a o es complementario a una secuencia en la secuencia de nucleótidos adyacente 5' o 3', y
- al menos 2 oligonucleótidos, en la que al menos uno de dichos oligonucleótidos corresponde a o es complementario a una secuencia contigua en el polinucleótido de molde constituido por parte de la secuencia diana monocatenaria y parte de la secuencia de nucleótidos 5' o 3' adyacente, o en la que

2) la reacción de la etapa (b) utiliza un cebador de transcripción inversa o un cebador de polimerización de ADN que corresponde a o es complementario a una secuencia contigua en el polinucleótido de molde constituido por parte de la secuencia diana monocatenaria y parte de la secuencia de nucleótidos 5' o 3' adyacente.

Este aspecto de la invención refleja el concepto subyacente de la invención, en concreto que la detección específica de ARN de longitud corta puede lograrse asegurando un grado de especificidad relativamente alto en todas las etapas de a a c, y que la especificidad en cada etapa se suma a la especificidad general del procedimiento. Una característica principal es el suministro del polinucleótido de molde en la etapa a, donde dicho molde incluye secuencias añadidas que pueden servir como "asas" para cebadores en las etapas posteriores, proporcionando de este modo espacio para todos los cebadores necesarios y para las sondas de detección usadas. Como será evidente a partir de la descripción del presente documento, estas "asas" pueden ser tanto específicas como inespecíficas para el ARN de longitud corta que se desea cuantificar —en el caso de secuencias específicas, estas se añaden en una reacción que preferentemente o específicamente añadirá las secuencias al ARN de longitud corta pero no a las secuencias que incluyen el ARN de longitud corta.

Cuando se usa la expresión "correspondiente a" en el presente contexto se entiende que una secuencia de nucleótidos que corresponde a una secuencia de nucleótidos de referencia es idéntica a la secuencia de referencia o constituye una secuencia que hibrida rigurosamente con una secuencia complementaria con la secuencia de nucleótidos de referencia. Típicamente, esto significa que una secuencia de ARN puede corresponder a una secuencia de ADN si la secuencia complementaria a la secuencia de ADN puede transcribirse en la secuencia de ARN en cuestión.

El término "ADNc" en este contexto significa un fragmento de ADN que se obtiene por medio de transcripción inversa del polinucleótido de molde o por medio de polimerización de nucleótidos (tal como polimerización de ADNc) basándose en el nucleótido de molde.

El ARN de longitud corta es como se ha mencionado como mucho de 100 nucleótidos, pero pueden determinarse ARN mucho más cortos por medio del procedimiento. ARN que tienen longitudes de como mucho 90, como mucho 80, como mucho 70, como mucho 60, como mucho 50, como mucho 40, como mucho 30 y como mucho 25 restos de nucleótidos pueden determinarse convenientemente por medio de los presentes procedimientos y kits, pero incluso ARN más cortos tales como los que tienen 10, 11, 12, 13, 14, 15, 16, 17, 18, 19, 20, 21, 22, 23, 24 y 25 restos de nucleótidos. Preferentemente, los ARN de longitud corta tienen longitudes de entre 16 y 25 restos de nucleótidos.

Los cebadores usados para la qPCR en la etapa c se seleccionan en una realización de

- al menos 2 oligonucleótidos, en la que al menos uno de dichos oligonucleótidos corresponde a o es complementario a una secuencia en la secuencia de nucleótidos adyacente 5' o 3' —una realización que, especialmente si ambos cebadores están relacionados con las secuencias adyacentes, se beneficia de la existencia en las etapas a y b de una adición específica de secuencia (para el ARN de longitud corta o una secuencia derivada del mismo) de las secuencias 5' y/o 3', y/o que la etapa b ha utilizado una estrategia específica para el ARN de longitud corta;
- al menos 2 oligonucleótidos, en la que al menos uno de dichos oligonucleótidos corresponde a o es complementario a una secuencia contigua en el polinucleótido de molde constituido por parte de la secuencia diana monocatenaria y parte de la secuencia de nucleótidos 5' o 3' adyacente —una realización en la que está presente un grado de especificidad relativamente alto en la etapa c debido al reconocimiento específico de parte del ARN de longitud corta (o una secuencia derivada del mismo) y donde puede ser ventajoso que la secuencia de nucleótidos 5' o 3' se haya añadido basándose en una estrategia específica de secuencia y/o que la etapa b haya utilizado una estrategia específica para el ARN de longitud corta; y
- al menos 2 oligonucleótidos, en la que uno corresponde a una primera secuencia de nucleótidos en la secuencia diana monocatenaria y el otro es complementario a una segunda secuencia de nucleótidos en la secuencia diana monocatenaria —una realización en la que está presente un alto grado de especificidad en la etapa c debido al reconocimiento específico del ARN de longitud corta (o una secuencia derivada del mismo).

Dichos cebadores usados para la qPCR pueden incluir cada uno independientemente un marcador detectable.

En otra realización, la reacción de la etapa (b) utiliza un cebador de transcripción inversa o un cebador de polimerización de ADN que corresponde a o es complementario a la secuencia diana monocatenaria o que corresponde a o es complementario a una secuencia contigua en el polinucleótido de molde constituida por parte de la secuencia diana monocatenaria y parte de la secuencia de nucleótidos 5' o 3' adyacente. Se prefiere que el cebador de transcripción inversa o cebador de polimerización de nucleótidos sea específico para al menos un ARN de longitud corta; esto refleja el hecho de que varios ARN de longitud corta se incluyen en ciertas familias que tienen un alto grado de identidad secuencia.

La secuencia de nucleótidos adyacente 5' y/o 3' añadida es un polinucleótido que consiste en nucleótidos idénticos (un efecto que puede obtenerse utilizando enzimas transferasa terminales para añadir la secuencia o, como alternativa, utilizando una polimerasa que añada restos de nucleótidos idénticos).

En cualquier caso, la secuencia diana monocatenaria y la secuencia o secuencias de nucleótidos adyacentes 5' y/o 3' pueden unirse covalentemente, pero también unirse no covalentemente —la cuestión importante es si la secuencia de molde puede someterse a transcripción inversa o polimerización de nucleótidos en la etapa b.

La secuencia de nucleótidos adyacente 5' y/o 3' en algunas realizaciones incluye un marcador detectable, facilitando de este modo la detección posterior.

En la mayoría de las realizaciones, la secuencia de nucleótidos adyacente 5' y/o 3' se une a la secuencia diana monocatenaria mediante una reacción enzimática, pero también se prevén reacciones no enzimáticas.

Las enzimas útiles para añadir nucleótidos idénticos incluyen, usando la Nomenclatura Enzimática de la IUBMB, las que se proporcionan a continuación:

Transferasas: EC 2.7.7.19 (polinucleótido adenililtransferasa), EC 2.7.7.52 (ARN uridililtransferasa) y EC 2.7.7.31 (ADN nucleotidilexotransferasa).

Ligasas: EC 6.5.1.1 (ADN ligasa (ATP)), EC 6.5.1.2 (ADN ligasa (NAD⁺)) y EC 6.5.1.3 (ARN ligasa (ATP)).

En ciertas realizaciones, la secuencia de nucleótidos adyacente 5' y/o 3' no aparece de forma natural en el organismo del que se obtiene la muestra de ARN. Se cree que esto reduce el riesgo de detectar secuencias irrelevantes en la muestra. Se prefiere que la secuencia de nucleótidos adyacente 5' y/o 3' no sea de mamífero.

En otras realizaciones, la etapa (a) comprende la preparación del polinucleótido de molde por ligación de la secuencia de nucleótidos adyacente 5' y/o 3' al ARN de longitud corta, o la etapa (a) comprende la preparación del polinucleótido de molde por unión de la secuencia de nucleótidos adyacente 5' y/o 3' al ARN de longitud corta en una reacción de transferasa terminal, preferentemente en una reacción de transferasa de poli-A. La ligación puede ser tanto específica de secuencia (por ejemplo, ligación de salientes) como ligación de extremos romos, pero se prefiere utilizar la ligación de salientes. En una versión preferida de ligación de salientes, el procedimiento implica aparear, con el ARN de longitud corta, un oligonucleótido en parte complementario al extremo reactivo con ligasa de la secuencia de nucleótidos adyacente 5' o 3', y en parte complementario al extremo reactivo con ligasa de la molécula de ARN de longitud corta para situar el extremo reactivo con ligasa de la secuencia de nucleótidos adyacente 5' o 3' directamente adyacente al extremo reactivo con ligasa de la molécula de ARN pequeño para permitir la ligación de salientes.

Una ventaja principal del uso de ligación o transferasas terminales es que todos los ARN en la muestra pueden volverse útiles para las etapas posteriores (que después, por otro lado, deberían ser altamente específicas). Esto permite la creación de, por ejemplo, una genoteca de ADNc inespecífica que posteriormente puede usarse para las etapas más específicas en b y c.

- 5 Típicamente, la ligación o la reacción de transferasa terminal se realizan solamente en el extremo 3' de la secuencia diana, pero la ligación con el extremo 5' de la secuencia diana puede realizarse por fosforilación del extremo 5' de la secuencia diana antes de la reacción de ligación. En cualquier caso, para evitar la "autoligación" de las secuencias de nucleótidos adyacentes, se prefiere bloquear uno de los extremos terminales (puesto que las ligasas requieren un 3'-hidroxilo y 5'-fosfato en las moléculas que se van a ligar, esto es una tarea bastante sencilla para el experto en la materia). Por lo tanto, la secuencia de nucleótidos adyacente 5' se bloquea en su extremo 5' terminal y la secuencia de nucleótidos adyacente 3' se bloquea en su extremo 3' terminal antes de la ligación, y puesto que estas dos secuencias de nucleótidos se añaden normalmente en etapas separadas, se evita que se autoliguen.

- 15 La secuencia o secuencias de nucleótidos adyacentes 5' y/o 3' están unidas preferentemente o exclusivamente a un estado de procesamiento definido de dicho ARN de longitud corta en la etapa (a). Esto significa que el medio para añadir la secuencia de nucleótidos adyacente utiliza una etapa de acoplamiento de secuencia que depende de la presencia de un extremo 3' o 5' libre en el ARN de longitud corta (por lo que se introduce una discriminación a lo largo de, por ejemplo, un ARN prematuro, que incluye la misma secuencia pero no en su extremo terminal pertinente). Se prefiere que el estado de procesamiento definido de dicho ARN sea el estado maduro.

- 20 La etapa (b) comprende en muchas realizaciones la transcripción inversa del polinucleótido de molde para obtener el ADNc (consúltese, por ejemplo, la Fig. 27). Sin embargo, como se ha mencionado anteriormente, la etapa b también puede comprender polimerización de nucleótidos en la etapa b para obtener el ADNc (consúltese, por ejemplo, la realización de la Fig. 31).

- 25 En lugar de utilizar ligación o transferasas terminales, la etapa (a) puede comprender una etapa de polimerización de nucleótidos para unir las secuencias de nucleótidos adyacentes. La polimerasa usada para este fin puede ser tanto una polimerasa independiente de molde como una dependiente de molde. Las polimerasas típicamente empleadas son ADN polimerasas.

Aun cuando las realizaciones preferidas utilizan una polimerización que es específica de molde, la polimerización también puede consistir en la adición de una cola de poli-A, poli-G, poli-T o poli-C al extremo 3' de la secuencia diana.

- 30 Sin embargo, como se ha mencionado, las realizaciones actualmente preferidas implican el uso de estrategias específicas de molde. En los casos de detección de microARN, un objeto de la invención es ser capaz de discriminar entre microARN maduro y prematuro y, en este contexto, es importante examinar dos situaciones diferentes: la situación en la que el microARN se sitúa en el extremo 3' terminal de su precursor prematuro y la situación en la que el microARN se sitúa en el extremo 5' terminal del precursor prematuro. Para discriminar las formas maduras de cada uno de estos precursores, se han usado diferentes estrategias.

Las siguientes realizaciones abordan diversos modos de conseguir esta discriminación, pero no están de ningún modo limitadas a la cuantificación de microARN, puesto que las realizaciones son útiles cuando se cuantifica o detecta cualquier ARN de longitud corta:

- 40 Una realización (consúltese la Fig. 27) implica que la etapa (a) comprende la preparación del polinucleótido de molde mediante las etapas de:

- aparear el extremo 3' del ARN de longitud corta con una sonda de captura oligonucleotídica (cuyo extremo 5' es complementario del extremo 3' del ARN de longitud corta) y
- extender el ARN de longitud corta por polimerización de nucleótidos usando la sonda de captura oligonucleotídica como molde para obtener una molécula de ARN de longitud corta extendida, que constituye el polinucleótido de molde. Típicamente, la polimerización de nucleótidos comprende una polimerización de ADN para obtener un híbrido de ARN-ADN que constituye el polinucleótido de molde.

- 50 En esta realización, la etapa (b) comprende preferentemente que la cadena híbrida de ARN-ADN se someta a transcripción inversa para obtener el ADNc, opcionalmente después de la eliminación de material que no se aparee con la sonda de captura oligonucleotídica (puede obtenerse si la sonda de captura incluye una etiqueta que permita la inmovilización). En la transcripción inversa, el cebador usado puede ser la propia sonda de captura oligonucleotídica o, como alternativa, un cebador de transcripción inversa separado (con frecuencia el caso cuando la sonda de captura puede inmovilizarse —en ese caso, el dúplex se desnaturaliza y el molde se transfiere a otro recipiente en el que se añaden el nuevo cebador y otros reactivos).

- 55 Otra realización (consúltese la Fig. 31) implica que la etapa (a) comprenda la preparación del polinucleótido de molde mediante las etapas de:

- aparear el extremo 5' del ARN de longitud corta con una sonda de captura oligonucleotídica cuyo extremo 3' es

complementario al 5' del ARN de longitud corta y cuyo extremo 5' comprende la secuencia de nucleótidos adyacente 5' y

- extender la sonda de captura por transcripción inversa usando el ARN de longitud corta como molde para obtener una sonda de captura extendida que constituye el polinucleótido de molde. En este caso, el polinucleótido de molde no incluye nada del ARN de longitud corta original.

Esta realización puede implicar además que la etapa (b) comprenda que el ARN de longitud corta se elimine de la sonda de captura extendida (por ejemplo, por elevación de la temperatura), se permita que la sonda de captura se aparee en su extremo 3' con un oligonucleótido auxiliar que comprende una secuencia de nucleótidos complementaria a la secuencia de nucleótidos adyacente 3', y la sonda de captura se alargue adicionalmente en la dirección 5'→3' para obtener el ADNc por medio de polimerización de ADN usando el oligonucleótido auxiliar como molde. Por lo tanto, en esta realización, hay adición de una secuencia de nucleótidos adyacente tanto 5' como 3', añadiéndose ambas por medio de una estrategia específica de secuencia diana.

Como se ha mencionado, ambas realizaciones pueden beneficiarse si el oligonucleótido de captura contiene un resto que permite la inmovilización sobre un soporte sólido. En tales casos, la sonda de captura se inmoviliza típicamente después del apareamiento para permitir la eliminación del material que no esté apareado.

Todas las realizaciones descritas en el presente documento pueden optimizarse por enriquecimiento de la muestra en la etapa (a) para ARN de longitudes cortas —esto puede realizarse por diversos procedimientos de separación conocidos por los expertos en la materia (cromatografía de exclusión por tamaño, electroforesis, etc.). Esto reduce el riesgo de obtener coincidencias de falsos positivos en la etapa de determinación derivadas de secuencias en el ARNm y otros fragmentos de ARN largos.

De acuerdo con los principios de la presente invención, la etapa c puede implicar cualquiera de los procedimientos de detección descritos en el presente documento. Sin embargo, se prefiere que la etapa (c) comprenda el uso de una sonda de detección que comprende nucleótidos modificados (tales como nucleótidos de LNA). En la mayoría de estas realizaciones, la sonda de detección corresponde a o es complementaria a una secuencia en el ARN de longitud corta, pero si las etapas anteriores a y b son suficientemente específicas, esto no es una necesidad —en esos casos, la sonda de detección podría ser específica para otras partes del producto de reacción de la etapa b.

Además, los diversos cebadores (y/o sondas de captura y/o oligonucleótidos auxiliares) usados en la transcripción inversa o en la polimerización de ADN o, en general, en las etapas a-c, pueden comprender nucleótidos modificados. La ventaja principal es que la longitud total de los cebadores y otros oligonucleótidos puede reducirse porque, por ejemplo, el LNA presenta un alto grado de hibridación con el ADN, de modo que puede obtenerse una unión específica de secuencia usando oligonucleótidos más cortos.

También es posible utilizar, como cebador en la detección en la etapa c, el mismo cebador usado en la etapa b, es decir, un cebador constituido por un cebador usado en la transcripción inversa o polimerización de nucleótidos de la etapa (b). De nuevo, si el grado de especificidad en las etapas en su totalidad es suficientemente alto para permitir una detección “sin interferencias” del ARN de longitud corta, entonces el uso de dicho cebador “reciclado” en la etapa c no afectará al procedimiento significativamente.

De acuerdo con la descripción de este aspecto general de la invención, también se describe un kit útil en la determinación cuantitativa de ARN de longitud corta maduro que tenga una longitud de como mucho 100 nucleótidos, comprendiendo dicho kit

- el número mínimo de cebadores de transcripción inversa y/o cebadores de polimerización de nucleótidos y/o cebadores para qPCR y/o sondas de captura oligonucleotídicas y/o oligonucleótidos auxiliares y/o sondas oligonucleotídicas que se usen en un procedimiento descrito en el presente documento, en el que los cebadores de transcripción inversa, cebadores de polimerización de nucleótidos, cebadores para qPCR, sondas de captura oligonucleotídicas, oligonucleótidos auxiliares y sondas oligonucleotídicas comparten las características descritas anteriormente; y
- instrucciones para la determinación cuantitativa del ARN de longitud corta maduro usando los cebadores de transcripción inversa y/o cebadores de polimerización de nucleótidos y/o cebadores para qPCR y/o sondas de captura oligonucleotídicas y/o oligonucleótidos auxiliares y/o sondas oligonucleotídicas. Todas las divulgaciones en relación con el suministro de kits son aplicables, cambiando lo que haya que cambiar, a este kit.

El kit puede comprender además una o más enzimas y otros reactivos, como se describen en el presente documento.

Como ejemplo de dicho “kit mínimo”, se proporciona lo siguiente para hacer uso del procedimiento expuesto en la Fig. 27 (los cebadores y sondas de referencia son opcionales):

El ensayo específico de miR

- Sonda de captura de LNA biotinilada
- Cebador inverso específico de miR

- Cebadores directo e inverso específicos de miR
- Sonda doblemente marcada específica de miR
- Oligonucleótido de control de ARN
- Oligonucleótido de control de ADN

5 El ensayo de ARNnp U6 de referencia

- Cebador de RT de ARNnp U6 de referencia/cebador hexamérico aleatorio
- Cebadores de ARNnp U6 de referencia y sonda doblemente marcada

Oligonucleótido	cantidad: 1 ensayo	10 ensayos	concentración	volumen
Sonda de captura de LNA biotinilada	0,5 pmol	5 pmol	0,5 μ M	1 μ l
Cebador inverso específico de miR	0,1 pmol	1 pmol	0,1 μ M	1 μ l
Cebador directo específico de miR	2,025 pmol	20,25 pmol	0,9 μ M	2,25 μ l
Cebador inverso específico de miR	2,025 pmol	20,25 pmol	0,9 μ M	2,25 μ l
Sonda doblemente marcada específica de miR	0,3125 pmol	3,125 pmol	0,25 μ M	1,25 μ l
Oligonucleótido de control de ARN	0,01 pmol	0,1 pmol	0,01 μ M	1 μ l
Oligonucleótido de control de ADN	0,01 pmol	0,1 pmol	0,01 μ M	1 μ l
Cebador de RT de ARNnp U6 de referencia/cebador hexamérico aleatorio	2 pmol	20 pmol	2 μ M	1 μ l
Cebador directo de ARNnp U6 de referencia	2,025 pmol	20,25 pmol	0,9 μ M	2,25 μ l
Cebador inverso de ARNnp U6 de referencia	2,025 pmol	20,25 pmol	0,9 μ M	2,25 μ l
Sonda doblemente marcada de ARNnp U6 de referencia	0,3125 pmol	3,125 pmol	0,25 μ M	1,25 μ l

Aspectos adicionales de la invención

10 Una vez que se han seleccionado las secuencias diana apropiadas, las sondas de etiquetado sustituidas con LNA y sondas de detección se sintetizan preferentemente químicamente usando procedimientos y equipos disponibles en el mercado, como se describe en la técnica (Tetrahedron 54: 3607-30, 1998). Por ejemplo, puede usarse el procedimiento de fosoramidita en fase sólida para producir sondas de LNA cortas (Caruthers, y col., Cold Spring Harbor Symp. Quant. Biol. 47: 411-418, 1982, Adams, y col., J. Am. Chem. Soc. 105: 661 (1983).

15 Las sondas que contienen LNA se marcan típicamente durante la síntesis. La flexibilidad de la estrategia de síntesis de fosoramidita facilita además la producción sencilla de LNA que lleven todos los engarces disponibles en el mercado, fluoróforos y moléculas de marcaje disponibles para esta química convencional. El LNA también puede marcarse por reacciones enzimáticas, por ejemplo, por acción de quinasas.

20 Las sondas de detección de acuerdo con la invención pueden comprender marcadores individuales o una pluralidad de marcadores. En un aspecto, la pluralidad de marcadores comprende una pareja de marcadores que interaccionan entre sí para producir una señal o para producir un cambio en una señal cuando se produce la hibridación de la sonda de detección con una secuencia diana.

25 En otro aspecto, la sonda de detección comprende un resto fluoróforo y un resto inactivador, situado de tal modo que el estado hibridado de la sonda puede distinguirse del estado no hibridado de la sonda por un aumento en la señal fluorescente del nucleótido. En un aspecto, la sonda de detección comprende, además del elemento de reconocimiento, primeras y segundas secuencias complementarias que hibridan específicamente entre sí, cuando la sonda no está hibridada con una secuencia de reconocimiento en una molécula diana, llevando la molécula inactivadora a una proximidad suficiente a dicha molécula indicadora para inactivar la fluorescencia de la molécula indicadora. La hibridación de la molécula diana distancia al inactivador de la molécula indicadora y da como resultado una señal, que es proporcional a la cantidad de hibridación.

30 En otro aspecto, la polimerización de cadenas de ácidos nucleicos puede detectarse usando una polimerasa con actividad nucleasa 5'. Se incorporan moléculas de fluoróforo e inactivador en la sonda en una proximidad suficiente de modo que el inactivador inactiva la señal de la molécula de fluoróforo cuando la sonda se hibrida con su

secuencia de reconocimiento. La escisión de la sonda por la polimerasa con actividad nucleasa 5' da como resultado la separación de la molécula de inactivador y fluoróforo, y la presencia en cantidades crecientes de señal como secuencias de ácido nucleico.

Las muestras adecuadas de moléculas de ácido nucleico diana pueden comprender una amplia variedad de células eucariotas y procariotas, incluyendo protoplastos; u otros materiales biológicos, que pueden albergar ácidos nucleicos diana. Los procedimientos son aplicables por lo tanto a células animales de cultivo de tejidos, células animales (por ejemplo, sangre, suero, plasma, reticulocitos, linfocitos, orina, tejido de médula ósea, líquido cefalorraquídeo, o cualquier producto preparado a partir de sangre o linfa) o cualquier tipo de biopsia tisular (por ejemplo, una biopsia de músculo, una biopsia de hígado, una biopsia de riñón, una biopsia de vejiga, una biopsia de hueso, una biopsia de cartílago, una biopsia de piel, una biopsia de páncreas, una biopsia del tracto intestinal, una biopsia de timo, una biopsia de mamas, una biopsia de útero, una biopsia testicular, una biopsia ocular o una biopsia cerebral, por ejemplo, homogeneizada en tampón de lisis), ácidos nucleicos de tejido de archivo, células vegetales u otras células sensibles a choque osmótico, y células de bacterias, levaduras, virus, micoplasmas, protozoos, rickettsias, hongos y otras células microbianas pequeñas, y similares.

Diversas reacciones de amplificación son bien conocidas por un experto en la materia e incluyen, pero sin limitación, PCR, RT-PCR, LCR, transcripción *in vitro*, PCR de círculo rodante, OLA y similares. También pueden usarse múltiples cebadores en una PCR múltiple para detectar un conjunto de moléculas diana específicas.

Preferentemente, las sondas de etiquetado, así como las sondas de detección de la invención, se modifican para aumentar la afinidad de unión de las sondas por la secuencia diana al menos dos veces en comparación con sondas de la misma secuencia sin la modificación, en las mismas condiciones para hibridación o condiciones de hibridación rigurosas. Las modificaciones preferidas incluyen, pero sin limitación, la inclusión de nucleobases, bases nucleosídicas o nucleótidos que se han modificado por un resto químico o sustituido por un análogo para aumentar la afinidad de unión. Las modificaciones preferidas también pueden incluir la unión de agentes estabilizantes de dúplex, por ejemplo, tales como agentes de unión a hendidura menor (MGB) o ácidos nucleicos intercalantes (INA). Además, las modificaciones preferidas también pueden incluir la adición de bases no discriminatorias, por ejemplo, tales como 5-nitroindol, que son capaces de estabilizar la formación del dúplex independientemente de la nucleobase en la posición opuesta de la cadena diana. Por último, también se consideran una modificación multisondas compuestas por una cadena principal distinta de azúcar fosfato, por ejemplo, tal como PNA, que son capaces de unir la secuencia específicamente a una secuencia diana. Todas las modificaciones de aumento de la afinidad de unión diferentes mencionadas anteriormente se denominarán en lo siguiente "la modificación o modificaciones estabilizantes", y las sondas de etiquetado y las sondas de detección se denominarán en lo siguiente "oligonucleótido modificado". Más preferentemente, la afinidad de unión del oligonucleótido modificado es de al menos aproximadamente 3 veces, 4 veces, 5 veces o 20 veces superior a la unión de una sonda de la misma secuencia pero sin la modificación o modificaciones estabilizantes.

Más preferentemente, la modificación o modificaciones estabilizantes incluyen uno o más análogos de nucleótidos de LNA. Las sondas de 6 a 30 nucleótidos de acuerdo con la invención pueden comprender de 1 a 8 nucleótidos estabilizantes, tales como nucleótidos de LNA. Cuando se incluyen al menos dos nucleótidos de LNA, estos pueden ser consecutivos o estar separados por uno o más nucleótidos distintos de LNA. En un aspecto, los nucleótidos de LNA son nucleótidos de alfa y/o xilo LNA.

También se describe una biblioteca de sondas que comprende sondas de etiquetado y sondas de detección con modificaciones estabilizantes, como se han definido anteriormente. Preferentemente, las sondas de detección son de menos de aproximadamente 20 nucleótidos de longitud y, más preferentemente, de menos de 15 nucleótidos y, más preferentemente, de aproximadamente 7 u 8 ó 9 ó 10 u 11 nucleótidos. Además, preferentemente, las sondas de etiquetado son de menos de aproximadamente 40 nucleótidos de longitud y, más preferentemente, menos de 35 nucleótidos y, más preferentemente, de aproximadamente 20 ó 30 nucleótidos. Además, preferentemente, la reacción de ligación de sondas de etiquetado y la sonda de etiquetado de RT y la sonda de etiquetado de 2ª cadena para la reacción de RT-PCR están compuestas por una secuencia de reconocimiento de etiquetado de alta afinidad de menos de aproximadamente 15 nucleótidos de longitud y, más preferentemente, menos de 14 nucleótidos y, más preferentemente, entre 6 y 13 nucleótidos y, además, por una secuencia anclada como sitio de cebador para cebadores de PCR de menos de aproximadamente 30 nucleótidos de longitud y, más preferentemente, menos de 25 nucleótidos y, más preferentemente, entre 15 y 20 nucleótidos. Las bibliotecas de sondas que contienen sondas de detección marcadas pueden usarse en una diversidad de aplicaciones dependiendo del tipo de elemento de detección unido al elemento de reconocimiento. Estas aplicaciones incluyen, pero sin limitación, ensayos de marcaje doble o individual tales como ensayo de nucleasa 5', aplicaciones de balizas moleculares (véase, por ejemplo, Tyagi y Kramer Nat. Biotechnol. 14: 303-308, 1996) y otros ensayos basados en FRET.

Los problemas con los ensayos de cuantificación existentes para microARN, ARNip, transcritos de ARN editado, variantes de corte y empalme alternativo y ARN antisentido no codificantes, como se han resumido anteriormente, se abordan mediante el uso de las sondas en combinación con cualquiera de los procedimientos de la invención que consisten en un conjunto de sondas de etiquetado de ARN y sondas de detección o conjuntos de sondas de etiquetado de RT de ARN combinadas con sondas de etiquetado de 2ª cadena y sondas de detección, seleccionadas para reconocer o detectar la mayoría de todos los miARN, transcritos de ARN editado, ARNip,

variantes de corte y empalme alternativo y ARN antisentido no codificantes descubiertos y detectados en un tipo celular dado a partir de un organismo dado. En un ejemplo, la biblioteca de sondas comprende sondas que etiquetan y detectan miARN maduros de mamíferos, por ejemplo, tales como miARN de ratón, rata, conejo, mono o ser humano. Al proporcionar un procedimiento útil económico para ensayos de PCR de punto final y a tiempo real

5 cuantitativa para miARN maduros, transcritos de ARN editado, ARNip, variantes de corte y empalme alternativo y ARN antisentido no codificantes, la presente invención supera las limitaciones analizadas anteriormente, especialmente para ensayos de miARN y ensayos de ARNip convencionales. El elemento de detección de las sondas de detección puede estar individualmente o doblemente marcado (por ejemplo, comprendiendo un marcador en cada extremo de la sonda o en una posición interna). Por lo tanto, las sondas pueden adaptarse para su uso en

10 ensayos de nucleasa 5', ensayos de balizas moleculares, ensayos de FRET y otros ensayos similares. En un ejemplo, la sonda de detección comprende dos marcadores capaces de interactuar entre sí para producir una señal o modificar una señal, de modo que puede detectarse una señal o un cambio en una señal cuando la sonda hibrida con una secuencia diana. Un aspecto particular es cuando los dos marcadores comprenden un inactivador y una molécula indicadora.

15 En otro aspecto, la sonda comprende un segmento de reconocimiento específico de diana capaz de hibridar específicamente con una molécula diana que comprende la secuencia de reconocimiento complementaria. Un aspecto de detección particular de la invención denominado "baliza molecular con una región de tallo" es cuando el segmento de reconocimiento está flanqueado por primeras y segundas secuencias formadoras de horquilla complementarias que pueden aparearse para formar una horquilla. Un marcador indicador se une al extremo de una

20 secuencia complementaria y un resto inactivador se une al extremo de la otra secuencia complementaria. El tallo formado cuando la primera y la segunda secuencias complementarias se hibridan (es decir, cuando el segmento de reconocimiento de la sonda no está hibridado a su diana) mantiene estos dos marcadores en estrecha proximidad entre sí, causando que una señal producida por el indicador se inactive por transferencia de energía por resonancia de fluorescencia (FRET). La proximidad de los dos marcadores se reduce cuando la sonda se hibrida con una

25 secuencia diana y el cambio en la proximidad produce un cambio en la interacción entre los marcadores. La hibridación de la sonda da por lo tanto como resultado una señal (por ejemplo, fluorescencia) que se produce por la molécula indicadora, que puede detectarse y/o cuantificarse.

En otro aspecto más, la sonda de detección diana comprende un indicador y una molécula inactivadora en extremos opuestos de la secuencia de reconocimiento diana corta, de modo que estos restos están en una proximidad

30 suficiente entre sí para que el inactivador reduzca sustancialmente la señal producida por la molécula indicadora. Este es el caso tanto cuando la sonda está libre en solución como cuando está unida al ácido nucleico diana. Un aspecto de detección particular de la invención denominado "ensayo de nucleasa 5'" es cuando la sonda de detección puede ser susceptible a la escisión por la actividad nucleasa 5' de la ADN polimerasa. Esta reacción puede dar como resultado posiblemente la separación de la molécula inactivadora de la molécula indicadora, y la

35 producción de una señal detectable. Por lo tanto, dichas sondas pueden usarse en ensayos basados en amplificación para detectar y/o cuantificar el procedimiento de amplificación para un ácido nucleico diana.

También se describe un procedimiento, sistema y programa informático incorporado en un medio legible por ordenador ("un producto de programa informático") para diseñar sondas de etiquetado y sondas de detección que comprenden al menos una nucleobase estabilizante. El procedimiento comprende realizar una consulta en una base

40 de datos de secuencias diana (por ejemplo, tal como el registro de miARN en <http://www.sanger.ac.uk/Software/Rfam/mima/index.shtml>) y diseñar sondas que: i) tengan una estabilidad de unión suficiente para unirse a su secuencia diana respectiva en condiciones de hibridación rigurosas, ii) tengan una tendencia limitada a formar estructuras de dúplex consigo mismas, y iii) sean capaces de unirse a y detectar/cuantificar al menos aproximadamente el 60%, al menos aproximadamente el 70%, al menos

45 aproximadamente el 80%, al menos aproximadamente el 90% o al menos aproximadamente el 95% de todas las secuencias dianas en la base de datos dada.

Programa de diseño de sondas de captura

También se describe un procedimiento, sistema y programa informático incorporado en un medio elegible por ordenador ("un producto de programa informático") para diseñar la secuencia de nucleótidos para aplicar la sonda de

50 captura.

El procedimiento consiste en las etapas siguientes:

- a) Estimación inicial de una o más secuencias de nucleótidos para aplicar la sonda o sondas de captura.
 - b) Mejora iterativa de las estimaciones iniciales basándose en el cumplimiento de las condiciones y objetivos.
 - c) Interrupción del algoritmo cuando existe un cumplimiento suficiente de las condiciones y objetivos, incluyendo
- 55 también el tiempo de cómputo usado en el procedimiento actual.

La temperatura de fusión se denomina "Tm".

Descripción detallada de las tres etapas:

A) La estimación inicial se basa en que la secuencia de miARN coincida con una lista de cebadores inversos adecuados encontrados usando un *software* de descubrimiento de cebadores (primer3). Se generan secuencias aleatorias para rellenar las partes no inicializadas de la sonda de captura. La generación aleatoria está guiada por el uso de tablas de Tm de dinucleótidos para asegurar secuencias con Tm en la proximidad del valor de Tm fijado como objetivo.

B) La mejora iterativa estará dirigida por una función de puntuación basada en los objetivos y condiciones y de tablas de Tm de dinucleótidos. Se realizan cambios aleatorios para evitar una iteración subóptima.

C) El algoritmo se interrumpe cuando se cumple una función de puntuación basada en los objetivos, condiciones y el tiempo de cómputo.

Los objetivos para obtener las condiciones de cebador y sonda se enumeran a continuación:

1. La condición de temperatura de fusión para la hibridación de la sonda de captura hacia el miARN

La temperatura de fusión del dúplex formado por la sonda de captura y el miARN se amplía para que sea adecuada para una reacción de extensión de ADN polimerasa. La longitud de oligonucleótido dentro de este dúplex debería satisfacer la condición de Tm para una reacción de extensión de ADN polimerasa mencionada anteriormente. El miARN hibridaba con el extremo 3' de la sonda de captura.

2. La condición de temperatura de fusión para el dúplex formado por la sonda de captura y el miARN extendido por ADN polimerasa

La Tm del dúplex formado por la sonda de captura y la diana de miARN extendida por ADN polimerasa no se permite que supere la temperatura por medio de la cual el heterodúplex puede desnaturalizarse sin destruir la diana de ARN-ADN.

3. La relación entre la sonda de captura y el cebador de transcripción inversa (RT)

El cebador de RT es de idéntica secuencia al extremo 5' de la sonda de captura e hibrida con el extremo 3' del miARN extendido por ADN polimerasa. La Tm para este dúplex formado por cebador de RT y miARN extendido por ADN polimerasa tiene que ser adecuada para una síntesis de primera cadena usando una transcriptasa inversa.

4. La diferenciación entre el miARN maduro y precursor

No se permite que el extremo 3' del miARN precursor hibride con una cantidad significativa de oligonucleótidos en la sonda de captura en las condiciones de hibridación dadas para la reacción de captura. Asimismo, no se permite que los monómeros precedentes después del motivo de secuencia de miARN maduro dentro de la secuencia de miARN precursor hibriden con la secuencia de sonda de captura no relacionada con miARN.

Una condición general para cada sonda y cebador diseñado es la necesidad de un bajo autoapareamiento y una baja autohibridación.

Programa de diseño de sonda doblemente marcada

También se describe un procedimiento, sistema y programa informático incorporado en un medio legible por ordenador ("un producto de programa informático") para diseñar secuencias de nucleótidos para aplicar en la sonda doblemente marcada. La sonda doblemente marcada se usa para la detección de un miARN particular o una familia particular de miARN con una especificidad máxima.

La sonda doblemente marcada debe cumplir las condiciones siguientes:

- a) Un requisito de bajo autoapareamiento y baja autohibridación.
- b) Debe aparearse con la diana teniendo una Tm adecuada para funcionar en la reacción de PCR.
- c) No debe aparearse con los cebadores en la reacción de PCR.

El procedimiento consiste en las etapas siguientes:

A) Un diseño de sondas con una especificidad máxima hacia miARN o una familia de miARN. Las sondas preferidas que cumplen las condiciones, denominadas coincidencias de sondas doblemente marcadas, se investigan por la capacidad de las sondas doblemente marcadas para unirse a otros miARN. A una coincidencia de sonda doblemente marcada se le asigna después una puntuación de especificidad de acuerdo con una función de puntuación. Una coincidencia de secuencia, la longitud de la secuencia y el uso de nucleótidos modificados con LNA en la secuencia determinan una coincidencia de sonda doblemente marcada.

B) Las coincidencias de sonda doblemente marcada se puntúan por cómo de bien cumplen las condiciones anteriores. Las sondas doblemente marcadas se puntúan por cómo de bien cumplen las condiciones anteriores.

de acuerdo con las funciones de puntuación. La puntuación de especificidad y las puntuaciones de las condiciones se usan después para decidir la mejor secuencia de nucleótidos de sonda doblemente marcada.

El inactivador se selecciona preferentemente de inactivador oscuro como se desvela en la Solicitud EP N° 2004078170.0, en compuestos particulares seleccionados de 1,4-bis-(3-hidroxi-propilamino)-antraquinona, 1-(3-(4,4'-dimetoxi-tritiloxi)propilamino)-4-(3-hidroxi)propilamino)-antraquinona, 1-(3-(2-cianoetoxi(diisopropilamino)fosfinoxi)propilamino)-4-(3-(4,4'-dimetoxi-tritiloxi)propilamino)-antraquinona (#Q1), 1,5-bis-(3-hidroxi-propilamino)-antraquinona, 1-(3-hidroxi)propilamino)-5-(3-(4,4'-dimetoxi-tritiloxi)propilamino)-antraquinona, 1-(3-(cianoetoxi(diisopropilamino)fosfinoxi)propilamino)-5-(3-(4,4'-dimetoxi-tritiloxi)propilamino)-antraquinona (#Q2), 1,4-bis-(4-(2-hidroxi)etil)fenilamino)-antraquinona, 1-(4-(2-(4,4'-dimetoxi-tritiloxi)etil)fenilamino)-4-(4-(2-hidroxi)etil)fenilamino)-antraquinona, 1-(4-(2-(2-cianoetoxi(diisopropilamino)fosfinoxi)etil)fenilamino)-4-(4-(2-(4,4'-dimetoxi-tritiloxi)etil)fenilamino)-antraquinona y 1,8-bis-(3-hidroxi-propilamino)-antraquinona; o como alternativa seleccionados de 6-metil-quinizarina, 1,4-bis(3-hidroxi)propilamino)-6-metil-antraquinona, 1-(3-(4,4'-dimetoxi-tritiloxi)propilamino)-4-(3-hidroxi)propilamino)-6(7)-metil-antraquinona, 1-(3-(2-cianoetoxi(diisopropilamino)fosfinoxi)propilamino)-4-(3-(4,4'-dimetoxi-tritiloxi)propilamino)-6(7)-metil-antraquinona, 1,4-bis(4-(2-hidroxi)etil)fenilamino)-6-metil-antraquinona, 1,4-dihidroxi-2,3-dihidro-6-carboxi-antraquinona, 1,4-bis(4-metil-fenilamino)-6-carboxi-antraquinona, 1,4-bis(4-metil-fenilamino)-6-(N-(6,7-dihidroxi-4-oxo-heptano-1-il))carboxamido-antraquinona, 1,4-bis(4-metil-fenilamino)-6-(N-(7-dimetoxitritiloxi-6-hidroxi-4-oxo-heptano-1-il))carboxamido-antraquinona, 1,4-bis(4-metil-fenilamino)-6-(N-(7-(2-cianoetoxi(diisopropilamino)fosfinoxi)-6-hidroxi-4-oxo-heptano-1-il))carboxamido-antraquinona, 1,4-bis(propilamino)-6-carboxi-antraquinona, 1,4-bis(propilamino)-6-(N-(6,7-dihidroxi-4-oxo-heptano-1-il))carboxamido-antraquinona, 1,4-bis(propilamino)-6-(N-(7-di-metoxitritiloxi-6-hidroxi-4-oxo-heptano-1-il))carboxamido-antraquinona, 1,5-bis(4-(2-hidroxi)etil)-fenilamino)-antraquinona, 1-(4-(2-hidroxi)etil)fenilamino)-5-(4-(2-(4,4'-dimetoxi-tritiloxi)etil)fenilamino)-antraquinona, 1-(4-(2-(cianoetoxi(diisopropilamino)fosfinoxi)etil)fenilamino)-5-(4-(2-(4,4'-dimetoxi-tritiloxi)etil)fenilamino)-antraquinona, 1,8-bis(3-hidroxi)propilamino)-antraquinona, 1-(3-hidroxi)propilamino)-8-(3-(4,4'-dimetoxi-tritiloxi)-propilamino)-antraquinona, 1,8-bis(4-(2-hidroxi)etil)fenilamino)-antraquinona y 1-(4-(2-hidroxi)etil)fenilamino)-8-(4-(2-(4,4'-dimetoxi-tritiloxi)etil)fenilamino)-antraquinona.

Un procedimiento preferido para acoplamiento covalente de oligonucleótidos en soportes sólidos diferentes es la inmovilización fotoquímica usando una antraquinona fotoquímicamente activa unida al extremo 5' o 3' del oligonucleótido como se describe en el documento WO 96/31557 o en el documento WO 99/14226.

En otra realización preferida, la alta afinidad y especificidad de los oligonucleótidos modificados con LNA se aprovecha en la captura y la purificación específicas de secuencia de ácidos nucleicos naturales o sintéticos. En un aspecto, los ácidos nucleicos naturales o sintéticos se ponen en contacto con el oligonucleótido modificado con LNA inmovilizado en una superficie sólida. En este caso, la hibridación y la captura se producen simultáneamente. Los ácidos nucleicos capturados pueden, por ejemplo, detectarse, caracterizarse, cuantificarse o amplificarse directamente en la superficie por una diversidad de procedimientos bien conocidos en la técnica, o pueden liberarse de la superficie antes de que se produzca dicha caracterización o amplificación, sometiendo el oligonucleótido modificado inmovilizado y el ácido nucleico capturado a condiciones de deshibridación, tales como, por ejemplo, calor, o usando tampones de baja fuerza iónica.

En otro aspecto, el oligonucleótido modificado con LNA lleva un ligando unido covalentemente al extremo 5' ó 3'. En este caso, el oligonucleótido modificado con LNA se pone en contacto con los ácidos nucleicos naturales o sintéticos en solución, después de lo cual los híbridos formados se capturan sobre un soporte sólido que lleva moléculas que pueden unirse específicamente al ligando.

La base de datos de secuencias diana puede comprender secuencias de ácido nucleico correspondientes a miARN de ser humano, ratón, rata, *Drosophila melanogaster*, *C. elegans*, *Arabidopsis thaliana*, maíz, hongos, pez cebra, *Gallus gallus*, virus o arroz.

El procedimiento puede comprender además calcular la estabilidad basándose en la asunción de que la secuencia de reconocimiento comprende al menos un nucleótido estabilizante, tal como una molécula de LNA. En un aspecto preferido, la estabilidad calcula se usa para eliminar sondas con una estabilidad inadecuada de la base de datos de sondas candidatas virtuales antes de la consulta inicial frente a la base de datos de secuencias diana para iniciar la identificación de secuencias de reconocimiento de sondas óptimas.

El procedimiento puede comprender calcular la capacidad para una secuencia de sonda dada para formar una estructura de dúplex consigo misma basándose en la asunción de que la secuencia comprende al menos un nucleótido estabilizante, tal como una molécula de LNA. En un aspecto preferido, la tendencia calculada se usa para eliminar secuencias de sonda que es probable que formen dúplex de sondas a partir de la base de datos de sondas candidatas virtuales.

También se proporcionan kits para la detección o cuantificación de miARN, ARNip, transcritos de ARN editado, transcritos antisentido no codificantes o variantes de corriente y empalme alternativo diana que comprenden bibliotecas de sondas de etiquetado y sondas de detección de diana. En un ejemplo, el kit comprende protocolos mediante simulación por ordenador para su uso. En otro ejemplo, el kit comprende información en relación con

sugerencias para obtener cebadores de ADN económicos. Las sondas contenidas dentro de estos kits pueden tener cualquiera o todas las características descritas anteriormente. En un ejemplo preferido, una pluralidad de sondas comprende al menos un nucleótido estabilizante, tal como un nucleótido de LNA. En otro ejemplo, la pluralidad de sondas comprende un nucleótido acoplado a o asociado de forma estable con al menos un resto químico para aumentar la estabilidad de unión de la sonda. El kit permite a un usuario desarrollar rápida y eficazmente un ensayo para diferentes dianas de miARN, dianas de ARNip, transcritos de ARN editado, transcritos antisentido no codificantes o variantes de corte y empalme alternativo.

En general, la invención presenta el diseño de sondas oligonucleotídicas de alta afinidad que tienen propiedades estabilizantes de dúplex y procedimientos altamente útiles para una diversidad de procedimientos de detección, amplificación y cuantificación de ácidos nucleico diana (por ejemplo, controlar la expresión de microARN o ARNip mediante PCR cuantitativa a tiempo real). Algunas de estas sondas oligonucleotídicas contienen nuevos nucleótidos creados por combinación de nucleobases sintéticas especializadas con una cadena principal de LNA, creando de este modo oligonucleótidos de alta afinidad con propiedades especializadas tales como una discriminación de secuencia reducida para la cadena complementaria o una capacidad reducida para formar estructuras bicatenarias intramoleculares. La invención también proporciona procedimientos mejorados para detectar y cuantificar ácidos nucleicos en una muestra de ácido nucleico compleja. Otras bases modificadas deseables tienen una capacidad disminuida para autoaparearse o formar dúplex con sondas oligonucleotídicas que contienen una o más bases modificadas.

Ejemplos

La invención se ilustrará ahora adicionalmente con referencia a los ejemplos siguientes. Se apreciará que lo siguiente es a modo de ejemplo solamente y que pueden realizarse modificaciones de los detalles que al mismo tiempo se incluyan todavía dentro del alcance de la invención.

En los Ejemplos siguientes los número de referencia de sondas designan las secuencias oligonucleotídicas de LNA mostradas en los ejemplos de síntesis a continuación.

Evaluación de la sensibilidad y especificidad de los ensayos de PCR cuantitativa a tiempo real para la secuencia diana de microARN miR-15a humano

Materiales y procedimientos

1. Diseño y síntesis de las sondas de etiquetado y sondas de detección oligonucleotídicas para la detección y cuantificación de microARN

Los oligonucleótidos de ARN (EQ15885 y EQ15886) se adquirieron en DNA Technology (Aarhus, Dinamarca) y se purificaron por cromatografía en fase inversa (RP-HPLC). Los oligonucleótidos de ARN se disolvieron en H₂O tratada con dietil pirocarbonato (DEPC) y las concentraciones se determinaron en un NanoDrop ND-1000 (NanoDrop technologies, Estados Unidos). De otro modo, los oligonucleótidos se sintetizaron o los oligonucleótidos de ADN convencionales se adquirieron en DNA technology.

Tabla I: El diseño de las sondas de etiquetado de microARN, los moldes de transcripción sintéticos y las sondas de detección

EQ N°	Nombre	Extremo 5'	Secuencia ^a	Extremo 3'
7396	M13 dir		gtaaaacgacgccagt	
7655	pTRLamp18 M13 inv		gaaacagctatgacatg	
15848	Sonda de hsa-miR-15a micROLA 1		aTgtGctGcTaactggccgtcgttttac	
15849	Sonda de hsa-miR-15a micROLA 2		gaaacagctatgacatgcacAaamCcaT t	
15852	ADN de hsa-miR-15a fos		tagcagcacataatggtttgtg	P
15853	ADN de hsa-miR-16 fos		tagcagcacgtaaatttggcg	P
15866	hsa-miR-15 A_02	6-Fitc	aATGGTTTG#Q1z	P
15867	hsa-miR-15 A_03	6-Fitc	tGTGmCTGmCT#Q1z	P
15885	ARN de hsa-miR-15a		uagcagcacauaauugguuugug	
15886	ARN de hsa-miR-16		uagcagcacguaaaauuggcg	

(continuación)

EQ N°	Nombre	Extremo 5'	Secuenciaa	Extremo 3'
15887	hsa miR-15a M13 dir ex		cgtaaacgacggccagt	
15888	hsa miR-15a M13 inv ex		caagtcttgaaacagctatgacatg	

^aLNA (mayúsculas), ADN (minúsculas), ARN (*cursiva y minúsculas*), 5-metil C (mC); Fluoresceína (6-FITC (Glenn Research, N° Id. Prod. 10-1964)), #Q1 (Preparado como se describe en el Ejemplo 8a), z (5-nitroindol (Glenn Research, N° Id. Prod. 10-1044)) y Fosfato (P).

La sonda de etiquetado de microARN miR-15a humano con la secuencia de reconocimiento de extremo 3' se 5'-fosforiló enzimáticamente en una reacción de 50 µl usando 10 U de polinucleótido quinasa de T4 (New England Biolabs (NEB) Estados Unidos), 400 pmol de sonda de microARN hsa-miR-15a 1 (EQ15848) y tampón de ADN ligasa de T4 1x (NEB, Estados Unidos). La reacción se incubó 30 min a 37°C y se inactivó por calor 10 min a 70°C. La quinasa se eliminó por adición de 50 µl de H₂O tratada con DECP y filtración de la reacción a través de una columna de centrifugación YM-30 Microcon (Millipore, Estados Unidos) 3 min a 14000 X g. La concentración de la sonda de etiquetado fosforilada se determinó en un NanoDrop ND-1000 (NanoDrop technologies, Estados Unidos).

2. Reacciones de ligación con molde de microARN

La reacción de ligación se realizó en 20 µl que consistían en molde de ARN miR-15a 120 nM (EQ15885), 120 nM de cada sonda de etiquetado de microARN (EQ15848 (véase anteriormente) y EQ15849 fosforiladas), Tris-HCl 10 mM pH 7,0 (Ambion, Estados Unidos), MgCl₂ 10 mM (PE Biosystems, Estados Unidos), tampón de ADN ligasa de T4 0,05X [TRIS-HCl 2,5 mM, MgCl₂ 0,5 mM, DTT 0,5 mM, ATP 50 µM, BSA 1,25 µg/ml, pH 7,5 a 25°C; (NEB, Estados Unidos)]. Las reacciones se preincubaron durante 15 min a 37°C y se añadieron 800 U de ADN ligasa de T4 y se incubaron durante 2 horas adicionales a 37°C. Por último, las reacciones se inactivaron por calor 20 min a 65°C. La reacción de ligación se repitió usando ADN de miR-15a (EQ15852), ARN de miR-16 (EQ15886) como Diana o sin molde en lugar de la diana de ARN miR-15a. Además de la proporción molar de 1:1 de la diana:sondas de etiquetado de microARN, se usaron las proporciones de 5:1 y 1:5 en reacciones de ligación separadas.

La reacción de ligación realizada usando el kit de ligación Quick (NEB, Estados Unidos) se llevó a cabo de acuerdo con las instrucciones del proveedor. En resumen, los oligonucleótidos eran los mismos que se han descrito anteriormente. En una mezcla de reacción de 20 µl, los oligonucleótidos y tampón de ligación Quick 1 X (NEB, Estados Unidos) se incubaron 15 min a 25°C y se añadió 1 µl de ADN ligasa de T4 Quick (NEB, Estados Unidos), y la incubación se prolongó durante 30 min adicionales. La enzima se inactivó por calor durante 20 min a 65°C.

3. Ensayos de reacción en cadena de la polimerasa (PCR) a tiempo real

3.1 Ensayos de PCR a tiempo real de microARN usando detección con verde SYBR

La reacción comprendía (50 µl) de mezcla maestra de PCR de verde SYBR® 1X (Applied Biosystems, Estados Unidos), 200 nM de cebador directo M13 (EQ7396), 200 nM de cebador inverso M13 (EQ7655) y 2,5 µl de reacción de ligación (descrita anteriormente). Procedimiento de ciclado: 10 min 95°C, 50 ciclos de 15 s 95°C, 1 min 45°C, 1 min 60°C y finalmente disociación 20 min de 60°C a 95°C en un Sistema de Detección de Secuencia ABI Prism® 7000.

3.2. Ensayos de PCR a tiempo real de microARN usando sondas de detección modificadas con LNA

La reacción (50 µl) era de mezcla maestra de PCR de sonda QuantiTect 1X (Qiagen, Alemania), 200 nM de cebador directo M13 de hsa miR-15a (EQ15887), 200 nM de cebador inverso M13 de hsa miR-15a (EQ15888), 100 nM de sonda específica de secuencia de LNA (EQ15866 o EQ15867), 2,5 µl de reacción de ligación (descrita anteriormente). Procedimiento de ciclado: 15 min 95°C, 50 ciclos de 20 s a 95°C, 1 min a 60°C en un Sistema de Detección de Secuencia ABI Prism® 7000.

En lo siguiente, dUTP significa 2'-desoxiuridina-5'-trifosfato

Ejemplo 1

Ensayo de PCR cuantitativa a tiempo real para la secuencia diana de microARN miR-15a humano.

Las sondas de etiquetado de microARN modificadas con LNA específicas de secuencia se aparearon y se ligaron. Los moldes ligados se detectaron posteriormente usando PCR a tiempo real, cebadores de PCR de anclaje y una sonda de detección doblemente marcada modificada con LNA para el microARN miR-15a usando un menos molde como control negativo. La especificidad de la reacción se ensayó usando una reacción sin ligasa. El ciclo umbral (Ct), que representa el ciclo de PCR al que puede detectarse por primera vez un aumento en la fluorescencia de indicador por encima de una señal basal, para las sondas de microARN ligadas usando el molde de microARN miR-

15a, fue de 35,0 (Fig. 2A), mientras que no eran detectables valores de Ct para los experimentos de control negativo (menos molde y menos ligasa, respectivamente). La señal de indicador normalizada (Rn) se mide a lo largo de la reacción de PCR, que representa la señal de fluorescencia del colorante indicador dividida por la señal de fluorescencia del colorante de referencia pasivo. Durante la PCR, la Rn aumenta a medida que aumenta el número de copias de amplicón, hasta que la reacción se aproxima a una meseta. La Rn corregida por la medida basal (ΔRn) representa la Rn menos la señal basal que se estableció en los primeros cuantos ciclos de PCR. Para el análisis de punto final (Fig. 2B) las muestras de PCR a tiempo real (4 μ l) se aplicaron en un gel de agarosa al 2% teñido con Gelstar 1:10000 y electroforesis en tampón de 1 tubo (Tris-borato 90 mM, EDTA 2 mM, pH 8,3) durante 2 horas a 8 V/cm. El Carril 1 muestra las sondas de etiquetado de miR-15a ligadas como molde en la PCR a tiempo real. Los controles negativos eran el Carril 2: menos molde y el Carril 3: sin ligasa.

Ejemplo 2

Ensayo de PCR cuantitativa a tiempo real para la secuencia diana de microARN miR-15a humano y la diana bloqueada en 3' de ADN correspondiente

El modelo de ARN se sustituyó por un molde de ADN que se bloqueó químicamente con un fosfato en el extremo 3'. Sin la adición de ligasa en la reacción de ligación, el molde de ADN bloqueado no podía detectarse en el ensayo de PCR a tiempo real específica de secuencia de LNA. Los valores de Ct para el molde de ARN y el molde de ADN eran de 35,0 y 33,3, respectivamente (Fig. 3).

Ejemplo 3

Especificidad de los ensayos de PCR cuantitativa a tiempo real para las secuencias diana de microARN miR-15a humano y miR-16 humano.

El reconocimiento de secuencia diana de microARN específico de secuencia del procedimiento de la invención se evaluó usando la diana de microARN miR-15a en comparación con la diana de miR-16 humano que tiene una identidad de secuencia del 72% con la secuencia diana miR-15a. Ni el control menos molde ni el control sin molde (NTC) en la reacción de PCR a tiempo real demostraron proporcionar ninguna señal. Usando las condiciones de hibridación para el apareamiento de las sondas de etiquetado específicas de secuencia diana de miR-15a modificadas con LNA, como se han descrito anteriormente, hacia la diana de miR-15a dio como resultado un valor de Ct de 36,2, mientras que el uso de las mismas sondas de etiquetado para el miR-16 altamente homólogo dio como resultado un valor de Ct de 39,9, correspondiente a una diferencia discriminatoria de 13 veces (Fig. 4).

Ejemplo 4

Ensayos de PCR cuantitativa a tiempo real para la secuencia diana de microARN miR-15a humano usando dos sondas de detección doblemente marcadas modificadas con LNA diferentes.

Se diseñaron dos sondas de detección de PCR a tiempo real modificadas con LNA diferentes para la secuencia diana de microARN miR-15a humano usando las mismas sondas de etiquetado modificadas con LNA mediante el kit de ligación de ADN de T4 Quick. El uso de las sondas de detección modificadas con LNA EQ15866 y EQ15867 en los ensayos de PCR a tiempo real dio como resultado valores de Ct de 38,2 y 32,2, respectivamente (Fig. 5). No se detectaron señales de ambos controles menos ligasa (EQ15866 cuadrados en blanco; EQ15867 triángulos en blanco).

Ejemplo 5

Ensayos de PCR cuantitativa a tiempo real para la secuencia diana de miR-15a humano usando diferentes proporciones molares entre la diana y las sondas de etiquetado de miR-15a.

Las proporciones molares entre la diana y las sondas de etiquetado que eran de 1:1 dieron como resultado la mayor señal de fluorescencia de punto final (Fig. 6) (valor de ΔRn), mientras que las proporciones molares de 1:5 dieron como resultado la menor señal de punto final (valor de ΔRn). Un exceso molar de las sondas de etiquetado de miR-15a (proporción molar de 1:5) también dio como resultado una señal de punto final específica (Fig. 6), mientras que el control sin molde (NTC) en la reacción de PCR no mostró ninguna señal de fluorescencia significativa.

Ejemplo 6

Ensayos de PCR cuantitativa a tiempo real para la secuencia diana de miR-15a humano adicionada a un fondo complejo de ARN de levadura Torulla usando las sondas de etiquetado de miR-15a y la sonda de detección modificada con LNA de mejor modo.

El microARN miR-15a se adicionó a 10 μ g en ARN de levadura *Torulla* a concentraciones de 2,4 μ M y 1 μ M, se apareó con las sondas de etiquetado de miR-15a a concentraciones equimolares, respectivamente, seguido de ligación y detección de miR-15a mediante PCR a tiempo real cuantitativa. La mayor señal de fluorescencia se observó a partir del control de secuencia diana de miR-15a (sin el fondo de ARN total de levadura complejo),

mientras que no se detectaron señales de fluorescencia a partir de la muestra de ARN total de levadura (Fig. 7). No se observó contaminación de los ensayos de PCR a tiempo real, según se demostró con el control menos molde.

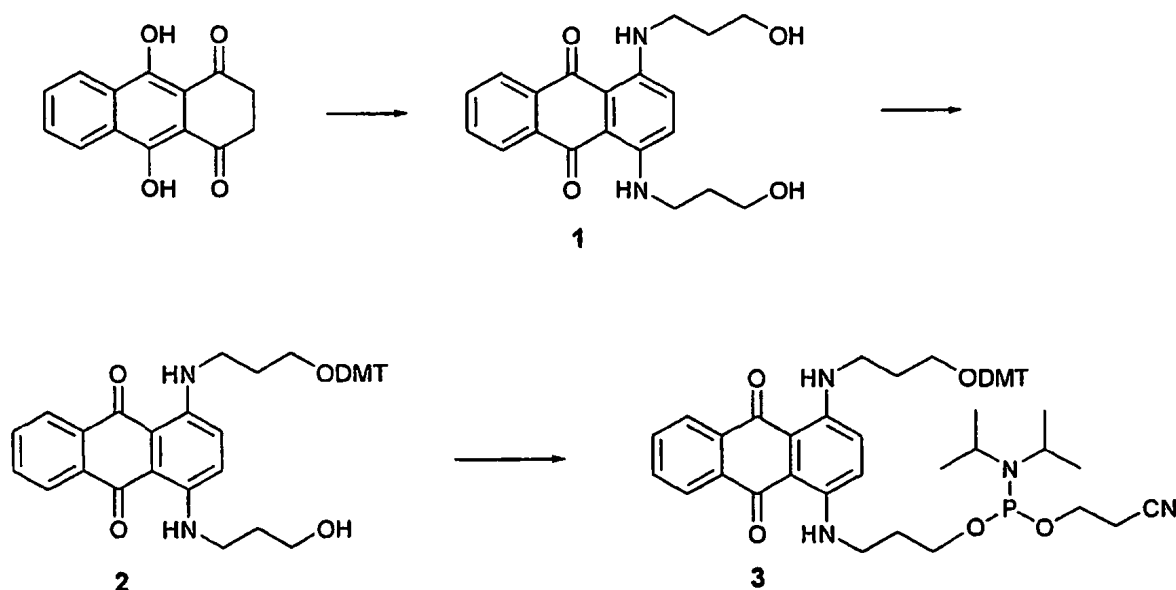
Ejemplo 7

5 *Ensayo de PCR cuantitativa a tiempo real para la secuencia diana de microARN miR-15a humano usando detección con SYBR.*

Las sondas de etiquetado de microARN modificadas con LNA específicas de secuencia se aparearon y se ligaron. Los moldes ligados se detectaron fácilmente usando PCR a tiempo real, los cebadores de PCR de anclaje y detección con verde SYBR (Fig. 8), mientras que no se detectaron señales a partir de los controles menos molde o menos ligasa.

10 Ejemplo 8a

Preparación de inactivador de 1-(3-(2-cianoetoxi(diisopropilamino)fosfinoxi)propilamino)-4-(3-(4,4-dimetoxi-tritiloxi)propilamino)-antraquinona (3) "Q1"



1,4-bis(3-hidroxiopropilamino)-antraquinona (1)

15 Se mezcla leucoquinizarina (9,9 g; 0,04 mol) con 3-amino-1-propanol (10 ml) y etanol (200 ml) y se calienta a reflujo durante 6 horas. La mezcla se enfría a temperatura ambiente y se agita durante una noche en condiciones atmosféricas. La mezcla se vierte en agua (500 ml) y el precipitado se retira por filtración lavando con agua (200 ml) y se seca. El sólido se lleva a ebullición en acetato de etilo (300 ml), se enfría a temperatura ambiente y el sólido se recoge por filtración. Rendimiento: 8,2 g (56%).

20 1-(3-(4,4'-dimetoxi-tritiloxi)propilamino)-4-(3-hidroxiopropilamino)-antraquinona (2)

Se disuelve 1,4-bis(3-hidroxiopropilamino)-antraquinona (7,08 g; 0,02 mol) en una mezcla de N,N-dimetil-formamida seca (150 ml) y piridina seca (50 ml). Se añade dimetoxitritilcloruro (3,4 g; 0,01 mol) y la mezcla se agita durante 2 horas. Se añade dimetoxitritilcloruro adicional (3,4 g; 0,01 mol) y la mezcla se agita durante 3 horas. La mezcla se concentra al vacío y el residuo se vuelve a disolver en diclorometano (400 ml), se lava con agua (2 x 200 ml) y se seca (Na₂SO₄). La solución se filtra a través de una almohadilla de gel de sílice (ø 10 cm; h 10 cm) y se eluye con diclorometano hasta que el producto de mono-DMT-antraquinona comienza a eluir, después de lo cual el disolvente se cambia a metanol al 2% en diclorometano. Las fracciones puras se combinan y se concentran dando como resultado una espuma azul. Rendimiento: 7,1 g (54%)

25 ¹H-RMN (CDCl₃): 10,8 (2H, 2xt, J = 5,3 Hz, NH), 8,31 (2H, m, AqH), 7,67 (2H, dt, J = 3,8 y 9,4, AqH), 7,4-7,1 (9H, m, ArH + AqH), 6,76 (4H, m, ArH) 3,86 (2H, q, J = 5,5 Hz, CH₂OH), 3,71 (6H, s, CH₃), 3,54 (4H, m, NCH₂), 3,26 (2H, t, J = 5,7 Hz, CH₂ODMT), 2,05 (4H, m, CCH₂C), 1,74 (1H, t, J = 5 Hz, OH).

30 1-(3-(2-cianoetoxi(diisopropilamino)fosfinoxi)propilamino)-4-(3-(4,4'-dimetoxi-tritiloxi)propilamino)-antraquinona (3)

Se disuelve 1-(3-(4,4'-dimetoxi-tritiloxi)propilamino)-4-(3-hidroxiopropilamino)-antraquinona (0,66 g; 1,0 mmol) en diclorometano seco (100 ml) y se añade a tamices moleculares 3A. La mezcla se agita durante 3 horas y después se

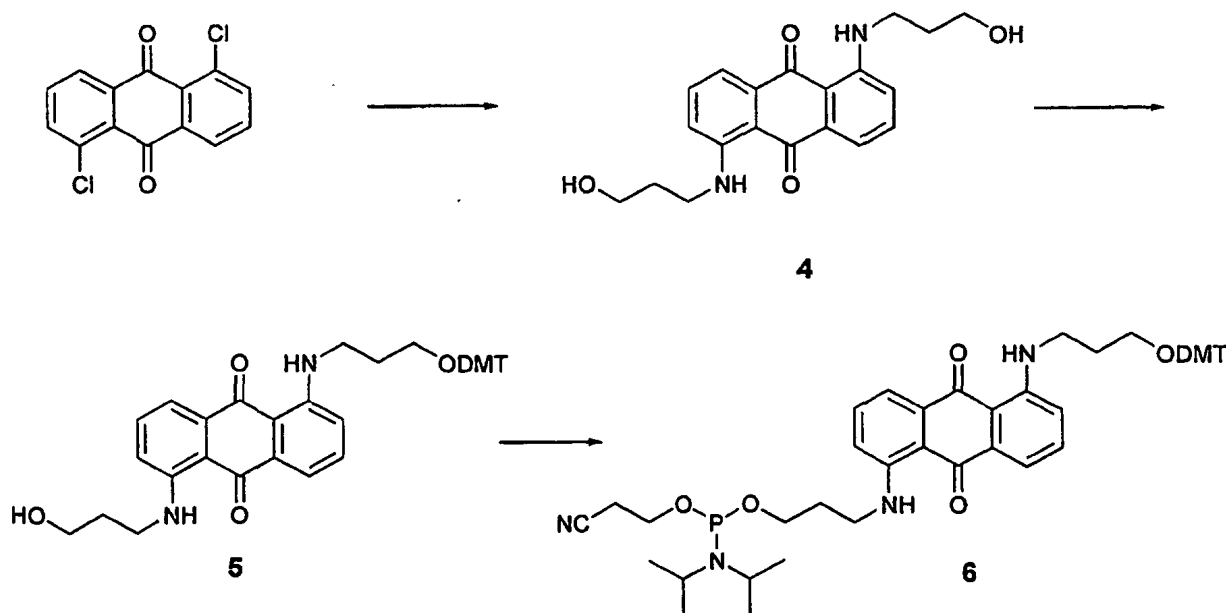
añade 2-cianoetil-N,N,N',N'-tetraisopropilfosforodiamidita (335 mg; 1,1 mmol) y 4,5-dicianoimidazol (105 mg; 0,9 mmol). La mezcla se agita durante 5 horas y después se añade NaHCO₃ sat. (50 ml) y se agita durante 10 minutos. Las fases se separan y la fase orgánica se lava con NaHCO₃ sat. (50 ml), salmuera (50 ml) y se seca (Na₂SO₄). Después de la concentración la fosforamidita se obtiene como una espuma azul y se usa en la síntesis de oligonucleótidos sin una purificación adicional. Rendimiento: 705 mg (82 %)

³¹P-RMN (CDCl₃): 150,0

¹H-RMN(CDCl₃): 10,8 (2H, 2xt, J = 5,3 Hz, NH), 8,32 (2H, m, AqH), 7,67 (2H, m, AqH), 7,5-7,1 (9H, m, ArH + AqH), 6,77 (4H, m, ArH) 3,9-3,75 (4H, m), 3,71 (6H, s, OCH₃), 3,64-3,52 (3,54 (6H, m), 3,26 (2H, t, J = 5,8 Hz, CH₂ODMT), 2,63 (2H, t, J = 6,4 Hz, CH₂CN) 2,05 (4H, m, CCH₂C), 1,18 (12H, dd, J = 3,1 Hz, CCH₃).

10 Ejemplo 8b

Preparación de inactivador de 1-(3-(cianoetoxi(diisopropilamino)fosfinoxi)propilamino)-5-(3-(4,4'-dimetoxi-tritiloxi)propilamino)-antraquinona (6) "Q2"



1,5-bis(3-hidroxipropilamino)-antraquinona (4)

15 Se mezcla 1,5-dicloroantraquinona (2,8 g; 10 mmol) con 3-amino-1-propanol (10 ml) en DMSO (50 ml) y se calienta a 130°C durante 4 horas. La mezcla se enfría a ~80° y se añade agua (150 ml). Cuando la mezcla ha alcanzado la temperatura ambiente, el precipitado formado se aísla por filtración, se lava con agua (2 x 50 ml), se lleva a ebullición en tolueno (200 ml) y el producto no disuelto se aísla por filtración y se seca. Rendimiento: 3,2 g (90%).

1-(3-hidroxipropilamino)-5-(3-(4,4'-dimetoxi-tritiloxi)propilamino)-antraquinona (5)

20 La 1,5-bis(3-hidroxipropilamino)-antraquinona (1,4 g; 4 mmol) se coevapora con piridina (50 ml) y después se resuspende en piridina (50 ml), se añade dimetoxitritilcloruro (1,4 g; 4,1 mmol) y se agita durante una noche. La mezcla se concentra y el residuo se vuelve a disolver en diclorometano (150 ml), se lava con NaHCO₃ sat. (2 x 50 ml), salmuera (50 ml), se seca (Na₂SO₄) y se concentra. Se purifica en una columna de gel de sílice (MeOH/diclorometano 2/98). Después de la concentración de las fracciones apropiadas, el compuesto de mono-DMT se obtiene como una espuma roja. Rendimiento: 0,9g (34%). ¹H-RMN (CDCl₃): 9,7 (2H, 2xt, NH), 7,6-6,7 (19H, m, ArH), 3,86 (2H, q, J = 5,5 Hz, CH₂), 3,74 (6H, s, CH₃), 3,48 (4H, m, NCH₂), 3,26 (2H, t, J = 5,9 Hz), 2,05 (4H, m, CH₂), 1,45 (1H, t, J = 5 Hz).

1-(3-(cianoetoxi(diisopropilamino)fosfinoxi)propilamino)-5-(3-(4,4'-dimetoxi-tritiloxi)propilamino)-antraquinona (6)

30 Se disuelve 1-(3-hidroxipropilamino)-5-(3-(4,4'-dimetoxi-tritiloxi)propilamino)-antraquinona (0,4 g; 0,61 mmol) en diclorometano seco (50 ml) y se añade a tamices moleculares 3A. La mezcla se agita durante 3 horas y después se añade 2-cianoetil-N,N,N',N'-tetraisopropilfosforodiamidita (200 mg; 0,66 mmol) y 4,5-dicianoimidazol (71 mg; 0,6 mmol). La mezcla se agita durante 2 horas y después se añade NaHCO₃ sat. (50 ml) y se agita durante 10 minutos. Las fases se separan y la fase orgánica se lava con NaHCO₃ sat. (50 ml), salmuera (50 ml) y se seca (Na₂SO₄). Después de la concentración, la fosforamidita se obtiene como una espuma roja y se usa en la síntesis de oligonucleótidos sin una purificación adicional. Rendimiento: 490 mg (93 %). ³¹P-RMN (CDCl₃): 148,3.

Materiales y procedimientos usados en los ejemplos 9 a 11.**1. Reacción de ligación con molde de microARN usando trehalosa**

La reacción de ligación se realizó en 20 µl que consistían en molde de ARN de miR-15a 50 nM (EQ15885, Tabla I), 500 nM de cada una de las sondas de etiquetado de microARN, Tris-HCl 10 mM pH 7,0 (Ambion, Estados Unidos), MgCl₂ 10 mM (Ambion, Estados Unidos), tampón de ADN ligasa de T4 0,05X [Tris-HCl 2,5 mM, MgCl₂ 0,5 mM, DTT 0,5 mM, ATP 50 µM, BSA 1,25 µg/ml, pH 7,5 a 25°C; (NEB, Estados Unidos)], trehalosa 24 g/100 ml (Sigma-Aldrich, Estados Unidos), ARN de levadura *Torulla* 0,05 µg/µl (Ambion, Estados Unidos). Las reacciones se preincubaron durante 15 min a 42°C y se añadieron 800 U de ADN ligasa de T4 (NEB, Estados Unidos) y se incubaron durante 1 hora a 42°C en un termociclador DYAD™ (MJ Research DNA engine, Estados Unidos). Por último, las reacciones se inactivaron por calor durante 20 min a 95°C. La reacción de ligación se repitió sin molde en lugar de la diana de ARN miR-15a.

2. Ensayos de PCR a tiempo real de microARN usando sonda de detección modificada con LNA

La reacción (50 µl) era tampón de PCR 1X [contiene Tris-HCl, KCl, (NH₄)₂SO₄, MgCl₂ 1,5 mM; pH 8,7 (20°C)] (Qiagen, Alemania), MgCl₂ a una concentración final de 4 mM, 200 nM de cada de dATP, dCTP, dGTP y 600 nM de dUTP (Applied Biosystems, Estados Unidos); cebador directo de hsa-miR-15a 2 200 nM (EQ16444, Tabla II), cebador inverso de hsa-miR-15a 2 200 nM (EQ16445, Tabla II), sonda de detección de miR-15a específica de secuencia de LNA 250 nM (EQ15866, Tabla I), Colorante de Referencia ROX 0,1X (Invitrogen, Estados Unidos), 5 µl de reacción de ligación (como se ha descrito anteriormente) y 2,5 U de ADN polimerasa HotStarTaq (Qiagen, Alemania). Procedimiento de ciclado: 10 min 95°C, 50 ciclos de 20 s 95°C, 1 min 60°C en un Sistema de PCR a Tiempo Real Applied Biosystems 7500.

Tabla II. El diseño de diferentes sondas de etiquetado de microARN, sondas de detección y cebadores de PCR a tiempo real usados en los ejemplos 9 a 16.

Id. Oligo (EQ N°)	Nombre de oligonucleótido	Extremo 5'	Secuencia (5'-3') ^a	Extremo 3'
16444	Cebador directo de hsa-miR-15a 2		gtaaaacgacggccagttag	
16445	Cebador inverso de hsa-miR-15a 2		ccgaaacagctatgacatgc	
16307	ADN de sonda de hsa-miR-15a micROLA 1.1	P	atgtgctgctaactggccgtcgtttac	
16311	ADN de sonda de hsa-miR-15a micROLA 2.1		qaaacaqctatqacatqcacaaaccatt	
16314	Sonda de hsa-miR-15a micROLA 2.4		gaaacagctatgacatgmCamCaaAccAt t	
16447	Sonda de hsa-miR-15a micROLA 3.4		gaaacagctatgacatgCacAaaCcatt	
16452	Sonda de hsa-miR-15a micROLA 3.9	P	aTgtgmCtgcTaactggccqtcgtttac	
16453	Sonda de hsa-miR-15a micROLA 3.10		gaaacagctatgacatgcAcaaAccaTt	
16580	axkOL140	6-Fitc	aGmCAmCATAAT#Q1z	P
16581	axkOL142	6-Fitc	aGmCAmCXTAAT#Q1z	P
16582	axkOL143	6-Fitc	aGmCXmCXTAAT#Q1z	P
16583	axkOL144	6-Fitc	aGmCXmCXTXAT#Q1z	P
16589	ADN de hsa-miR-15a FP 3 LNA_3 2		gtaaaacgacggccagttaGcaGcamCat	
16591	ADN de hsa-miR-15a FP 3		gtaaaacgacggccagtttagcagcacat	

(continuación)

Id. Oligo (EQ N°)	Nombre de oligonucleótido	Extremo 5'	Secuencia (5'-3')a	Extremo 3'
16618	ADN de hsa-miR-15a RT 4.1		gaaacagctatgacatgcacaaacc	
16620	LNA de hsa-miR-15a RT 4.3		gaaacagctatgacatgmCacAaamCc	
16623	ADN de hsa-miR-15a FP 4.6		gtaaaacgacggccagttagcagcaca	
16624	LNA de hsa-miR-15a FP 4.7		gtaaaacgacggccagtTagmCagmCaca	
16679	axkOL150	6-Fitc	aGmCXmCXZAX#Q1z	P
^a LNA (mayúsculas), ADN (minúsculas), 5-metil C (mC); Fluoresceína (6-FITC (Glenn Research, N° Id. Prod. 10-1964)), #Q1 (Preparado como se describe en el Ejemplo 8a), z (5-nitroindol (Glenn Research, N° Id. Prod. 10-1044)), Fosfato (P), X denota LNA-2,6-diaminopurina y Z denota LNA-2-tiotimidina.				

Ejemplo 9

PCR cuantitativa a tiempo real para el microARN miR-15a humano usando ligación con molde de microARN con tres conjuntos diferentes de parejas de sondas de etiquetado de miR-15a

- 5 Las sondas de etiquetado de microARN modificadas con LNA específicas de secuencia se aparearon y se ligaron. Se seleccionaron tres parejas diferentes de sondas de etiquetado de microARN miR-15a humano (Tabla II): Pareja I. EQ16311/EQ16452, II. EQ16453/EQ16307 y III. EQ16447/EQ16307) y las reacciones de ligación se realizaron como se ha descrito anteriormente. Los moldes ligados se detectaron posteriormente usando PCR a tiempo real como se ha descrito anteriormente, mediante los cebadores de PCR de anclaje y una sonda de detección doblemente
- 10 marcada modificada con LNA para el microARN miR-15a usando un menos molde como control negativo. La especificidad de la reacción de ligación se ensayó usando una reacción sin adición de la ADN ligasa de T4. Los ciclos umbral (Ct), que representan los ciclos de PCR en los que puede detectarse por primera vez un aumento en la fluorescencia de indicador por encima de una señal basal, para el molde de microARN miR-15a eran de 17,2, 30,5 y 28,7 para las parejas de sondas de etiquetado de microARN I, II y III, respectivamente (Fig. 13). Mientras que no eran detectables valores de Ct para los experimentos de control negativo realizados con las parejas II y III (menos molde y menos ligasa, respectivamente), los valores de Ct a partir de los controles negativos realizados con la pareja I eran detectables después del ciclo n° 37 y 39, respectivamente, lo cual es todavía aceptable cuando se compara con el valor de Ct correspondiente de 17,2 (Fig. 13). La señal de indicador normalizada (Rn) se midió a lo largo de todo el programa de ciclado de PCR, que representa la señal de fluorescencia del colorante indicador dividida por la señal de fluorescencia del colorante de referencia pasivo. Durante la PCR, la Rn aumenta a medida que aumenta el número de copias de amplicón, hasta que la reacción se aproxima a una meseta. La Rn corregida por la medida basal (ΔRn) representa la Rn menos la señal basal que se estableció en los primeros cuantos ciclos de PCR.

Ejemplo 10

- 25 *PCR cuantitativa a tiempo real mejorada para el microARN miR-15a humano usando ligación con molde de microARN y sondas de detección mejoradas con LNA 2,6-diaminopurina*

- Las reacciones de PCR a tiempo real se repitieron usando las sondas de etiquetado de microARN específicas de secuencia modificadas con LNA EQ16311/EQ16452 (pareja I en el Ejemplo 9) en la reacción de ligación con molde de miR-15a humano que se ha descrito anteriormente. Los moldes ligados se detectaron posteriormente usando
- 30 PCR cuantitativa a tiempo real como se ha descrito anteriormente, mediante cebadores de PCR de anclaje y sondas de detección doblemente marcadas modificadas con LNA (EQ16580, EQ16581, EQ16582 o EQ16583, Tabla II) para el microARN miR-15^a, usando un menos molde como control negativo. La especificidad de la reacción de ligación se ensayó usando una reacción sin adición de ADN ligasa de T4. Los valores de Ct usando el molde de microARN miR-15a humano adicionado a un fondo complejo de ARN de levadura *Torulla* eran muy comparables, es decir, de 30,4, 30,0, 29,9 y 30,6 para sondas de detección doblemente marcadas modificadas con LNA EQ16580, EQ16581, EQ16582 y EQ16583, respectivamente (Fig. 14, Tabla II). Por el contrario, no eran detectables valores de Ct para los experimentos de control negativo (menos molde y menos ligasa, Fig. 14). Por sustitución de uno a dos de los nucleótidos de LNA A con los monómeros de LNA 2,6-diaminopurina se aumentaba significativamente la señal de fluorescencia corregida por la medida basal, ΔRn , detectada en el ensayo de microARN, mientras que la sustitución con un tercer monómero de LNA 2,6-diaminopurina (EQ 16583, Tabla II) no aumentaba adicionalmente la señal de fluorescencia, mostrando resultados comparables a los de la sonda de detección de miR-15a sustituida con LNA 2,6-diaminopurina (EQ 16582, Tabla II, Fig. 14).
- 40

Ejemplo 11

Curva patrón de PCR cuantitativa a tiempo real generada para el microARN miR-15a humano usando la reacción de ligación con molde de microARN como molde.

La pareja de sondas de etiquetado de microARN miR-15a humano modificadas con LNA EQ16311/EQ16452 (pareja I en el Ejemplo 9) se usó en reacciones de ligación con molde de miR-15a como se han descrito anteriormente, donde la concentración de molde de miR-15a humano era de 50, 5, 0,5, 0,05 ó 0,005 nM, respectivamente. Los moldes ligados se detectaron posteriormente usando PCR cuantitativa a tiempo real como se ha descrito anteriormente, mediante los cebadores de PCR de anclaje y la sonda de detección doblemente marcada modificada con LNA (EQ15866, Tabla I) para el microARN miR-15a usando un menos molde como control negativo. La especificidad de la reacción de ligación se ensayó usando una reacción sin ligasa. El valor de Ct usando el molde de microARN miR-15a era de 17,6, 22,0, 25,9, 29,6 y 35,6 para las concentraciones de 50, 5, 0,5, 0,05 y 0,005 nM del microARN miR-15a, respectivamente, mientras que no eran detectables valores de Ct para los experimentos de control negativo (menos molde y menos ligasa). El valor de Ct es inversamente proporcional al logaritmo del número de copias de molde inicial. Por lo tanto, se genera una curva patrón por representación de los valores de Ct frente al logaritmo del número de copias, como se representa en la Fig. 15. Por análisis de regresión lineal se determinó la pendiente y el punto de corte. La pendiente de la curva de valoración era de -4,31 y el punto de corte de 30,9.

Ejemplo 12

PCR cuantitativa a tiempo real para microARN miR-15a humano usando reacciones de RT-PCR con molde de microARN con sondas de etiquetado modificadas con LNA y una sonda de detección doblemente marcada modificada con LNA.

1. Transcripción inversa de microARN y reacción de segunda cadena con sondas de etiquetado modificados con LNA

La reacción transcripción inversa y PCR (RT-PCR) se realizó en 50 µl que consistían en molde de ARN miR-15a 2 nM (EQ15885, Tabla I), 600 nM de cada sonda de etiquetado de microARN, tampón de RT-PCR OneStep 1x [contiene Tris-HCl, KCl, (NH₄)₂SO₄, MgCl₂ 1,5 mM, DTT, pH 8,7 (20°C)] (Qiagen, Alemania), 400 µM de cada dNTP (Qiagen, Alemania), 20 U de SUPERase-In (Ambion, Estados Unidos), ARN de levadura *Torulla* 0,05 µg/µl y 2 µl de mezcla enzimática de RT-PCR OneStep de Qiagen (Qiagen, Alemania). El termociclador DYAD™ (MJ Research DNA engine, Estados Unidos) se precalentó a la temperatura de inicio. El perfil de temperatura era de 30 min 50°C, 15 min 95°C, 1 min 50°C, 3 min 72°C, y por último enfriamiento hasta 4°C. La reacción de RT-PCR se repitió sin molde como control negativo.

2. Ensayos de PCR cuantitativa a tiempo real de microARN usando sondas de detección modificadas con LNA

La reacción de PCR (50 µl) en tampón de PCR 1x [contiene Tris-HCl, KCl, (NH₄)₂SO₄, pH 8,7 (20°C)] (Qiagen, Alemania), MgCl₂ a una concentración final de 4 mM, 200 nM de cada de dATP, dCTP, dGTP y 600 nM de dUTP (Applied Biosystems, Estados Unidos); cebador directo de hsa-miR-15a 2 200 nM (EQ16444, Tabla II), cebador inverso de hsa-miR-15a 2 200 nM (EQ16445, Tabla II), sonda de detección de específica de secuencia de LNA 250 nM (EQ15866, Tabla I), colorante de referencia ROX 0,1x (Invitrogen, Estados Unidos), 5 µl de reacción de RT-PCR como molde (descrita anteriormente) y 2,5 U de ADN polimerasa HotStarTaq (Qiagen, Alemania). Procedimiento de ciclado: 10 min 95°C, 50 ciclos de 20 s 95°C, 1 min 60°C en un Sistema de PCR a Tiempo Real Applied Biosystems 7500 (Applied Biosystems, Estados Unidos).

Las sondas de etiquetado de microARN modificadas con LNA para miR-15a humano se aparearon y se extendieron como un cebador de transcripción inversa (sonda de etiquetado de RT) y una sonda de etiquetado de 2ª cadena. Se seleccionaron tres parejas diferentes de sondas de etiquetado de microARN (Tabla II): Pareja IV. EQ16591/EQ16311, V. EQ16591/EQ16314 y VI. EQ16589/EQ16314. Las reacciones de RT-PCR de miR-15a se realizaron como se ha descrito anteriormente. Los moldes se detectaron posteriormente usando PCR a tiempo real como se ha descrito anteriormente, usando cebadores de PCR de anclaje y una sonda de detección doblemente marcada modificada con LNA (EQ15866, Tabla I) para el microARN miR-15a con un menos molde como control negativo. La especificidad del ensayo de RT-PCR de microARN se evaluó usando una reacción sin adición de mezcla enzimática de RT-PCR OneStep. El valor de Ct, que representa el ciclo de PCR en el que se puede detectar por primera vez un aumento en la fluorescencia de indicador por encima de una señal basal, para las sondas de microARN usando el molde de microARN miR-15a era de 19,2, 28,2 y 22,0 para las parejas IV, V y VI, respectivamente (Fig. 16). Mientras que no eran detectables valores de Ct para los experimentos de control negativo realizados con las parejas V y VI (menos molde y menos ligasa, respectivamente), los valores de Ct correspondientes de los controles negativos con la pareja V eran de 39,0 y 39,9 para la mezcla sin molde y sin enzima de RT-PCR, respectivamente, que son todavía valores aceptables. La señal de ARN se midió a lo largo de todo el programa de PCR a tiempo real, que representa la señal de fluorescencia del colorante indicador dividida por la señal de fluorescencia del colorante de referencia pasivo. Durante la PCR, la Rn aumentaba a medida que aumentaba el número de copias de amplicón, hasta que la reacción se aproxima a una meseta. La ΔRn representa la Rn menos la señal basal que se estableció en los primeros cuantos ciclos de PCR.

Ejemplo 13

PCR cuantitativa a tiempo real mejorada para el microARN miR-15a humano usando reacciones de RT-PCR con molde de microARN con sondas de etiquetado modificados con LNA y sondas de detección mejoradas con LNA 2,6-diaminopurina

5 1. Transcripción inversa de microARN y reacción de segunda cadena con sondas de etiquetado modificadas con LNA

La reacción de RT-PCR se realizó en 25 µl que consistían en molde de ARN miR-15a 2 nM (EQ15885, Tabla I), 60 nM de cada sonda de etiquetado de microARN, tampón de RT-PCR OneStep 1x [contiene Tris-HCl, KCl, (NH₄)₂SO₄, MgCl₂ 1,5 mM, DTT, pH 8,7 (20°C)] (Qiagen, Alemania), 400 µM de cada dNTP (Qiagen, Alemania), 10 U de SUPERase-In (Ambion, Estados Unidos), ARN de levadura *Torulla* 0,05 µg/µl y 1 µl de mezcla enzimática de RT-PCR OneStep de Qiagen (Qiagen, Alemania). El termociclador DYAD™ (MJ Research DNA engine, Estados Unidos) se calentó a la temperatura de inicio de la reacción. El perfil de temperatura era de 30 min 50°C, 15 min 95°C, 1 min 50°C, 3 min 72°C, y finalmente se enfrió hasta 4°C. La reacción de RT-PCR se repitió sin molde como control negativo en lugar de la diana de ARN miR-15a.

15 2. Ensayos de PCR cuantitativa a tiempo real de microARN usando sondas de detección modificadas con LNA

La reacción (25 µl) era de tampón de PCR 1x [contiene Tris-HCl, KCl, (NH₄)₂SO₄, pH 8,7 (20°C)] (Qiagen, Alemania), MgCl₂ a una concentración final de 4 mM, 200 nM de cada de dATP, dCTP, dGTP y 600 nM de dUTP (Applied Biosystems, Estados Unidos); cebador directo de hsa-miR-15a 2 200 nM (EQ16444, Tabla II), cebador inverso de hsa-miR-15a 2 200 nM (EQ16445, Tabla II), sonda de detección de LNA 250 nM (EQ15866, Tabla I), colorante de referencia ROX 0,1 x (Invitrogen, Estados Unidos), 5 µl de la reacción de RT-PCR (descrita anteriormente) y 1,25 U de ADN polimerasa HotStarTaq (Qiagen, Alemania). Procedimiento de ciclado: 10 min 95°C, 50 ciclos de 20 s 95°C, 1 min 60°C en un Sistema de PCR a Tiempo Real Applied Biosystems 7500 (Applied Biosystems, Estados Unidos).

Las sondas de etiquetado de microARN modificadas con LNA EQ16591/EQ16314 (pareja V en el Ejemplo 12) para microARN miR-15a humano se aparearon y se extendieron como un cebador de transcripción inversa (sonda de etiquetado de RT) y sonda de etiquetado de 2ª cadena, como se ha descrito anteriormente. Las reacciones de RT-PCR de miR-15 se detectaron posteriormente usando PCR a tiempo real como se ha descrito anteriormente, los cebadores de PCR de anclaje y las sondas de detección doblemente marcadas modificadas con LNA (EQ16580, EQ16581 y EQ16582, Tabla II) para el microARN miR-15a usando un menos molde como control negativo. Los valores de Ct usando el molde de microARN miR-15a eran de 33,0, 33,2, y 33,7 para sondas de detección doblemente marcadas modificadas con LNA EQ16580, EQ16581, y EQ16582, respectivamente (Fig. 17), mientras que no eran detectables valores de Ct para los experimentos de control negativo (menos molde y menos mezcla enzimática de RT-PCR OneStep). Por sustitución de uno a dos de los nucleótidos de LNA A con los monómeros de LNA 2,6-diaminopurina se aumentaba significativamente la señal de fluorescencia corregida por la medida basal, ΔRn, detectada en el ensayo de microARN (Fig. 17).

35 **Ejemplo 14**

Curva patrón de PCR cuantitativa a tiempo real generada para el microARN miR-15a humano usando reacciones de RT-PCR con molde de microARN como molde.

Las sondas de etiquetado de microARN modificadas con LNA EQ16624/EQ16620 (pareja VII) para microARN miR-15a humano se aparearon y se extendieron como un cebador de transcripción inversa (sonda de etiquetado de RT) y sonda de etiquetado de 2ª cadena. Las reacciones de RT-PCR se realizaron como se ha descrito anteriormente, donde la concentración de molde de microARN miR-15a humano era de 50, 5, 0,5, 0,05 ó 0,005 nM, respectivamente. Las reacciones de RT-PCR de miR-15a se detectaron posteriormente usando PCR cuantitativa a tiempo real como se ha descrito anteriormente, usando los cebadores de PCR de anclaje y sondas de detección doblemente marcadas modificadas con LNA (EQ16582) para el microARN miR-15a usando un menos molde como control negativo. La especificidad de la reacción de RT-PCR de microARN se evaluó usando una reacción sin adición de la mezcla enzimática de RT-PCR OneStep. Los valores de Ct usando el molde de microARN miR-15a eran de 22,2, 26,5, 30,6, 33,6 y 37,8 para las concentraciones de 50, 5, 0,5, 0,05 y 0,005 nM del microARN miR-15a, respectivamente, mientras que no eran detectables valores de Ct para los experimentos de control negativo (menos molde y menos mezcla enzimática de RT-PCR OneStep). El valor de Ct es inversamente proporcional al logaritmo del número de copias de molde inicial. Por lo tanto, se genera una curva patrón por representación de los valores de Ct frente al logaritmo del número de copias, como se representa en la Fig. 18. Por análisis de regresión lineal se determina la pendiente y el punto de corte. La pendiente de la curva de valoración era de -3,81 y el punto de corte de 34,0.

Ejemplo 15

55 *PCR cuantitativa a tiempo real para el microARN miR-15a humano usando reacciones de RT-PCR con molde de microARN como molde y temperaturas de apareamiento elevadas.*

Las sondas de etiquetado de microARN modificadas con LNA EQ16624/EQ16620 (pareja VII) para microARN miR-15a humano se aparearon y se extendieron como un cebador de transcripción inversa (sonda de etiquetado de RT) y sonda de etiquetado de 2ª cadena. El perfil de temperatura de apareamiento se cambió de 50°C a 55°C o 60°C para tanto el cebador de transcripción inversa como la sonda de etiquetado de 2ª cadena. Las reacciones de RT-PCR se realizaron como se han descrito anteriormente. Las reacciones de RT-PCR de miR-15a se detectaron posteriormente usando PCR cuantitativa a tiempo real como se ha descrito anteriormente, usando los cebadores de PCR de anclaje y una sonda de detección doblemente marcada modificada con LNA (EQ16582) para el microARN miR-15a usando un menos molde como control negativo. La especificidad de la reacción de RT-PCR de microARN se evaluó usando una reacción sin adición de la mezcla enzimática de RT-PCR OneStep. Los valores de Ct usando el molde de microARN miR-15a eran de 28,6, 29,3 y 31,0 para la temperatura de apareamiento de 50, 55 y 60°C, respectivamente (Fig. 19), mientras que no eran detectables valores de Ct para los experimentos de control negativo (menos molde y menos mezcla enzimática de RT-PCR OneStep).

Ejemplo 16

PCR cuantitativa a tiempo real mejorada para el microARN miR-15a humano usando reacciones de RT-PCR con molde de microARN con sondas de etiquetado modificadas con LNA y sondas de detección mejoradas con LNA 2,6-diaminopurina/LNA 2-tiotimidina.

1. Transcripción inversa de microARN y reacción de segunda cadena con sondas de etiquetado modificados con LNA

La reacción de RT-PCR se realizó en 50 µl que consistían en molde de ARN miR-15a 2 nM (EQ15885, Tabla I), 60 nM de cada sonda de etiquetado de microARN, tampón de RT-PCR OneStep 1x [contiene Tris-HCl, KCl, (NH₄)₂SO₄, MgCl₂ 1,5 mM, DTT, pH 8,7 (20°C)] (Qiagen, Alemania), 400 µM de cada dNTP (Qiagen, Alemania), 20 U de SUPERase-In (Ambion, Estados Unidos), ARN de levadura *Torulla* 0,05 µg/µl (Ambion, Estados Unidos) y 2 µl de mezcla enzimática de RT-PCR OneStep de Qiagen (Qiagen, Alemania). El termociclador DYAD™ (MJ Research DNA engine, Estados Unidos) se calentó a la temperatura de inicio de la reacción. El perfil de temperatura era de 30 min 50°C, 15 min 95°C, 1 min 50°C, 3 min 72°C y por último enfriamiento hasta 4°C. La reacción de RT-PCR se repitió sin molde como control negativo en lugar de la diana de ARN miR-15a.

2. Ensayos de PCR cuantitativa a tiempo real de microARN usando sondas de detección modificadas con LNA

La reacción (25 µl) era de tampón de PCR 1x [contiene Tris-HCl, KCl, (NH₄)₂SO₄, pH 8,7 (20°C)] (Qiagen, Alemania), MgCl₂ a una concentración final de 4 mM, 200 nM de cada de dATP, dCTP, dGTP y 600 nM de dUTP (Applied Biosystems, Estados Unidos); cebador directo de hsa-miR-15a 2 200 nM (EQ16444, Tabla II), cebador inverso de hsa-miR-15a 2 200 nM (EQ16445, Tabla II), sonda de detección de LNA 250 nM (EQ15866, Tabla I), colorante de referencia ROX 0,1x (Invitrogen, Estados Unidos), 5 µl de la reacción de RT-PCR (descrita anteriormente) y 1,25 U de ADN polimerasa HotStarTaq (Qiagen, Alemania). Procedimiento de ciclado: 10 min 95°C, 50 ciclos de 20 s 95°C, 1 min 60°C en un Sistema de PCR a Tiempo Real Applied Biosystems 7500 (Applied Biosystems, Estados Unidos).

Las sondas de etiquetado de microARN EQ16623/EQ16618 (pareja VIII) para microARN miR-15a humano se aparearon y se extendieron como cebador de transcripción inversa (sonda de etiquetado de RT) y sonda de etiquetado de 2ª cadena, como se han descrito anteriormente. Las reacciones de RT-PCR miR-15 se detectaron posteriormente usando PCR a tiempo real como se ha descrito anteriormente, los cebadores de PCR de anclaje y sondas de detección doblemente marcadas modificadas con LNA (EQ16852 y EQ16679, Tabla II) para el microARN miR-15a usando un microARN miR-16 de control desordenado (EQ15886, Tabla I) y un menos molde como controles negativos. Los valores de Ct usando el molde de microARN miR-15a eran de 25,6 y 30,1 para las sondas de detección doblemente marcadas modificadas con LNA EQ16582 y EQ16679, respectivamente (Fig. 19). Los valores de Ct para el control de microARN miR-16 desordenado eran de 33,3 e indetectables para las sondas de detección doblemente marcadas modificadas con LNA EQ16582 y EQ16679, respectivamente, mientras que no eran detectables valores de Ct para los experimentos de control negativo (menos molde y menos mezcla enzimática de RT-PCR OneStep). Por sustitución de los nucleótidos de LNA A y LNA T con los monómeros de LNA 2,6-diaminopurina y LNA 2-tiotimidina se aumentaba significativamente la discriminación entre los moldes de microARN perfectamente emparejados y los desordenados detectados en el ensayo de microARN (Fig. 20).

Tabla III. El diseño de la sonda de etiqueta de microARN bloqueada usada en el Ejemplo 17

Id Oligo (EQ N°)	Nombre de oligonucleótido	Extremo3'	Secuencia (5'-3') ^a
16695	hsa-miR-15aRT 4.3 LNA	P	gaaacagctatgacatgmCacAaamCc
^a LNA (mayúsculas), ADN (minúsculas), 5-metil C (mC); y Fosfato (P).			

Ejemplo 17

PCR cuantitativa a tiempo real para el microARN miR-15a humano usando reacciones de RT-PCR con molde de

microARN con una sonda de etiquetado modificada con LNA bloqueada en 3' y una sonda de detección modificada con LNA.

1. Reacción de transcripción de 1ª cadena de microARN con una sonda de etiquetado modificada con LNA bloqueada.

- 5 La reacción de transcripción inversa (RT) se realizó en 20 µl que consistían en molde de ARN miR-15a 25 nM (EQ15885, Tabla I), sonda de etiquetado bloqueada de microARN 50 nM (EQ16695), cebador inverso de hsa-miR-15a 2 200 nM (EQ16445, Tabla 1), tampón de primera cadena 1x (Tris-HCl 50 mM, KCl 75 mM, MgCl₂ 3 mM, pH 8,3 20°C) (Invitrogen, Estados Unidos), DTT 5 mM (Invitrogen, Estados Unidos), 500 µM de cada dNTP (Applied Biosystems, Estados Unidos), 10 U de SUPERase-In (Ambion, Estados Unidos), ARN de levadura *Torulla* 0,05 µg/µl y 1 U de transcriptasa inversa Superscript III (Invitrogen, Estados Unidos). El molde de miR-15a, la sonda de etiquetado bloqueada de microARN y el cebador inverso se mezclaron y se calentaron 10 min a 70°C y se inactivaron en hielo. El termociclador DYAD™ (MJ Research DNA engine, Estados Unidos) se calentó a la temperatura de inicio de la reacción. El perfil de temperatura era de 60 min 55°C, 15 min 70°C y finalmente se enfrió hasta 4°C. La síntesis de primera cadena se repitió sin molde o Superscript III como control negativo en lugar de la diana de ARN miR-15a. La reacción de primera cadena también se repitió usando ARN miR-16 (EQ15886) como diana en lugar de la diana de ARN miR-15a.

2. Amplificación de PCR con liberación temporal de segunda cadena de microARN con una sonda de etiquetado modificada con LNA.

- 20 La reacción (50 µl) era de tampón AmpliTaq Gold 1x (Applied Biosystems, Estados Unidos), MgCl₂ 1,5 mM, sonda de etiquetado de LNA de segunda cadena 200 nM (EQ16624, Tabla II, 20 µl de la reacción de RT (descrita anteriormente) y 1,25 U de ADN Polimerasa AmpliTaq Gold® (Applied Biosystems, Estados Unidos). Procedimiento de ciclado: 10 ciclos de 1 min 95°C y 1 min 55°C en un termociclador DYAD™ (MJ Research DNA engine, Estados Unidos).

3. Ensayos de PCR cuantitativa a tiempo real de microARN usando una sonda de detección modificada con LNA.

- 25 La reacción (25 µl) era de tampón de PCR 1X (contiene Tris-HCl, KCl, (NH₄)₂SO₄, pH 8,7 (20°C)] (Qiagen, Alemania), MgCl₂ a una concentración final de 4 mM, 200 nM de cada de dATP, dCTP, dGTP y 600 nM de dUTP (Applied Biosystems, Estados Unidos); cebador directo de hsa-miR-15a 2 200 nM (EQ16444, Tabla II), el cebador inverso de hsa-miR-15a 2 (EQ16445, Tabla II) a una concentración final de 200 nM, sonda de detección de LNA 250 nM (EQ15866, Tabla I), colorante de referencia ROX 0,1X (Invitrogen, Estados Unidos), 5 µl de la reacción de 1ª y 2ª cadena (descrita anteriormente) y 1,25 U de ADN polimerasa HotStarTaq (Qiagen, Alemania). Procedimiento de ciclado: 10 min 95°C, 45 ciclos de 20 s 95°C, 1 min 60°C en un Sistema de PCR a Tiempo Real Applied Biosystems 7500 (Applied Biosystems, Estados Unidos).

- 35 La sonda de etiquetado de microARN modificada con LNA EQ16695 (sonda de etiquetado de RT) para microARN miR-15a humano y el cebador inverso de hsa-miR-15a se aparearon y se extendieron como cebadores de transcripción inversa. La reacción de primera cadena estaba seguida por la sonda de etiquetado de 2ª cadena que se apareó y se extendió como se ha descrito anteriormente. Las reacciones de RT y PCR de miR-15 se detectaron posteriormente usando PCR a tiempo real como se ha descrito anteriormente, los cebadores de PCR de anclaje y sondas de detección doblemente marcadas modificadas con LNA (EQ16582, Tabla II) para el microARN miR-15a usando un menos molde como control negativo. Los valores de Ct usando el molde de microARN miR-15a eran de 40 37,1 para las sondas de detección doblemente marcadas modificadas con LNA EQ16582, (Fig. 21), mientras que no eran detectables valores de Ct para el molde de microARN miR-16 y los experimentos de control negativo (menos molde y menos Superscript III).

Ejemplo 18

- 45 *PCR cuantitativa a tiempo real para el microARN miR-15a humano maduro usando RT-PCR con molde miARN con una sonda de etiquetado modificada con LNA bloqueada en 3' y una sonda de detección modificada con LNA*

1. Extensión de cebadores de microARN con una sonda de etiquetado de miARN modificada con LNA bloqueada usando una enzima capaz de síntesis de ADN dirigida por ADN cebada con ARN.

- 50 La reacción de extensión de cebadores de miARN se realizó en 20 µl. En primer lugar, se mezcló molde de ARN miR-15a 500 nmol (EQ15885, Tabla I), 1 µg de ARN de levadura *Torulla* (Ambion, Estados Unidos) y sonda de etiquetado bloqueada de microARN 25 nM (EQ16695, Tabla II), se calentó 10 min a 70°C y se inactivó en hielo. Se añadió tampón EcoPol 1X (NEB, Estados Unidos), 500 µM de cada dNTP (Applied Biosystems, Estados Unidos), 10 U de SUPERase-In (Ambion, Estados Unidos), 5 U de enzima Fragmento Klenow (3'→5' exo-) (NEB, Estados Unidos) y H₂O tratada con DEPC hasta un volumen total de 20 µl. El termociclador DYAD™ (MJ Research DNA engine, Estados Unidos) se calentó a 37°C y se realizó el ciclado usando el perfil siguiente; 30 min 37°C, 20 min 75°C, seguido de enfriamiento hasta 4°C.

2. Amplificación de miARN maduro por RT-PCR usando una sonda de etiquetado modificada con LNA y una enzima capaz de síntesis de ADN dirigida por ARN/ADN cebada con ADN

La reacción de extensión de cebadores de la etapa nº 1 se diluyó hasta 50 µl de mezcla de reacción que contenía lo siguiente: sonda de etiquetado de LNA de segunda cadena 60 nM (EQ16624, Tabla II), cebador inverso de hsa-miR-15a 2 200 nM (EQ16445, Tabla I), 400 µM de cada dNTP, tampón de RT-PCR OneStep de Qiagen 1X (Qiagen, Estados Unidos), 2 µl de mezcla enzimática de RT-PCR OneStep de Qiagen (contiene Transcriptasa Inversa Omniscrypt™, Transcriptasa Inversa SensiScript™ y ADN polimerasa HotStarTaq®; los dNTP, el tampón y las enzimas se adquirieron en Qiagen, Estados Unidos) y H₂O tratada con DEPC hasta un volumen final de 50 µl. El termociclador DYAD™ (MJ Research DNA engine, Estados Unidos) se calentó hasta 50°C y el ciclado se realizó usando el perfil de temperatura siguiente; 30 min 50°C, 15 min 95°C y 10 ciclos de 1 min 95°C, 1 min 55°C, 2 min 72°C, seguido de enfriamiento hasta 4°C.

La reacción también se repitió usando ARN miR-16 (EQ15886, Tabla I) como diana en lugar de la diana de ARN miR-15a. Como controles negativos la sonda de etiquetado bloqueada de microARN, la sonda de etiquetado de LNA de segunda cadena, el cebador inverso de hsa-miR-15a 2, la enzima Fragmento Klenow (3' → 5' exo-) o la enzima de RT-PCR OneStep de Qiagen se omitieron en las mezclas de reacción respectivas.

3. PCR cuantitativa a tiempo real de miARN usando una sonda de detección modificada con LNA

La mezcla de reacción de PCR a tiempo real (25 µl) contenía tampón de PCR 1X [contiene Tris-HCl, KCl, (NH₄)₂SO₄, pH 8,7 (20°C)] (Qiagen, Alemania), MgCl₂ a una concentración final de 4 mM, 200 nM de cada de dATP, dCTP, dGTP y 600 nM de dUTP (Applied Biosystems, Estados Unidos); cebador directo de hsa-miR-15a 2 200 nM (EQ16444, Tabla II), el cebador inverso de hsa-miR-15a 2 (EQ16445, Tabla II) a una concentración final de 300 nM, sonda de detección de LNA 250 nM (EQ15866, Tabla I), colorante de referencia ROX 0,1X (Invitrogen, Estados Unidos), 5 µl de la reacción de 1ª y 2ª cadena (descritas anteriormente) y 1,25 U de ADN polimerasa HotStarTaq (Qiagen, Alemania). Procedimiento de ciclado: 10 min 95°C, 40 ciclos de 20 s 95°C, 1 min 60°C en un Sistema de PCR a Tiempo Real Applied Biosystems 7500 (Applied Biosystems, Estados Unidos).

La sonda de etiquetado de microARN modificada con LNA EQ16695 (sonda de etiquetado de 1ª cadena) para miR-15a humano que está bloqueada en su extremo 3' se usó para etiquetar el miR-15a maduro y se extendió usando el miR-15 como cebador empleando una ADN polimerasa dirigida por ADN cebada con ARN. La reacción de transcripción inversa se realizó por apareamiento de un cebador de RT y extensión mediante una reacción de ADN polimerasa dirigida por ARN/ADN. Por último, la sonda de etiquetado de 2ª cadena se apareó y se extendió mediante una reacción de ADN polimerasa dirigida por ADN. El molde de miARN humano etiquetado generado por reacción de extensión cebador de miR-15a, transcripción inversa y PCR, respectivamente, se detectó posteriormente usando PCR a tiempo real como se ha descrito anteriormente, los cebadores de PCR de anclaje y la sonda de detección doblemente marcada modificada con LNA (EQ16582, Tabla II) para el microARN miR-15a usando un sin molde como control negativo. El valor de Ct usando el molde de microARN miR-15a era de 14,9 para las sondas de detección doblemente marcadas modificadas con LNA EQ16582, (Fig. 23), mientras que los valores de Ct para el molde de microARN miR-16 eran de 23,4, mientras que los valores de Ct para los experimentos de control negativo eran de 32,3, 27,7 y 29,9 para las reacciones sin sonda de etiquetado bloqueada de microARN, sin sonda de etiquetado de LNA de segunda cadena y sin enzima Fragmento Klenow (3' → 5' exo-), respectivamente. No se obtuvieron valores de Ct detectables para los experimentos de control negativo (sin cebador inverso de hsa-miR-15a 2 o sin mezcla enzimática de RT-PCR OneStep de Qiagen).

Ejemplo 19

Curva patrón de PCR cuantitativa a tiempo real generada para el microARN miR-15a humano maduro usando RT-PCR con molde de miARN con una sonda de etiquetado modificada con LNA bloqueada en 3'.

La pareja de sondas de etiquetado de microARN miR-15a humano modificadas con LNA EQ1695/EQ16624 (pareja IX en el Ejemplo 18) se usó en RT-PCR con molde de miR-15a con una sonda de etiquetado modificada con LNA bloqueada en 3' como se ha descrito anteriormente (Ejemplo 18), donde la concentración de molde de miR-15a humano era de 500, 50, 5, 0,5 o 0,05 fmol, respectivamente. El molde de miARN-15a se detectó posteriormente usando PCR cuantitativa a tiempo real como se ha descrito anteriormente, mediante los cebadores de PCR de anclaje y la sonda de detección doblemente marcada modificada con LNA (EQ15866, Tabla I) para el microARN miR-15a usando un menos molde como control negativo. Los valores de Ct eran de 18,4, 21,1, 24,7, 28,5 y 32,0, respectivamente, para 500, 50, 5, 0,5 y 0,05 fmol del molde de microARN miR-15a, respectivamente, mientras que el valor de Ct era de 36,8 para el experimento de control negativo sin molde. El valor de Ct es inversamente proporcional al logaritmo del número de copias de molde inicial. Por lo tanto, se generó una curva patrón por representación de los valores de Ct frente al logaritmo del número de copias, como se representa en la Fig. 24. Por análisis de regresión lineal se determinó la pendiente y el punto de corte. La pendiente de la curva de valoración era de -3,45 y el punto de corte de 27,4.

Tabla IV: El diseño de las sondas de etiquetado bloqueadas en 3' de microARN.

EQ N°	Nombre	Extremo 5'	Secuencias	Extremo 3'
16858	P-hsa-miR-15a rt 5.1 LNA		gaaacagctatgacatgmCacAaamC	P
16859	P-hsa-miR-15a rt 5.2 LNA		gaaacagctatgacatgmCacAaAmC	P
16860	P-hsa-miR-15a rt 5.3 LNA		gaaacagctatgacatgmCacAAamC	P
16861	P-hsa-miR-15a rt 5.4 LNA		gaaacagctatgacatgmCacAAAmC	P
16862	hsa-miR-15a rt 5.5 LNA		gaaacagctatgacatgmCacAaamCc	
16863	hsa-miR-15a rt 5.6 LNA		gaaacagctatgacatgmCacAaamC	
16864	hsa-miR-15a rt 5.7 LNA		gaaacagctatgacatgmCacAaAmC	
16865	hsa-miR-15a rt 5.8 LNA		gaaacagctatgacatgmCacAAamC	
16866	hsa-miR-15a rt 5.9 LNA		gaaacagctatgacatgmCacAAAmC	
16867	hsa-miR-15a rt 5.10 LNA		gaaacagctatgacatgmCACAAAmC	
16868	hsa-miR-15a rt 5.11 LNA		gaaacagctatgacatgmCAmCAA	
16869	hsa-miR-15a rt 5.12 LNA		gaaacagctatgacatgmCAmCAA	
16882	hsa-miR-15a rt 6.1 LNA		gaaacagctatgacatgmCAmCAAAmCmCATT	
16883	hsa-miR-15a rt 6.2 LNA		gaaacagctatgacatgmCAmCAAAmCmCAT	
16884	hsa-miR-15a rt 6.3 LNA		gaaacagctatgacatgmCAmCAAAmCmCA	
16885	hsa-miR-15a rt 6.4 LNA		gaaacagctatgacatgmCAmCAAAmCmC	
^a LNA (mayúsculas), ADN (minúsculas), 5-metil C (mC) y Fosfato (P).				

Tabla V. El diseño de la sonda de detección de ARNnp U6 y de los cebadores de PCR a tiempo real usados en el Ejemplo 20.

Id Oligo (EQ N°)	Nombre de oligonucleótido	Extremo 5'	Secuencia (5'-3') ^a	Extremo 3'
17159	Cebador de RT de ARNnp U6		tatggaacgcttcacgaatttgcg	
17160	Cebador directo de ARNnp U6		cgcttcggcagcacatatac	
17167	Sonda de detección de ARNnp U6	6-Fitc	CAGGgGcmC#Q1z	P
^a LNA (mayúsculas), ADN (minúsculas), 5-metil C (mC); Fluoresceína (6-FITC (Glenn Research, N° Id. Prod. 10-1964)), #Q1 (Preparado como se describe en el Ejemplo 8a), z (5-nitroindol (Glenn Research, N° Id. Prod. 10-1044)), Fosfato (P).				

Ejemplo 20**5 PCR a tiempo real para el ARNnp U6 de Homo sapiens****1. Transcripción inversa de ARNnp U6**

La reacción de transcripción inversa (RT) se realizó en 25 µl que contenían 1 µg de molde de ARN Total de Referencia Humano de PCR Cuantitativa (Stratagene, Estados Unidos), 5 µg de hexámero aleatorio pd(N)₆ (Amersham Biosciences, Suecia), tampón de primera cadena 1X (Tris-HCl 50 mM, KCl 75 mM, MgCl₂ 3 mM, pH 8,3 a 20°C) (Invitrogen, Estados Unidos), DTT 10 mM (Invitrogen, Estados Unidos), 1 mM de cada dNTP (Applied Biosystems, Estados Unidos), 10 U de SUPERase-In (Ambion, Estados Unidos) y 200 U de transcriptasa inversa Superscript II (Invitrogen, Estados Unidos). El molde de ARN Total de Referencia y el hexámero aleatorio se mezclaron y calentaron 5 min a 70°C y se inactivaron en hielo. El perfil de temperatura en el termociclador DYAD™ (MJ Research DNA engine, Estados Unidos) era de 30 min a 37°C, 90 min a 42°C y después en mantenimiento a 4°C. La síntesis de primera cadena se purificó en una Unidad de Filtración Centrífuga Microcon YM-30 (Millipore, Estados Unidos) de acuerdo con las instrucciones del fabricante. La muestra recuperada después de la centrifugación se diluyó hasta cinco veces el volumen de partida de RT original (100 µl en total).

2. Ensayo de PCR a tiempo real de ARNnp U6 usando una sonda de detección modificada con LNA.

La reacción (50 µl) era de tampón de PCR 1X [Tris-HCl, KCl, (NH₄)₂SO₄, pH 8,7 a 20°C] (Qiagen, Alemania), MgCl₂ a una concentración final de 4 mM, 200 nM de cada de dATP, dCTP, dGTP y 600 nM de dUTP (Applied Biosystems, Estados Unidos); cebador directo de ARNnp U6 900 nM (EQ17160, Tabla V), cebador de RT de ARNnp U6 900 nM (EQ17159, Tabla V), sonda de detección de LNA 250 nM (EQ17167, Tabla V), colorante de referencia ROX 0,1X (Invitrogen, Estados Unidos), 1 ó 5 µl de la reacción de síntesis de primera cadena (RT) (descrita anteriormente) y 2,5 U de ADN polimerasa HotStarTaq (Qiagen, Alemania). Procedimiento de ciclado: 10 min a 95°C, 40 ciclos de 15 s a 95°C, 1 min a 60°C en un Sistema de PCR a Tiempo Real Applied Biosystems 7500 (Applied Biosystems, Estados Unidos).

Las reacciones de RT de ARNnp U6 (nº de acceso X59362, GenBank) se detectaron posteriormente usando PCR a tiempo real como se ha descrito anteriormente, cebadores de PCR y sonda de detección doblemente marcada modificada con LNA para el ARNnp U6 humano usando un menos molde como control negativo. Los valores de Ct usando 1 µl o 5 µl de molde de ADNc de ARNnp U6 eran de 28,0 y 25,6 para la sonda de detección doblemente marcada modificada con LNA (EQ17167, Tabla V), respectivamente (Fig. 25), mientras que no se obtuvo valor de Ct para el experimento de control negativo (sin molde).

Ejemplo 21

RT-PCR a tiempo real para el miR-15a humano usando reacción de extensión cebada con microARN en una sonda de captura modificada con LNA marcada con 5' biotina y bloqueada en 3', inmovilización del producto de extensión en un tubo de estreptavidina, reacción de transcriptasa inversa en solución y PCR a tiempo real usando una sonda de detección modificada con LNA.

1. La reacción de extensión cebada con microARN en una sonda de captura modificada con LNA marcada con 5'-biotina bloqueada en 3'.

Se mezcló ARN Hsa miR-15a (1 fmol; EQ15885, Tabla I) con 1 µg de ARN de levadura *Torulla* (Ambion, Estados Unidos) y sonda de captura de miR-15a 100 fmol (EQ16879, Tabla VI) en un volumen total de 6 µl, se calentó durante 5 min a 65°C y se inactivó en hielo, se añadió 1 µl de tampón NEB 2 10X (New England Biolabs, Estados Unidos), 1 µl de mezcla de dNTP (1 mM de cada dNTP; Applied Biosystems, Estados Unidos), 20 U de SUPERase-In (Ambion, Estados Unidos) y 5 U de Klenow exo- (New England Biolabs, Estados Unidos). Las incubaciones se continuaron durante 30 min a 37°C.

2. La inmovilización en un tubo de estreptavidina

Se añadió un volumen de tampón de unión 2X (Tris-HCl 200 mM pH 7,5 a 20°C, LiCl 800 mM, EDTA 40 mM) a la reacción de Klenow exo- y el sobrenadante se transfirió a un tubo de PCR revestido con estreptavidina (Roche, Alemania). La incubación durante 3 min a 37°C permitió que se formase la unión de biotina-estreptavidina. Se retiró el material no unido por lavado tres veces en cinco volúmenes de tampón de lavado (Tris-HCl 10 mM pH 7,5 a 20°C, LiCl 20 mM) a temperatura ambiente. "Proceder inmediatamente con la reacción de RT".

3. La reacción de RT en solución

El cebador de RT (100 fmol, EQ16994, Tabla VI) y 10 nmoles de cada dNTP (Applied Biosystems, Estados Unidos) se mezclaron en 12 µl de volumen total y se añadieron al tubo de PCR con estreptavidina que contenía la sonda de captura inmovilizada y la cadena quimérica de ARN-ADN. El tubo se calentó 5 min a 70°C y el sobrenadante se retiró a un nuevo tubo en hielo. Se añadió tampón de primera cadena 5x (Tris-HCl 50 mM pH 8,3 a 20°C, KCl 75 mM, MgCl₂ 3 mM; Invitrogen, Estados Unidos), DTT 10x (1x = 10 mM, Invitrogen, Estados Unidos), 20 U de SUPERase-In (Ambion, Estados Unidos) y 200 U de transcriptasa inversa Superscript II (Invitrogen, Estados Unidos) (en un volumen de 8 µl) y la incubación se continuó durante 1 h a 42°C. El calentamiento durante 15 min a 70°C terminó la reacción.

4. La PCR a tiempo real usando una sonda de detección modificada con LNA

La reacción (50 µl) era de tampón de PCR 1X (Qiagen, Alemania), MgCl₂ a una concentración final de 4 mM, 0,2 mM de cada de dATP, dCTP, dGTP y 0,6 mM de dUTP (Applied Biosystems, Estados Unidos), cebador directo de miR-15a 900 nM (EQ16990, Tabla VI), cebador inverso de miR 900 nM (EQ16989, Tabla VI), sonda de detección de LNA de miR-15a 250 nM (EQ16992, Tabla VI), colorante de referencia ROX 0,1X (Invitrogen, Estados Unidos), 1 µl de la reacción de síntesis de primera cadena (RT) (descrita anteriormente), 0,5 U de Uracilo ADN Glicosilasa (Invitrogen, Estados Unidos) y 2,5 U de ADN polimerasa HotStarTaq (Qiagen, Alemania). El programa de ciclado de temperatura era; 10 min a 37°C, 10 min a 95°C, 1 min a 45°C, 1 min a 60°C, seguido de 40 ciclos de 20 s a 95°C y 1 min a 60°C. El análisis de RT-PCR a tiempo real se procesó en un Sistema de PCR a Tiempo Real ABI 7500 (Applied Biosystems, Estados Unidos).

El resultado para la reacción descrita era un valor de Ct de 33,1. Una reacción sin ARN de levadura *Torulla* dio un Ct de 33,3, mientras que una reacción sin SUPERase-In en la etapa 1 dio un Ct de 32,1. Los experimentos de control

negativo sin ARN hsa miR-15a (EQ15885, Tabla I) o sin sonda de captura de miR-15a (EQ16879, Tabla VI) o sin Klenow exo-, no dieron ninguno valor de Ct. Además, una qPCR de control sin molde (NTC) no dio valor de Ct. El análisis de punto final por procesamiento de muestras de la reacción de RT-PCR a tiempo real en un gel de agarosa confirmó los resultados, es decir, ningún valor de Ct corresponde a la ausencia del amplicón de PCR en el gel.

5

Tabla VI: Oligonucleótidos usados en los Ejemplos 21 a 23

EQ N°:	Nombre de Oligo:	5'	Engarce: Secuencia (5'-3') ^a 3'
16879	sonda de captura de Hsa miR-15a	Bio	HEG2 tactqaqtaatcqtatcmCacAaamCca P
16989	cebador de PCR inv de miR		Caatttcacacaggatactgagt
16990	cebador de PCR de Hsa miR-15a		Agcggataactagcagcacata
16992	sonda de qPCR de miR-15a	6-Fitc	TGTGGATAT#Q1z P
16994	cebador de RT de miR		caatttcacacaggatactgagtaatcg
^a LNA (mayúsculas), ADN (minúsculas), Fluoresceína (6-FITC (Glenn Research, N° Id. Prod. 10-1964)), biotina (Bio (Glenn Research)), dos restos de hexaetilenglicol (HEG2 (Glenn Research)), #Q1 (Preparado como se ha descrito en el Ejemplo 8a), z (5-nitroindol (Glenn Research, N° Id. Prod. 10-1044)), Fosfato (P).			

Ejemplo 22

RT-PCR a tiempo real para una serie de diluciones del miR-15a humano usando: reacción de extensión cebada con microARN en una sonda de captura modificada con LNA marcada con 5'-biotina y bloqueada en 3', inmovilización del producto de extensión en un tubo de estreptavidina, reacción de transcriptasa inversa (RT) en solución y PCR a tiempo real usando una sonda de detección modificada con LNA.

10

1. La reacción de extensión cebada con microARN en una sonda de captura modificada con LNA marcada con 5'-biotina bloqueada en 3'

Se mezcló ARN hsa miR-15a (100 fmol, 10 fmol, 1 fmol, 100 amol o 10 amol; EQ15885, Tabla I) con 1 µg de ARN de levadura *Torulla* (Ambion, Estados Unidos) y sonda de captura de miR-15a 100 fmol (EQ16879, Tabla VI) en un volumen total de 7 µl, se calentó durante 5 min a 65°C y se enfrió en hielo. Se añadió 1 µl de tampón NEB 2 10 x (New England Biolabs, Estados Unidos), 1 µl de mezcla de dNTP (1 mM de cada dNTP; Applied Biosystems, Estados Unidos) y 5 U de Klenow exo- (New England Biolabs, Estados Unidos). La incubación se continuó durante 30 min a 37°C.

15

2. La inmovilización en un tubo con estreptavidina

Se añadió un volumen de tampón de unión 2x (Tris-HCl 200 mM pH 7,5 a 20°C, LiCl 800 mM, EDTA 40 mM) a la reacción de Klenow exo- y el sobrenadante se transfirió a un tubo de PCR revestido con estreptavidina (Roche, Alemania). La incubación durante 3 min a 37°C permitió que se formara la unión de biotina-estreptavidina. El material no unido se eliminó por lavado tres veces en cinco volúmenes de tampón de lavado (Tris-HCl 10 mM pH 7,5 a 20°C, LiCl 20 mM) a temperatura ambiente.

20

3. La reacción de RT en solución

El cebador de RT (100 fmol, EQ16994, Tabla VI) y 10 nmol de cada dNTP (Applied Biosystems, Estados Unidos) se mezclaron en 12 µl de volumen total y se añadieron al tubo de PCR con estreptavidina que contenía la sonda de captura inmovilizada y la cadena quimérica de ARN-ADN. El tubo se calentó 5 min a 70°C y el sobrenadante se transfirió a un nuevo tubo en hielo. Se añadió tampón de primera cadena 5 x (Tris-HCl 50 mM pH 8,3 a 20°C, KCl 75 mM, MgCl₂ 3 mM; Invitrogen, Estados Unidos), DTT 10 x (1x = 10 mM, Invitrogen, Estados Unidos), 20 U de SUPERase-In (Ambion, Estados Unidos) y 200 U de transcriptasa inversa Superscript II (Invitrogen, Estados Unidos) (en un volumen de 8 µl) y la incubación se continuó durante 1 h a 42°C. El calentamiento durante 15 min a 70°C terminó la reacción.

25

30

4. La PCR a tiempo real usando una sonda de detección modificada con LNA

La reacción (50 µl) era de tampón de PCR 1x (Qiagen, Alemania), MgCl₂ a una concentración final de 4 mM, 0,2 mM de cada de dATP, dCTP, dGTP y 0,6 mM de dUTP (Applied Biosystems, Estados Unidos), cebador directo de miR-15a 900 nM (EQ16990, Tabla VI), cebador inverso de miR 900 nM (EQ16989, Tabla VI), sonda de detección de LNA de miR-15a 250 nM (EQ16992, Tabla VI), colorante de referencia ROX 0,1 x (Invitrogen, Estados Unidos), 1 µl de la reacción de síntesis de primera cadena (RT) (descrita anteriormente), 0,5 U de Uracilo ADN Glicosilasa (Invitrogen, Estados Unidos) y 2,5 U de ADN polimerasa HotStarTaq (Qiagen, Alemania). El programa de ciclado de temperatura era de 10 min a 37°C, 10 min a 95°C, 1 min a 45°C, 1 min a 60°C, seguido de 40 ciclos de 20 s a 95°C y 1 min a

35

40

60°C. El análisis de RT-PCR a tiempo real se procesó en un Sistema de PCR a Tiempo Real ABI 7500 (Applied Biosystems, Estados Unidos).

El resultado para la reacción descrita fue de valores de Ct de 24,0, 27,6, 31,1, 34,8 y 37,0 para 100 fmol, 10 fmol, 1 fmol, 100 amol y 10 amol de aportación de ARN hsa miR-15a (EQ15885, Tabla I), respectivamente. Un experimento de control negativo sin ARN hsa miR-15a (EQ15885, Tabla I) no dio valor de Ct. Además, una qPCR de control sin molde (NTC) no dio valor de Ct. La aportación de 10 amol de ARN hsa miR-15a (EQ15885, Tabla I) correspondía a una concentración de 10 fM o menos en la mezcla de RT-PCR a tiempo real de 50 µl. El análisis de punto final por procesamiento de muestras de la reacción de RT-PCR a tiempo real en un gel de agarosa confirmó los resultados, es decir, ningún valor de Ct correspondía a la ausencia de amplicones de PCR en el gel.

Ejemplo 23

RT-PCR a tiempo real para el miR-15a humano usando reacción de extensión cebada con microARN en una sonda de captura modificada con LNA marcada con 5'-biotina y bloqueada en 3', inmovilización del producto de extensión en perlas de estreptavidina, reacción de transcriptasa inversa (RT) en solución y PCR a tiempo real usando una sonda de detección modificada con LNA.

1. Las reacciones de extensión cebadas con microARN en sondas de captura modificadas con LNA marcadas con 5'-biotina bloqueadas en 3'

Se mezcló ARN hsa miR-15a (1 fmol; EQ15885, Tabla I) con 1 µg de ARN de levadura *Torulla* (Ambion, Estados Unidos) y sonda de captura de miR-15a 100 fmol (EQ16879, Tabla VI) en un volumen total de 7 µl, se calentó durante 5 min a 65°C y se enfrió en hielo. Se añadió 1 µl de tampón NEB 2 10x (New England Biolabs, Estados Unidos), 1 µl de mezcla de dNTP (1 mM de cada; Applied Biosystems, Estados Unidos) y 5 U de Klenow exo- (New England Biolabs, Estados Unidos). La incubación se continuó durante 30 min a 37°C.

2. La inmovilización sobre perlas de estreptavidina

Se añadió un volumen (10 µl) de tampón de unión 2x (Tris-HCl 10 mM pH 7,5 a 20°C, NaCl 2 M, EDTA 1 mM) que contenía 10 µg de Dynabeads M-270 Estreptavidina; (Dynal Biotech, Noruega) a la reacción de Klenow exo- y se incubó durante 10 min a 20°C con rotación para permitir que se formara la unión de biotina-estreptavidina. El tubo se puso en el concentrador de partículas magnéticas (Dynal MPC-9600; Dynal Biotech, Noruega). El sobrenadante se eliminó y las perlas se lavaron tres veces en 100 µl de tampón de lavado (Tris-HCl 10 mM pH 7,5 a 20°C, NaCl 20 mM). "Proceder inmediatamente con la reacción de RT".

3. La reacción de RT en solución

El cebador de RT (100 fmol, EQ16994, Tabla VI) y 10 nmol de cada dNTP (Applied Biosystems, Estados Unidos) se mezclaron en 12 µl de volumen total y se añadieron a los tubos que contenían la sonda de captura inmovilizada y la cadena quimérica de ARN-ADN. El tubo se calentó 5 min a 70°C, se transfirió al concentrador de partículas magnéticas y el sobrenadante se transfirió a un nuevo tubo en hielo. Se añadió tampón de primera cadena 5x (Tris-HCl 50 mM, pH 8,3 a 20°C, KCl 75 mM, MgCl₂ 3 mM; Invitrogen, Estados Unidos), DTT 10 x (1x = 10mM, Invitrogen, Estados Unidos), 20 U de SUPERase-In (Ambion, Estados Unidos) y 200 U de transcriptasa inversa Superscript II (Invitrogen, Estados Unidos) (en un volumen de 8 µl), y la incubación se continuó durante 1 h a 42°C. El calentamiento durante 15 min a 70°C terminó la reacción.

4. PCR a tiempo real usando una sonda de detección modificada con LNA

La reacción (50 µl) era de tampón de PCR 1x (Qiagen, Alemania), MgCl₂ a una concentración final de 4 mM, 0,2 mM de cada de dATP, dCTP, dGTP y 0,6 mM de dUTP (Applied Biosystems, Estados Unidos), cebador directo de miR-15a 900 nM (EQ16990, Tabla VI), cebador inverso de miR 900 nM (EQ16989, Tabla VI), sonda de detección de LNA miR-15a 250 nM (EQ16992, Tabla VI), colorante de referencia ROX 0,1x (Invitrogen, Estados Unidos), 5 µl de la reacción de síntesis de primera cadena (RT) (descrita anteriormente), 0,5 U de Uracilo ADN Glicosilasa (Invitrogen, Estados Unidos) y 2,5 U de ADN polimerasa HotStarTaq (Qiagen, Alemania). El programa de ciclado de temperatura era de 10 min a 37°C, 10 min a 95°C, 1 min a 45°C, 1 min a 60°C, seguido de 40 ciclos de 20 s a 95°C y 1 min a 60°C. El análisis de RT-PCR a tiempo real se procesó en un Sistema de PCR a Tiempo Real ABI 7500 (Applied Biosystems, Estados Unidos).

El resultado para la reacción descrita era un valor de Ct de 28,0. Una qPCR de control sin molde (NTC) no dio valor de Ct.

Ejemplo 24

PCR cuantitativa a tiempo real para el miR-7a humano usando transcripción inversa en soporte sólido cebada mediante una sonda de captura modificada con LNA que contiene una biotina 5', seguido de PCR a tiempo real usando una sonda de detección modificada con LNA.

1. La reacción de extensión cebada con microARN en una sonda de captura modificada con LNA marcada con 5'-biotina

En un volumen total de 10 µl se mezcló lo siguiente: ARN hsa miR-7a (10 fmol; EQ16898, Tabla VII), 1 µg de ARN de levadura *Torulla* (Ambion, Estados Unidos) y sonda de captura de miR-7a 100 fmol (EQ 17367, Tabla VII), 1 µl de tampón NEB 2 10 x (New England Biolabs, Estados Unidos), 1 µl de mezcla de dNTP (1 mM de cada dNTP; Applied Biosystems, Estados Unidos) y 5 U de Klenow exo- (New England Biolabs, Estados Unidos). La mezcla se incubó durante 30 min a 37°C.

2. La inmovilización en un tubo con estreptavidina

Se añadieron 2,5 µl de tampón de unión 5x (Tris-HCl 500 mM pH 7,5 a 20°C, LiCl 2 M, EDTA 100 mM) a la reacción de Klenow exo- y el sobrenadante se transfirió a un tubo de PCR revestido con estreptavidina (Roche, Alemania). La incubación durante 3 min a 37°C permitió que se formase la unión de biotina-estreptavidina. El material no unido se eliminó por lavado cinco veces en 100 µl de tampón de lavado (Tris-HCl 10 mM pH 7,5 a 20°C, LiCl 20 mM) a temperatura ambiente.

3. La reacción de RT

Se añadieron 20 µl de la siguiente mezcla de reacción de RT al tubo de PCR revestido con estreptavidina que contenía la sonda de captura inmovilizada y la cadena quimérica de ARN-ADN: tampón de primera cadena 1x (Tris-HCl 50 mM pH 8,3 a 20°C, KCl 75 mM, MgCl₂ 3 mM; Invitrogen, Estados Unidos), DTT 10 mM (Invitrogen, Estados Unidos), 1,25 mM de cada dNTP (Applied Biosystems, Estados Unidos), 20 U de SUPERase-In (Ambion, Estados Unidos) y 200 U de transcriptasa inversa Superscript II (Invitrogen, Estados Unidos) se incubaron durante 1 h a 42°C.

4. La pre-PCR

La mezcla de RT se retiró y se sustituyó con 20 µl de la mezcla maestra de PCR que contenía Mezcla Maestra de PCR de Sonda Quantitect 1x (Qiagen, Estados Unidos), cebador directo e inverso (EQ17372 y EQ17374, Tabla VII) cada uno a 0,4 µM, 1 U de Uracilo-ADN Glicosilasa (UNG, Roche, Alemania). La pre-PCR se sometió a las condiciones de PCR siguientes: 95°C durante 15 min, 30°C durante 1 min, 40°C durante 1 min, 60°C durante 1 min y 10 ciclos de 94°C durante 20 s y 60°C durante 1 min. La reacción se mantuvo a 4 1C hasta la realización de la PCR a tiempo real. Después de eso, se añadieron 80 µl de H₂O con DEPC a la reacción de pre-PCR antes del uso en la PCR a tiempo real.

5. La PCR a tiempo real usando una sonda de detección modificada con LNA

La mezcla de PCR a tiempo real de 50 µl contenía Mezcla Maestra de PCR de Sonda Quantitect 1x (Qiagen), cebador directo e inverso (EQ17372 y EQ17374, Tabla VII) cada uno a 0,4 µM, sonda de detección de LNA de miR-7a 0,2 µM (EQ17377, Tabla VII), 1 U de UNG (Roche, Alemania) y 5 µl de la reacción de síntesis de primera cadena (RT)-pre-PCR diluida (descrita anteriormente). El programa de ciclado de temperatura era de 95°C durante 15 min y 40 ciclos de 94°C durante 20 s y 60°C durante 1 min. La PCR a tiempo real se realizó en un instrumento de PCR a tiempo real Opticon (MJ Research, Estados Unidos).

Resultados

La PCR a tiempo real producía una representación de amplificación sigmoidea con cantidad abundante de señal (Fig. 26) y un valor de Ct de 18,5. El valor de Ct obtenido es realista para la cantidad de Hsa-miR-7a usado en el experimento actual e indica una funcionalidad completa del ensayo.

Tabla VII: Oligonucleótidos usados en el Ejemplo 24

EQ N°:	Nombre de Oligo:	5'	Secuencia (5'-3') ^a	3'
16898	hsa-let-7a		ugagguaguagguuguauaguuu	
16899	hsa-let-7f		ugagguaguagauuguauaguuu	
16917	hsa-let-7q		ugagguaguaguuuuguacagu	
17367	sonda de captura cP5hsa-let-7a	Bio	gttgaggatggatgtaggtggttaactAtAmCaA	
17372	cebador de qPcR-D de hsa-let-7a 3		agaatggatggatctgaggtagt	
17374	cebador de qPcR-I de hsa-let-7a 1		aggatggatggttaggtagt	

(continuación)

EQ N°:	Nombre de Oligo:	5'	Secuencia (5'-3')a	3'
17375	cebador de qPcR-I de hsa-let-7a 2		gttgaggatggatgtaggat	
17377	Sonda de qPcR de hsa-let-7a 2	6-Fitc	AcTATAmCAAmCmCT#Q1z	P
18089	Sonda de qPcR de hsa-let-7a 2 Q2	6-Fitc	acTATAmCAAmCmCT#Q2z	P
^a LNA (mayúsculas), ADN (minúsculas), ARN (<i>cursiva y minúsculas</i>), 5-metil C (mC); Fluoresceína (6-FITC (Glenn Research, N° Id. Prod. 10-1964)), biotina (Bio (Glenn Research)), #Q1 (Preparado como se describe en el Ejemplo 8a), #Q2 (Preparado como se describe en el Ejemplo 8b), z (5-nitroindol (Glenn Research, N° Id. Prod. 10-1044)), Fosfato (P).				

Ejemplo 25

Síntesis, desprotección y purificación de sondas oligonucleotídicas doblemente marcadas

Las sondas oligonucleotídicas doblemente marcadas de las Tablas I, II y V a VII, es decir, EQ15866, EQ15867, EQ16580-16583, EQ16679, EQ17167, EQ16879, EQ16992, EQ17367 y EQ17377 se prepararon en un sintetizador de ADN automático (sintetizador de ADN Expedite 8909, PerSeptive Biosystems, escala de 0,2 µmol) usando la estrategia de fosforamidita (Beaucage y Caruthers, Tetrahedron Lett. 22: 1859-1862, 1981) con LNA y ADN fosforamiditas protegidas con 2-cianoetilo (Sinha, y col., Tetrahedron Lett. 24: 5843-5846, 1983).

El ciclo de síntesis se modificó para las LNA fosforamiditas (tiempo de acoplamiento de 250 s) en comparación con las ADN fosforamiditas. Se usó 1H-tetrazol o 4,5-dicianoimidazol (Prologo, Hamburgo, Alemania) como activador en la etapa de acoplamiento.

Los oligonucleótidos se desprotegeron usando amoníaco acuoso al 32% (1 h a temperatura ambiente, después 2 horas a 60°C) y se purificaron por HPLC (serie Shimadzu-SpectraChrom; columna RP18 Xterra™, 10 µm 7,8 x 150 mm (Waters). Tampones: A: acetato de trietilamonio 0,05 M pH 7,4. B: acetonitrilo al 50% en agua. Eluyente: 0-25 min: B al 10-80%; 25-30 min: B al 80%). La composición y la pureza de los oligonucleótidos se verificaron mediante análisis de MALDI-EM (PerSeptive Biosystem, Voyager DE-PRO).

Ejemplo 26

RT-PCR a tiempo real para el hsa-Let-7a humano usando: reacción de extensión cebada con microARN en una sonda capturada modificada con LNA marcada con 5'-biotina y bloqueada en 3', inmovilización del producto de extensión en un tubo con estreptavidina, reacción de transcriptasa inversa en solución y PCR a tiempo real usando una sonda de detección modificada con LNA con el inactivador Q2.

1. La reacción de extensión cebada con microARN en una sonda de captura modificada con LNA marcada con 5'-biotina bloqueada en 3'

Se mezcló ARN hsa Let-7a (100 fmol, EQ16898, Tabla VII) con 1 µg de ARN de levadura *Torulla* (Ambion, Estados Unidos), sonda de captura cP5_hsa-let-7a 100 fmol (EQ17367, Tabla VII), 1 µl de tampón NEB 2 10 x (New England Biolabs, Estados Unidos), 1 µl de mezcla de dNTP (1 mM de cada dNTP; Applied Biosystems, Estados Unidos) y 5 U de Klenow exo- (New England Biolabs, Estados Unidos) en un volumen total de 10 µl. La incubación se realizó durante 30 min a 37°C.

2. La inmovilización en un tubo con estreptavidina

Se añadió un volumen de 2,5 µl de tampón de unión 5x (Tris-HCl 500 mM pH 7,5 a 20°C, LiCl 2 M, EDTA 100 mM) a la reacción de Klenow exo- y la mezcla se transfirió al fondo de un tubo de PCR revestido con estreptavidina (Roche, Alemania). La incubación se realizó durante 3 min a 37°C para permitir que se produjera la unión de biotina-estreptavidina. El material no unido se eliminó por lavado cinco veces en 100 µl de tampón de lavado (Tris-HCl 10 mM pH 7,5 a 20°C, LiCl 20 mM) a temperatura ambiente. El tubo de lavado se sometió inmediatamente a la reacción de transcripción inversa.

3. La reacción de RT en solución

El cebador de RT (1 µl 100 fmol/µl, EQ17374, Tabla VII) y 2,5 de dNTP (10 mM de cada dNTP, Applied Biosystems, Estados Unidos) se mezclaron en 12 µl de volumen total y se añadieron al tubo de PCR con estreptavidina que contenía la sonda de captura inmovilizada y la cadena química de ARN-ADN. El tubo se calentó 5 min a 70°C y el sobrenadante se retiró a un nuevo tubo en hielo. Se añadieron 4 µl de tampón de primera cadena 5x (Tris-HCl 250 mM pH 8,3 a 20°C, KCl 375 mM, MgCl₂ 15 mM; Invitrogen, Estados Unidos), 2 µl de DTT 100 mM (Invitrogen,

Estados Unidos), 1 µl de SUPERase-In 20 U/µl (Ambion, Estados Unidos) y 1 µl de transcriptasa inversa Superscript II 200 U/µl (Invitrogen, Estados Unidos) y la incubación se continuó durante 1 h a 42°C. El calentamiento durante 15 min a 70°C terminó la reacción. El volumen total se ajustó a 100 µl por adición de 80 µl de H₂O con DEPC.

4. La PCR a tiempo real usando una sonda de detección modificada con LNA

- 5 La reacción (50 µl) era de Mezcla Maestra de PCR de Sonda QuantiTect (Qiagen, Alemania), cebador de qPcR-D de hsa-let-7a 3 400 nM (EQ17372, Tabla VII), cebador de qPcR-I de hsa-let-7a 2 400 nM (EQ17375, Tabla VII), sonda de detección hsa-let-7a_qPcR-Sonda2_Q2 200 nM (EQ18089, Tabla VII), 5 µl de la reacción de síntesis de primera cadena (RT) (descrita anteriormente) y 0,5 U de Uracilo ADN Glicosilasa (Invitrogen, Estados Unidos). El programa de ciclado de temperatura era: 10 min a 37°C, 15 min a 95°C, 1 min a 30°C, 1 min a 40°C, 1 min a 60°C, seguido de 10 40 ciclos de 20 s a 94°C y 1 min a 60°C. El análisis de RT-PCR a tiempo real se realizó en el instrumento de PCR a tiempo real Opticon (MJ Research, Estados Unidos).

5. Resultados

- 15 El experimento se realizó con una repetición de 3 y el valor de Ct promedio obtenido era de 19,0 con una CV de 0,01. Tres repeticiones de una reacción sin adición de miARN hsa Let-7a no produjeron señal y no se obtuvo valor de Ct.

Ejemplo 27

Preparación de pre-miARN precursor hsa Let-7a

1. Transcripción *in vitro*

- 20 a. El oligonucleótido de promotor/líder de T7 (EQ18219, véase la Tabla VIII) se mezcló con el oligonucleótido de ADN polimérico largo precursor de hsa-let-7a-1 (EQ18213, véase Tabla VIII) en una concentración final de 20 µM de cada oligonucleótido.
- b. La muestra se calentó 5 minutos a 95°C y se dejó que la solución se enfriara a temperatura ambiente en la mesa poyata.
- 25 c. Se usaron 8 µl de la solución anterior como molde en una reacción de MegaScript de 20 µl normal (Ambion, Estados Unidos) que contenía ATP, GTP, CTP, UTP, tampón de reacción y mezcla enzimática.
- d. La reacción se incubó durante una noche a 37°C.
- e. Se añadió 1 µl de ADNasa y la reacción se incubó 15 min a 37°C.
- f. El pre-miARN precursor transcrito *in vitro* se purificó en columnas de centrifugación RNeasy MinElute Cleanup usando un protocolo modificado para limpieza de miARN.

30 **Tabla VIII: Oligonucleótidos usados en el Ejemplo 27**

EQ Nº:	Nombre de Oligo:	5'	Secuencia (5'-3')	3'
18213	Polímero largo precursor de hsa-let 7a-1		aagacagtagattgtatagtatctcccagtggtgggtgtgaccctaaaactatacaacctactac ctcatctccctatagtgcgtattaaatt	
18219	Secuencia de promotor/líder de T7		aatttaatacgactcactatagggaga	

2: Protocolo modificado para la limpieza de miARN precursor

1. Añadir 350 µl de Tampón RLT a la muestra y mezclar minuciosamente por agitación vorticial.
2. Añadir 1 volumen de etanol al 80% (350 µl) y mezclar minuciosamente por agitación vorticial. No centrifugar. Proceder inmediatamente con la etapa 3.
- 35 3. Pipetear la muestra, incluyendo cualquier precipitado que pueda haberse formado, en una columna de centrifugación RNeasy Mini colocada en un tubo de recogida de 2 ml. Cerrar la tapa suavemente y centrifugar durante 15 s a 8000 x g.
4. Desechar la columna de centrifugación RNeasy Mini.
5. Pipetear el filtrado de la etapa 3 (que contiene miARN) en un tubo de reacción de 2 ml.

6. Añadir 1,4 volúmenes de etanol al 100% (980 µl) y mezclar minuciosamente por agitación vorticial. No centrifugar. Proceder inmediatamente con la etapa 7.

7. Pipetear 700 µl de la muestra en una columna de centrifugación RNeasy MinElute colocada en un tubo de recogida de 2 ml. Cerrar la tapa suavemente y centrifugar durante 15 s a 8000 x g. Desechar el filtrado. Repetir la etapa 7 hasta que toda la muestra se haya pipeteado en la columna de centrifugación. Desechar el filtrado cada vez.

8. Pipetear 500 µl de Tampón RPE en la columna de centrifugación RNeasy MinElute. Cerrar la tapa suavemente y centrifugar durante 15 s a 8000 x g. Desechar el filtrado.

9. Pipetear 500 µl de etanol 80% en la columna de centrifugación RNeasy MinElute. Cerrar la tapa suavemente y centrifugar durante 15 s a 8000 x g. Desechar el filtrado y el tubo de recogida.

10. Poner la columna de centrifugación RNeasy MinElute en un nuevo tubo de recogida de 2 ml. Abrir la tapa y centrifugar durante 1 min a 8000 x g.

11. Poner la columna de centrifugación RNeasy MinElute en un tubo de recogida de 1,5 ml y pipetear 14 µl de agua sin ARNasa sobre la membrana de la columna de centrifugación. Cerrar la tapa suavemente y centrifugar durante 1 min a 8000 x g para eluir el miARN.

La concentración del eluido de miARN se midió a DO_{260} , seguido de dilución en H_2O con DEPC a una concentración final de 10 nM (10 fmol por µl).

Ejemplo 28

RT-PCR a tiempo real para detección selectiva de maduro frente a precursor del hsa-Let-7a humano usando: reacción de extensión cebada con microARN en una sonda de captura modificada con LNA marcada con 5'-biotina y bloqueada en 3', inmovilización del producto de extensión en un tubo con estreptavidina, reacción de transcriptasa inversa en solución y PCR a tiempo real usando una sonda de detección modificada con LNA con inactivador Q2.

1. La reacción de extensión cebada con microARN en una sonda de captura modificada con LNA marcada con 5'-biotina bloqueada en 3'

Se mezcló miARN hsa Let-7a (10 fmol, EQ16898, Tabla VII) y/o pre-miARN precursor hsa Let-7a (10 fmol; producido como se ha resumido en el Ejemplo 27) con 1 µg de ARN de levadura *Torulla* (Ambion, Estados Unidos), sonda de captura cP5_hsa-let-7a 100 fmol (EQ17367, Tabla VII), 1 µl de tampón NEB 2 10 x (New England Biolabs, Estados Unidos), 1 µl de mezcla de dNTP (1 mM de cada dNTP; Applied Biosystems, Estados Unidos) y 5 U de Klenow exo- (New England Biolabs, Estados Unidos) en un volumen total de 10 µl. La incubación se realizó durante 30 min a 37°C.

2. La inmovilización en un tubo con estreptavidina

Se añadió un volumen de 2,5 µl de tampón de unión 5x (Tris-HCl 500 mM pH 7,5 a 20°C, LiCl 2 M, EDTA 100 mM) a la reacción de Klenow exo- y la mezcla se transfirió al fondo de un tubo de PCR revestido con estreptavidina (Roche, Alemania). La incubación se realizó durante 3 min a 37°C para permitir que se produjera la unión de biotina-estreptavidina. El material no unido se eliminó por lavado cinco veces en 100 µl de tampón de lavado (Tris-HCl 10 mM pH 7,5 a 20°C, LiCl 20 mM) a temperatura ambiente. El tubo de lavado se sometió inmediatamente a la reacción de transcripción inversa.

3. La reacción de RT en solución

El cebador de RT (1 µl 100 fmol/µl, EQ17374, Tabla VII) y 2,5 µl de dNTP (10 mM de cada dNTP, Applied Biosystems, Estados Unidos) se mezclaron en un volumen total de 12 µl y se añadieron al tubo de PCR con estreptavidina que contenía la sonda de captura inmovilizada y la cadena quimérica de ARN-ADN. El tubo se calentó 5 min a 70°C y el sobrenadante se retiró a un nuevo tubo en hielo. Se añadieron 4 µl de tampón de primera cadena 5x (Tris-HCl 250 mM pH 8,3 a 20°C, KCl 375 mM, $MgCl_2$ 15 mM; Invitrogen, Estados Unidos), 2 µl de DTT 100 mM (Invitrogen, Estados Unidos), 1 µl de SUPERase-In 20 U/µl (Ambion, Estados Unidos), y 1 µl de transcriptasa inversa Superscript II 200 U/µl (Invitrogen, Estados Unidos) y la incubación se continuó durante 1 h a 42°C. El calentamiento durante 15 min a 70°C terminó la reacción. El volumen total se ajustó a 100 µl por adición de 80 µl de H_2O con DEPC.

4. La PCR a tiempo real usando una sonda de detección modificada con LNA

La reacción (50 µl) era de Mezcla Maestra de PCR de Sonda QuantiTect 1x (Qiagen, Alemania), cebador de qPcR-D de hsa-let-7a 3 400 nM (EQ17372, Tabla VII), cebador de qPcR-I de hsa-let-7a 2 400 nM (EQ17375, Tabla VII), sonda de detección hsa-let-7a_qPcR-Sonda2_Q2 200 nM (EQ18089, Tabla VII), 5 µl de la reacción de síntesis de

primera cadena (RT) (descrita anteriormente) y 0,5 U de Uracilo ADN Glicosilasa (Invitrogen, Estados Unidos). El programa de ciclado de temperatura era de 10 min a 37°C, 15 min a 95°C, 1 min a 30°C, 1 min a 40°C, 1 min a 60°C, seguido de 40 ciclos de 20 s a 94°C y 1 min a 60°C. El análisis de RT-PCR a tiempo real se realizó en el instrumento de PCR a tiempo real Opticon (MJ Research, Estados Unidos).

5. Resultados

Se obtuvieron los valores de Ct siguientes (Tabla IX) por realización del ensayo resumido anteriormente sobre el miARN maduro hsa Let-7a y/o el pre-miARN hsa Let-7a:

Tabla IX

ARN aportado	Cantidad de ARN aportado	Valor de Ct
miARN hsa Let-7a	10 fmol	17,0
pre-miARN hsa Let-7a	10 fmol	28,9
miARN hsa Let-7a y pre-miARN hsa Let-7a	10 fmol cada	17,7
Sin miARN o	-	ninguno

Hay una diferencia en los valores de Ct de 11,8 (Δ Ct) entre el miARN hsa-let-7a maduro y precursor. Una Δ Ct de 11,8 corresponde a una sensibilidad 1000-10.000 veces mayor del ensayo para el miARN hsa-let-7a maduro sobre el precursor, lo que demuestra la capacidad del ensayo para discriminar entre las dos especies de miARN. Por consiguiente, se obtienen valores de Ct muy similares cuando se ensaya el miARN hsa-let-7a maduro en solitario o el miARN hsa-let-7a maduro más precursor presente en concentraciones equimolares. No se obtiene señal ni valor de Ct cuando el ensayo se realiza sin adición de miARN. Se obtenía escasa o ninguna señal en la qPCR cuando no se añadía reacción de RT o cuando el molde consistía en el molde oligonucleotídico usado para la transcripción *in vitro* del miARN hsa-let-7a precursor (no se muestra el resultado). Asimismo, se obtuvo una escasa o ninguna señal cuando el molde añadido a la qPCR consistía en la RT realizada como se ha resumido anteriormente pero usando el miARN hsa-let-7a precursor como molde, es decir, omitiendo la etapa de reacción de extensión cebada con microARN (no se muestra el resultado).

Ejemplo 29

RT-PCR a tiempo real para la detección selectiva del hsa-let-7a frente a los miARN estrechamente relacionados has-let-7f y hsa-let-7g usando: reacción de extensión cebada con microARN en una sonda de captura modificada con LNA marcada con 5'-biotina y bloqueada en 3', inmovilización del producto de extensión en un tubo con estreptavidina, reacción de transcriptasa inversa en solución y PCR a tiempo real usando una sonda de detección modificada con LNA con inactivador Q2.

1. La reacción de extensión cebada con microARN en una sonda de captura modificada con LNA marcada con 5'-biotina y bloqueada en 3'

Se mezclaron 10 fmol de miARN hsa Let-7a, miARN hsa Let-7f o miARN hsa Let-7g (EQ16898, EQ16899 y EQ16917, respectivamente - Tabla VII) con 1 µg de ARN de levadura *Torulla* (Ambion, Estados Unidos), sonda de captura cP5_hsa-let-7a 100 fmol (EQ17367, Tabla VII) 1 µl de tampón NEB 2 10x (New England Biolabs, Estados Unidos), 1 µl de mezcla de dNTP (1 mM de cada dNTP; Applied Biosystems, Estados Unidos) y 5 U de Klenow exo- (New England Biolabs, Estados Unidos) en un volumen total de 10 µl. La incubación se realizó durante 30 min a 37°C.

2. La inmovilización en un tubo con estreptavidina

Se añadió un volumen de 2,5 µl de tampón de unión 5 x (Tris-HCl 500 mM pH 7,5 a 20°C, LiCl 2 M, EDTA 100 mM) a la reacción de Klenow exo- y la mezcla se transfirió al fondo de un tubo de PCR revestido con estreptavidina (Roche, Alemania). La incubación se realizó durante 3 min a 37°C para permitir que se produjera la unión de biotina-estreptavidina. El material no unido se eliminó por lavado cinco veces en 100 µl de tampón de lavado (Tris-HCl 10 mM pH 7,5 a 20°C, LiCl 20 mM) a temperatura ambiente. El tubo lavado se sometió inmediatamente a la reacción de transcripción inversa.

3. La reacción de RT en solución

El cebador de RT (1 µl 100 fmol/µl, EQ17374, Tabla VII) y 2,5 µl de dNTP (10 mM de cada dNTP, Applied Biosystems, Estados Unidos) se mezclaron en un volumen total de 12 µl y se añadieron al tubo de PCR con estreptavidina que contenía la sonda de captura inmovilizada y la cadena quimérica de ARN-ADN. El tubo se calentó 5 min a 70°C y el sobrenadante se retiró a un nuevo tubo en hielo. Se añadieron 4 µl de tampón de primera cadena

5x (Tris-HCl 250 mM pH 8,3 a 20°C, KCl 375 mM, MgCl₂ 15 mM; Invitrogen, Estados Unidos), 2 µl de DTT 100 mM (Invitrogen, Estados Unidos), 1 µl de SUPERase-In 20 U/µl (Ambion, Estados Unidos) y 1 µl de transcriptasa inversa Superscript II 200 U/µl (Invitrogen, Estados Unidos) y la incubación se continuó durante 1 h a 42°C. El calentamiento durante 15 min a 70°C terminó la reacción. El volumen total se ajustó a 100 µl por adición de 80 µl de H₂O con DEPC.

4. La PCR a tiempo real usando una sonda de detección modificada con LNA

La reacción (50 µl) era de Mezcla Maestra de PCR de Sonda QuantiTect 1x (Qiagen, Alemania), cebador de qPCR-D de hsa-let-7a 3 400 nM (EQ17372, Tabla VII), cebador de qPCR-I de hsa-let-7a 2 400 nM (EQ17375, Tabla VII), sonda de detección hsa-let-7a_qPCR-Sonda2_Q2 200 nM (EQ18089, Tabla VII), 5 µl de la reacción de síntesis de primera cadena (RT) (descrita anteriormente) y 0,5 U de Uracilo ADN Glicosilasa (Invitrogen, Estados Unidos). El programa de ciclado de temperatura era: 10 min a 37°C, 15 min a 95°C, 1 min a 30°C, 1 min a 40°C, 1 min a 60°C, seguido de 40 ciclos de 20 s a 94°C y 1 min a 60°C. El análisis de RT-PCR a tiempo real se realizó en el instrumento de PCR a tiempo real Opticon (MJ Research, Estados Unidos).

5. Resultados.

Se obtuvo un valor de Ct de 20,4 en el ensayo de miARN hsa Let-7a usando el miARN hsa Let-7a como molde. No se generó señal y no se obtuvo valor de Ct en los ensayos en los que se usó miARN hsa Let-7f y miARN hsa Let-7g como molde. Asimismo, no se obtuvo señal ni valor de Ct a partir de ensayos en los que no se añadió miARN o a partir de qPCR en las que no se añadió RT como molde. Esto indica que el ensayo está detectando de forma discriminatoria el miARN hsa-let-7a y no los homólogos de miARN próximos miARN hsa Let-7f y miARN hsa Let-7g, en los que la única diferencia entre los miARN let-7a y hsa Let-7f es un solo cambio de nucleótido de G a A.

Ejemplo 30

Cuantificación de RT-PCR a tiempo real de hsa-mir-143 usando extensión de dos etapas de una sonda de captura/RT usando como primer molde el microARN investigado y como segundo molde un oligonucleótido auxiliar artificial, seguido de cuantificación por PCR a tiempo real mediante amplificación de la sonda de captura 4RT totalmente extendida usando una sonda de detección doblemente marcada modificada con LNA.

Cuando el miARN se localiza en la cadena inferior de la molécula de tallo-bucle, el procesamiento por la enzima Dicer da como resultado un extremo 5' único del miR maduro, mientras que el extremo 3' es idéntico para el pre-miR y el miR maduro.

El ejemplo sigue el trazado de ensayo de la Fig. 31.

Las dos reacciones de extensión de sonda de captura/RT tienen lugar en la misma mezcla de reacción usando una "mezcla de RT/PCR One Step". La mezcla de reacción contiene por lo tanto microARN, sonda de captura/RT, transcriptasa inversa, molde auxiliar artificial 3'-fosforilado y 5'-biotinilado y Taq polimerasa.

Posterior a la extensión de sonda de captura/RT de dos etapas, se usa entonces una alícuota de esta mezcla de reacción como aportación en una reacción de cuantificación por PCR a tiempo real.

1. La mezcla de la reacción de extensión de sonda de captura/RT de 2 etapas

En una mezcla de reacción con un volumen total de 25 µl se mezcló lo siguiente: microARN hsa-mir-143 (1 fmol; EQ16900, Tabla X), 1 µg de ARN de levadura *Torulla* (Ambion, Estados Unidos), hsa-Rim-143_CP5_NoBio (125 fmol; EQ18080, Tabla X), hsa-Rim-143_AT_Bio (6,25 pmol; EQ18079, Tabla X), mezcla de dNTP (conc. final 0,2 mM de cada dNTP; Applied Biosystems, Estados Unidos), tampón de RT-PCR OneStep de Qiagen 1x (Qiagen, Alemania), Mezcla Enzimática de RT-PCR OneStep de Qiagen 1x y agua tratada con DEPC (Ambion, Estados Unidos).

Se realizó un control "sin miR" en el que se omitió el microARN (hsa-mir-143, Tabla X).

Las mezclas de reacción se sometieron al programa de ciclado de temperatura siguiente usando un termociclador DNA Engine Dyad (MJ Research, Estados Unidos):

Transcripción inversa: 60°C durante 30 min

Activación de Taq: 95°C durante 15 min

Extensión de sonda de captura: 10 ciclos de (95°C durante 20 s + 60°C durante 30 s)

Enfriamiento: 4°C.

Las mezclas de reacción se diluyeron con 75 µl de agua tratada con DEPC (Ambion, Estados Unidos) inmediatamente antes del procesamiento adicional.

2. Eliminación de oligonucleótido auxiliar artificial de la mezcla de reacción por unión a estreptavidina.

- 5 Se mezcló una alícuota de 20 µl de cada una de las mezclas de reacción de la etapa 1 anterior con 1 µl de Estreptavidina Inmovilizada ImmunoPure® (Pierce), se agitó vorticialmente y se incubó a 37°C durante 5 min y se centrifugó a través de una columna de centrifugación (Harvard Apparatus).

3. Cuantificación por PCR a tiempo real usando una sonda de detección doblemente marcada modificada con LNA

- 10 En una mezcla de reacción con un volumen total de 25 µl se mezcló lo siguiente: hsa-Rim-143_Cebador2 (Conc. final 0,5 µM, EQ17724, Tabla X), hsa-miR-143_Cebador143_C2 (Conc. final 0,5 µM, EQ17574, Tabla X), hsa-Rim-143_P4 (Conc. final 0,25 µM, EQ18057, Tabla X), Mezcla Maestra de PCR Universal TaqMan® 1 x (Applied Biosystems, Estados Unidos), 2,5 µl de la mezcla de reacción diluida de la etapa 1 o de la etapa 2 anterior y agua tratada con DEPC.

Las mezclas de reacción se sometieron al programa de ciclado de temperatura siguiente usando un Sistema de PCR a Tiempo Real ABI 7500 (Applied Biosystems, Estados Unidos):

- 15 Activación de Taq: 95°C durante 15 min
Amplificación por PCR: 40 ciclos de (95°C durante 20 s + 60°C durante 30 s)

Los resultados para las reacciones descritas eran un valor de Ct de 37 para la muestra que contenía microARN sin purificación en la etapa 2 y un valor de Ct de 36 para la muestra correspondiente que incluía purificación en la etapa 2. Ninguno de los dos controles "sin miR" correspondientes dio ningún valor de Ct en los 40 ciclos. Véase la Fig. 32.

20 **Tabla X: Oligonucleótidos usados en Ejemplo Rim**

EQ N°:	Nombre de Oligo:	5'	Secuencia (5'-3') ^a	3'
16900	hsa-mir-143		ugagaugaagcacuguagcuca	
18080	hsa-Rim-143 CP5 NoBio		ctgatagagctttgctgcactgattGagmCtamCagt	
18079	hsa-Rim-143 AT Bio	Bio	tgaatccgaatctaacgttgcttaggctgagatgaagcact	P
7724	hsa-Rim-143 Cebador'1		tgaatccgaatctaacgttgc	
17574	hsa-miR-143 Cebador143 C2		ctgatagagctttgctgcca	
18057	hsa-Rim-143 P4	6-FITC	aGmCTAmCAGT#Q2z	P

^aLNA (mayúsculas), ADN (minúsculas), Fluoresceína (6-FITC (Glenn Research, N° Id. Prod. 10-1964)), biotina (Bio (Glenn Research)), dos restos de hexaetilenglicol (HEG2 (Glenn Research)), #Q2 (Preparado como se ha descrito en el Ejemplo 8b), z (5-nitroindol (Glenn Research, N° Id. Prod. 10-1044)), Fosfato (P).

Ejemplo 31

RT-PCR a tiempo real para la detección selectiva del hsa-let-7a frente al hsa-Let-7g estrechamente relacionado usando: ligación de un adaptador de ARN a microARN maduro seguida de transcripción inversa y PCR a tiempo real usando una sonda de detección modificada con LNA con el inactivador Q2.

- 25 El procedimiento empleado en este ejemplo se representa en general en la Fig. 36.

1. La ligación de un adaptador de ARN al microARN maduro.

- 30 Se mezclaron diez fmol de miARN hsa Let-7a o miARN hsa Let-7g (EQ16898 y EQ16917, respectivamente - Tabla VII) con 20 fmol de Adaptador de ARN (EQ18557 - Tabla XI) y 40 U de ARN Ligasa de T4 (New England Biolabs, Estados Unidos) en un volumen total de 20 µl que consistía en Tampón de ARN Ligasa de T4 1x (Tris-HCl 50 mM pH 7,8 a 25°C, MgCl₂ 10 mM, ATP 1 mM y ditiotretol 10 mM). La ligación se realizó por incubación durante 15 min a 37°C. El calentamiento durante 15 min a 65°C terminó la reacción.

2. La reacción de RT

- 35 La reacción de transcripción inversa se realizó en 50 µl que consistían en cebador de RT 2 µM (EQ17374, Tabla VII) y 500 µM de cada dNTP (Applied Biosystems, Estados Unidos), tampón de primera cadena 1x (Tris-HCl 50 mM pH 8,3 a 20°C, KCl 75 mM, MgCl₂ 3 mM; Invitrogen, Estados Unidos), DTT 10 mM (Invitrogen, Estados Unidos), 60 U de SUPERase-In (Ambion, Estados Unidos), 500 U de transcriptasa inversa Superscript II (Invitrogen, Estados Unidos)

y 20 µl de la mezcla de ligación descrita anteriormente. La reacción de transcripción inversa se realizó durante 1 h a 42°C. El calentamiento durante 15 min a 70°C terminó la reacción.

4. La PCR a tiempo real usando una sonda de detección modificada con LNA

La reacción (50 µl) era de tampón de PCR 1x (Qiagen, Alemania), MgCl₂ a una concentración final de 4 mM, 0,2 mM de cada de dATP, dCTP, dGTP y 0,6 mM de dUTP (Applied Biosystems, Estados Unidos), cebador de qPcR-D de hsa-let-7a 3 900 nM (EQ17372, Tabla VII), cebador de qPcR-I de hsa-let-7a 2 900 nM (EQ17375, Tabla VII), sonda de detección hsa-let-7a_qPcR-Sonda2_Q2 250 nM (EQ18089, Tabla VII), colorante de referencia ROX 0,1x (Invitrogen, Estados Unidos), 2,5 µl de la reacción de síntesis de primera cadena (RT) (descrita anteriormente), 0,5 U de Uracilo ADN Glicosilasa (Invitrogen, Estados Unidos) y 2,5 U de ADN polimerasa HotStarTaq (Qiagen, Alemania). El programa de ciclado de temperatura era; 10 min a 37°C, 10 min a 95°C, seguido de 40 ciclos de 20 s a 95°C y 1 min a 60°C. El análisis de RT-PCR a tiempo real se procesó en un Sistema de PCR a Tiempo Real ABI 7500 (Applied Biosystems, Estados Unidos).

5. Resultados

Se obtuvo un valor de Ct de 27,1 en el ensayo de miARN hsa Let-7a usando el miARN hsa Let-7a como molde (Fig. 35). No se generó señal ni se obtuvo valor de Ct en los ensayos en los que se usó miARN de hsa Let-7g como molde. Asimismo, no se obtuvo señal ni valor de Ct a partir de ensayos en los que no se añadió miARN o a partir de qPCR en las que no se añadió RT como molde. Indicando que el ensayo está detectando de forma discriminatoria el miARN hsa-let-7a y no el homólogo de miARN próximo hsa Let-7g.

Tabla XI: Oligonucleótido usado en la Ligación.

EQ N°:	Nombre de Oligo:	5'	Secuencia (5'-3') ^a	3'
18557	Adaptador de ARN	P	acucauccuacucauccu	P
ARN (cursiva y minúsculas) y Fosfato (P).				

20 Ejemplo 32

RT-PCR a tiempo real para la detección selectiva del hsa-let-7a frente al miARN estrechamente relacionado hsa-Let-7g usando ligación de oligonucleótido de ARN con microARN maduro usando una secuencia de ácido nucleico de "formación de puente" (Oligonucleótido Auxiliar de Ligación), seguido de transcripción inversa y PCR a tiempo real usando una sonda de detección modificada con LNA con inactivador Q2.

Lo siguiente es un ejemplo de cómo puede realizarse la ligación asistida por oligonucleótido auxiliar de ligación y la posterior transcripción inversa y qPCR para detectar el microARN maduro hsa-let-7a.

1. La ligación de Oligonucleótido de Ligación de ARN con el microARN maduro.

Mezclar 10 fmol de miARN hsa Let-7a o miARN hsa Let-7g (EQ16898 y EQ16917, respectivamente - Tabla VII) con 100 fmol de Oligonucleótido de Ligación y 100 fmol de Oligonucleótido Auxiliar de Ligación (EQ18557 y EQ18565, respectivamente - Tabla XII) y 400 U de ADN Ligasa de T4 (New England Biolabs, Estados Unidos) en un volumen total de 20 µl que consistía en tampón de reacción de ADN ligasa de T4 1x (Tris-HCl 50 mM pH 7,5 a 25°C, MgCl₂ 10 mM, ATP 1 mM, ditiotritol 10 mM, BSA 25 µg/ml). Realizar la ligación por incubación durante 30 min a temperatura ambiente. Calentar durante 10 min a 65°C para terminar la reacción.

2. La reacción de RT

Añadir 1 µl de cebador de RT (100 fmol/µl, EQ17374, Tabla VII) y 2 µl de dNTP (10 mM de cada dNTP - Applied Biosystems, Estados Unidos) junto con 1 µl de tampón de primera cadena 5x (Tris-HCl 250 mM pH 8,3 a 20°C, KCl 375 mM, MgCl₂ 15 mM; Invitrogen, Estados Unidos), 1 µl de SUPERase-In 20 U/µl (Ambion, Estados Unidos) y 1 µl de transcriptasa inversa Superscript II 200 U/µl (Invitrogen, Estados Unidos). Realizar la reacción de transcripción inversa durante 1 h a 42°C. Calentar durante 15 min a 70°C para terminar la reacción. Ajustar el volumen total a 100 µl por adición de 74 µl de H₂O con DEPC.

3. La PCR a tiempo real usando una sonda de detección modificada con LNA

Preparar una reacción de PCR a tiempo real (50 µl) con Mezcla Maestra de PCR de Sonda QuantiTect 1x (Qiagen, Alemania), cebador de qPcR-D de hsa-let-7a 3 400 nM (EQ17372, Tabla VII), cebador de qPcR-I de hsa-let-7a 2 400 nM (EQ17375, Tabla VII), sonda de detección hsa-let-7a_qPcR-Sonda2_Q2 200 nM (EQ18089, Tabla VII), 5 µl de la reacción de síntesis de primera cadena (RT) (descrita anteriormente) y 0,5 U de Uracilo ADN Glicosilasa (Invitrogen, Estados Unidos). Uso del programa de ciclado de temperatura siguiente: 10 min a 37°C, 15 min a 95°C, 1 min a 30°C, 1 min a 40°C, 1 min a 60°C, seguido de 40 ciclos de 20 s a 94°C y 1 min a 60°C. El análisis de RT-PCR a

tiempo real puede realizarse en el instrumento de PCR a tiempo real Opticon (MJ Research, Estados Unidos).

Tabla XII: Oligonucleótidos usados en la ligación.

EQ N°:	Nombre de Oligo:	5'	Secuencia (5'-3')a	3'
18557	Oligo de ligación de hsa-let-7	P	<i>acucauccuaccauccu</i>	P
18565	Auxiliar de ligación de hsa-let-7a		<i>ggatgagtaactatac</i>	P

También se describen en el presente documento las siguientes “realizaciones de elementos”, en las que el término “elemento” se refiere a un elemento anterior con el número especificado.

- 5 1. Un procedimiento de cuantificación de una secuencia de nucleótidos diana en una muestra de ácido nucleico, que comprende:
 - 10 a) poner en contacto la secuencia de nucleótidos diana con dos sondas de etiquetado oligonucleotídicas, consistiendo cada una en una secuencia de nucleótidos de anclaje y una secuencia de nucleótidos de reconocimiento, en el que dicha secuencia de nucleótidos de reconocimiento es complementaria a la secuencia diana, y en el que la secuencia de reconocimiento de la primera sonda de etiquetado hibrida con una primera región de la secuencia diana y la segunda secuencia de reconocimiento de la segunda sonda de etiquetado hibrida con una segunda región de la secuencia diana adyacente a la primera región de la secuencia diana;
 - 15 b) unir las dos secuencias de reconocimiento adyacentes de las sondas de etiquetado hibridadas covalentemente por ligación para formar una secuencia de nucleótidos contigua, que comprende una secuencia complementaria a la secuencia de nucleótidos diana y las dos secuencias de nucleótidos de anclaje y
 - c) cuantificar las moléculas oligonucleotídicas ligadas por PCR a tiempo real usando cebadores correspondientes a las secuencias de nucleótidos de anclaje y una sonda de detección marcada que comprende una secuencia de reconocimiento diana y un resto de detección.
- 20 2. Un procedimiento del elemento 1, en el que las secuencias de nucleótidos de reconocimiento en las sondas de etiquetado y la sonda de detección están modificadas con análogos de nucleótidos de alta afinidad.
3. Un procedimiento del elemento 1 al 2, en el que el análogo de nucleótido de alta afinidad es LNA.
- 25 4. Un procedimiento del elemento 1 al 3, en el que la secuencia de nucleótidos de reconocimiento en la sonda de etiquetado 5'-fosforilada está modificada con un LNA en cada segunda, tercera o cuarta posición partiendo de un LNA en la posición de nucleótido próxima a la posición de nucleótido 5', y en el que la secuencia de nucleótidos de reconocimiento en la segunda sonda de etiquetado está modificada con un LNA en cada segunda, tercera o cuarta posición, terminando en la posición de nucleótido anterior a la posición de nucleótido 3'.
- 30 5. Un procedimiento del elemento 4, en el que la secuencia de nucleótidos de reconocimiento en la sonda de etiquetado 5'-fosforilada está modificada con un LNA en cada tercera posición partiendo de un LNA en la posición de nucleótido próxima a la posición de nucleótido 5', y en el que la secuencia de nucleótidos de reconocimiento en la segunda sonda de etiquetado está modificada con un LNA en cada tercera posición, terminando en la posición de nucleótido anterior a la posición de nucleótido 3'.
- 35 6. Un procedimiento del elemento 1 al 5, en el que las secuencias de nucleótidos de anclaje en las sondas de etiquetado son secuencias de ADN.
7. Un procedimiento del elemento 1 al 5, en el que las secuencias de nucleótidos de anclaje en las sondas de etiquetado están modificadas con análogos de nucleótidos de alta afinidad.
8. Un procedimiento del elemento 7, en el que las secuencias de nucleótidos de anclaje en las sondas de etiquetado están modificadas con LNA.
- 40 9. Un procedimiento del elemento 1 al 8, en el que las secuencias de nucleótidos de reconocimiento en las sondas de etiquetado son de menos de aproximadamente 20 nucleótidos de longitud y, más preferentemente, de menos de 15 nucleótidos y, más preferentemente, de entre 10 y 14 nucleótidos.
10. Un procedimiento del elemento 1 al 9, en el que las secuencias de nucleótidos de anclaje en las sondas de etiquetado son de menos de aproximadamente 30 nucleótidos de longitud y, más preferentemente, de menos de 27 nucleótidos y, más preferentemente, de entre 15 y 25 nucleótidos.
- 45 11. Un procedimiento del elemento 1 al 10, en el que la secuencia de reconocimiento en la sonda de detección está modificada con análogos de nucleótidos de alta afinidad.

12. Un procedimiento del elemento 11, en el que el análogo de nucleótido de alta afinidad es LNA.
13. Un procedimiento del elemento 12, en el que la longitud de la sonda de detección es inferior a aproximadamente 20 nucleótidos y, más preferentemente, inferior a 15 nucleótidos y, más preferentemente, de entre 8 y 12 nucleótidos.
- 5 14. Un procedimiento del elemento 13, en el que la sonda de detección comprende una secuencia de LNA que contiene un nucleótido de ADN en el extremo 5' y un grupo fosfato en el extremo 3'.
15. Un procedimiento del elemento 14, en el que la sonda de detección se sustituye con al menos un resto químico.
16. Un procedimiento del elemento 15, en el que la sonda de detección contiene una pareja de fluoróforo-inactivador.
- 10 17. Un procedimiento del elemento 1 al 16, en el que la sonda de detección se detecta usando un marcador doble por el principio de ensayo de nucleasa 5'.
18. Un procedimiento del elemento 1 al 16, en el que la sonda de detección se detecta mediante el principio de baliza molecular.
- 15 19. Un procedimiento de uno cualquiera de los elementos 1 al 18, en el que las sondas de etiquetado se ligan usando una ADN ligasa de T4.
20. Un procedimiento de uno cualquiera de los elementos 1 al 18, en el que las sondas de etiquetado se ligan usando una ADN ligasa termoestable.
21. Un procedimiento de uno cualquiera de los elementos 1 al 18, en el que las sondas de etiquetado se ligan usando una ARN ligasa.
- 20 22. Un procedimiento de uno cualquiera de los elementos 1 al 18, en el que las sondas de etiquetado se ligan usando una ARN ligasa termoestable.
23. Un procedimiento del elemento 20 ó 22, en el que la reacción de ligación es un ciclo repetido entre desnaturalización y apareamiento y unión de sondas de etiquetado, produciendo una pluralidad de moléculas oligonucleotídicas ligadas.
- 25 24. Un procedimiento de uno cualquiera de los elementos 1 al 23, en el que una de las sondas de etiquetado está marcada con un ligando.
25. Un procedimiento del elemento 24, en el que las moléculas ligadas se purifican utilizando una interacción de ligando-molécula de captura.
- 30 25. Un procedimiento del elemento 24 al 25, en el que el ligando es biotina, y en el que la interacción de ligando-molécula de captura es biotina-avidina o biotina-estreptavidina.
27. Un procedimiento de uno cualquiera de los elementos 1 al 26, en el que la secuencia de nucleótidos diana es una secuencia de ARN.
28. Un procedimiento de uno cualquiera de los elementos 1 al 26, en el que la secuencia de nucleótidos diana es una secuencia de microARN.
- 35 29. Un procedimiento del elemento 28, en el que la secuencia de nucleótidos diana es una secuencia de microARN maduro.
30. Un procedimiento de uno cualquiera de los elementos 1 al 26, en el que la secuencia de nucleótidos diana es un ARNip o una secuencia de ARN editado.
- 40 31. Un procedimiento de uno cualquiera de los elementos 1 al 26, en el que la secuencia de nucleótidos diana es una secuencia de variante de corte y empalme alternativo.
32. Un procedimiento de uno cualquiera de los elementos 1 al 26, en el que la secuencia de nucleótidos diana es una secuencia de ARN no codificante o antisentido o una secuencia de ARN que contiene un polimorfismo de un solo nucleótido o una mutación puntual.
- 45 33. Un procedimiento de uno cualquiera de los elementos 1 al 26, en el que la secuencia de nucleótidos diana es una secuencia de ADN.
34. Un procedimiento de uno cualquiera de los elementos 1 al 26, en el que la secuencia de nucleótidos diana es una secuencia de ADN que contiene un polimorfismo de un solo nucleótido o una mutación puntual.

35. Un procedimiento de los elementos 1 al 34, en el que la secuencia de nucleótidos diana es una secuencia humana.
36. Un procedimiento del elemento 35, en el que la secuencia de nucleótidos diana está implicada en una enfermedad o es útil para el diagnóstico de una enfermedad, por ejemplo, cáncer.
- 5 37. Una biblioteca de sondas de etiquetado y sondas de detección de uno cualquiera de los elementos 1 al 36, para la detección o cuantificación de microARN.
38. Una biblioteca de sondas del elemento 37 para la detección y cuantificación de microARN de plantas o mamíferos.
39. Una biblioteca de sondas del elemento 37 para la detección y cuantificación de microARN humanos o animales.
- 10 40. Una biblioteca de sondas de etiquetado y sondas de detección de uno cualquiera de los elementos 1 al 36, para la detección o cuantificación de ARN antisentido, ARN no codificantes o ARNip.
41. Una biblioteca de sondas de etiquetado y sondas de detección de uno cualquiera de los elementos 1 al 36, para la detección o cuantificación de transcritos de ARN editado.
- 15 42. Una biblioteca de sondas de etiquetado y sondas de detección de uno cualquiera de los elementos 1 a 36, para la detección o cuantificación de variantes de corte y empalme alternativo.
43. Un kit de uno cualquiera de los elementos 37 a 42.
44. Un procedimiento de cuantificación de una secuencia de ácido ribonucleico diana en una muestra de ácido nucleico, que comprende:
- 20 a) poner en contacto la secuencia de ácido ribonucleico diana con una sonda de etiquetado oligonucleotídica, que consiste en una secuencia de nucleótidos de anclaje y una secuencia de nucleótidos de reconocimiento, en el que dicha secuencia de nucleótidos de reconocimiento es complementaria a una secuencia en la secuencia de ácido ribonucleico diana;
- b) síntesis de una cadena complementaria al ácido ribonucleico diana por transcripción inversa usando una enzima transcriptasa inversa y la sonda de etiquetado oligonucleotídica como cebador,
- 25 c) sustitución de la secuencia de ácido ribonucleico en el heterodúplex por síntesis de una segunda cadena usando una ADN polimerasa y una segunda sonda de etiquetado como cebador, en el que dicha segunda sonda de etiquetado consiste en una secuencia de nucleótidos de anclaje y una secuencia de nucleótidos de reconocimiento, en el que dicha secuencia de nucleótidos de reconocimiento es complementaria a una secuencia en la secuencia de ácido nucleico extendida con transcriptasa inversa,
- 30 d) cuantificar los ácidos nucleicos resultantes mediante PCR a tiempo real usando los cebadores correspondientes a las secuencias de nucleótidos de anclaje unidas a las sondas de etiquetado oligonucleotídicas y una sonda de detección marcada que comprende una secuencia de reconocimiento diana y un resto de detección.
45. Un procedimiento del elemento 44, en el que las secuencias de nucleótidos de reconocimiento en las sondas de etiquetado y la sonda de detección están modificadas con análogos de nucleótidos de alta afinidad.
- 35 46. Un procedimiento del elemento 44, en el que la secuencia de nucleótidos de reconocimiento complementaria a una secuencia en el ácido ribonucleico diana en la primera sonda de etiquetado y la sonda de detección está modificada con análogos de nucleótidos de alta afinidad, y la secuencia de reconocimiento en la segunda sonda de etiquetado no está modificada.
- 40 47. Un procedimiento del elemento 44, en el que las secuencias de reconocimiento en las sondas de etiquetado no están modificadas y la sonda de detección está modificada con análogos de nucleótidos de alta afinidad.
48. Un procedimiento del elemento 44 al 47, en el que el análogo de nucleótidos de alta afinidad es LNA.
48. Un procedimiento del elemento 44 al 48, en el que las secuencias de reconocimiento en las sondas de etiquetado están modificadas con un LNA en cada segunda, tercera o cuarta posición con al menos un nucleótido de ADN en el extremo 3' de la secuencia de reconocimiento.
- 45 49. Un procedimiento del elemento 48, en el que las secuencias de reconocimiento en las sondas de etiquetado están modificadas con un LNA en cada tercera posición partiendo y terminando con al menos un nucleótido de ADN en el extremo 3' de la secuencia de reconocimiento.
50. Un procedimiento del elemento 44 al 49, en el que las secuencias de nucleótidos de anclaje en las sondas de etiquetado son secuencias de ADN.
- 50

51. Un procedimiento del elemento 44 al 50, en el que las secuencias de nucleótidos de anclaje en las sondas de etiquetado están modificadas con análogos de nucleótidos de alta afinidad.
52. Un procedimiento del elemento 51, en el que las secuencias de nucleótidos de anclaje en las sondas de etiquetado están modificadas con LNA.
- 5 53. Un procedimiento del elemento 44 al 52, en el que las secuencias de reconocimiento en las sondas de etiquetado son de menos de aproximadamente 20 nucleótidos de longitud y, más preferentemente, de menos de 15 nucleótidos y, más preferentemente, de entre 6 y 14 nucleótidos.
54. Un procedimiento del elemento 44 al 53, en el que las secuencias de nucleótidos de anclaje en las sondas de etiquetado son de menos de aproximadamente 30 nucleótidos de longitud y, más preferentemente de menos de 27
10 nucleótidos y, más preferentemente, de entre 15 y 25 nucleótidos.
55. Un procedimiento del elemento 44 al 54, en el que la secuencia de reconocimiento en la sonda de detección está modificada con análogos de nucleótidos de alta afinidad.
56. Un procedimiento del elemento 55, en el que el análogo de nucleótidos de alta afinidad es LNA.
57. Un procedimiento del elemento 56, en el que LNA está opcionalmente modificado con nucleobases SBC, 2'-O-metilo, 2,6-diaminopurina, 2-tiouracilo, 2-tiotimidina, 5-nitroindol, bases universales o degeneradas, ácidos nucleicos intercalantes o agentes de unión a hendidura menor.
- 15 58. Un procedimiento del elemento 57, en el que al menos uno de los monómeros de LNA adenosina en la secuencia de reconocimiento está sustituido con LNA 2,6-diaminopurina.
59. Un procedimiento del elemento 58, en el que al menos uno de los monómeros de LNA está sustituido con LNA 2-tiotimidina.
- 20 60. Un procedimiento del elemento 59, en el que la longitud de la sonda de detección es inferior a aproximadamente 20 nucleótidos y, más preferentemente, inferior a 15 nucleótidos y, más preferentemente, de entre 7 y 12 nucleótidos.
61. Un procedimiento del elemento 59, en el que la sonda de detección comprende una secuencia de LNA que contiene un nucleótido de ADN en el extremo 5' y un grupo fosfato en el extremo 3'.
- 25 62. Un procedimiento del elemento 61, en el que la sonda de detección se sustituye con al menos un resto químico.
63. Un procedimiento del elemento 62, en el que la sonda de detección contiene una pareja de fluoróforo-inactivador.
64. Un procedimiento del elemento 44 al 63, en el que la sonda de detección se detecta usando un marcador doble
30 mediante el principio de ensayo de nucleasa 5'.
65. Un procedimiento del elemento 44 al 63, en el que la sonda de detección se detecta mediante el principio de baliza molecular.
66. Un procedimiento de uno cualquiera de los elementos 44 al 65, en el que la cadena complementaria al ácido ribonucleico diana se sintetiza usando una transcriptasa inversa termoestable.
- 35 67. Un procedimiento de uno cualquiera de los elementos 44 al 66, en el que la segunda cadena que sustituye a la secuencia de ácido ribonucleico diana en el heterodúplex se sintetiza usando un ADN polimerasa termoestable.
68. Un procedimiento de uno cualquiera de los elementos 44 a 67, en el que la sonda de etiquetado de segunda cadena está marcada con un ligando.
69. Un procedimiento del elemento 68, en el que las moléculas de segunda cadena se purifican utilizando una
40 interacción de ligando-molécula de captura.
70. Un procedimiento del elemento 68 al 69, en el que el ligando es biotina, y en el que la interacción de ligando-molécula de captura es biotina-avidina o biotina-estreptavidina.
71. Un procedimiento de uno cualquiera de los elementos 44 al 70, en el que la secuencia de ácido ribonucleico diana es una secuencia de microARN.
- 45 72. Un procedimiento del elemento 71, en el que la secuencia de ácido ribonucleico diana es una secuencia de microARN maduro.
73. Un procedimiento del elemento 72, en el que la secuencia de reconocimiento de la primera sonda de etiquetado es complementaria al extremo 3' del microARN maduro y la secuencia de reconocimiento de la segunda sonda de

etiquetado es complementaria al extremo 3' de la secuencia de nucleótidos extendida con transcriptasa inversa correspondiente al extremo 5' del microARN maduro.

74. Un procedimiento de uno cualquiera de los elementos 44 al 70, en el que la secuencia de ácido ribonucleico diana es un ARNip o una secuencia de ARN editado.

5 75. Un procedimiento de uno cualquiera de los elementos 44 al 70, en el que la secuencia de ácido ribonucleico diana es una secuencia de variante de corte y empalme alternativo.

76. Un procedimiento de uno cualquiera de los elementos 44 al 70, en el que la secuencia de ácido ribonucleico diana es una secuencia de ARN no codificante o antisentido o una secuencia de ARN que contiene un polimorfismo de un solo nucleótido o una mutación puntual.

10 77. Un procedimiento de uno cualquiera de los elementos 74 al 76, en el que la secuencia de reconocimiento de la primera sonda de etiquetado es complementaria al extremo 3' del ARNip maduro o a una secuencia localizada 3' al nucleótido de ARN editado, unión de corte y empalme, polimorfismo de un solo nucleótido o mutación puntual, y la secuencia de reconocimiento de la segunda sonda de etiquetado es complementaria a la secuencia de nucleótidos extendida con transcriptasa inversa correspondiente al extremo 5' del ARNip o localizada 5' al nucleótido de ARN editado, unión de corte y empalme, polimorfismo de un solo nucleótido o mutación puntual en la secuencia diana de ácido ribonucleico.

15 78. Un procedimiento de los elementos 44 al 77, en el que la secuencia de ácido ribonucleico diana es una secuencia humana.

20 79. Un procedimiento del elemento 78, en el que la secuencia de ácido ribonucleico diana está implicada en una enfermedad o es útil para el diagnóstico de una enfermedad, por ejemplo, cáncer.

80. Una biblioteca de sondas de etiquetado y sondas de detección de uno cualquiera de los elementos 44 al 79, para la detección o cuantificación de microARN.

81. Una biblioteca de sondas del elemento 80 para la detección y cuantificación de microARN de plantas o mamíferos.

25 82. Una biblioteca de sondas del elemento 80 para la detección y cuantificación de microARN humanos o animales.

83. Una biblioteca de sondas de etiquetado y sondas de detección de uno cualquiera de los elementos 44 al 79, para la detección o cuantificación de ARN antisentido, ARN no codificantes, ARNip, transcritos de ARN editado o variantes de corte y empalme alternativo.

84. Un kit de uno cualquiera de los elementos 80 a 83.

30

REIVINDICACIONES

1. Un procedimiento para la determinación cuantitativa de un ARN de longitud corta, que tiene una longitud de como mucho 100 nucleótidos, que comprende

- a) preparar, a partir de una muestra que comprende dicho ARN de longitud corta, un polinucleótido de molde que consiste en 1) una secuencia diana monocatenaria que consiste en la secuencia de dicho ARN de longitud corta, su secuencia de ADN correspondiente o una secuencia de nucleótidos complementaria a la secuencia de dicho ARN de longitud corta y 2) una secuencia de nucleótidos adyacente 5' y/o 3', donde dicha secuencia de nucleótidos adyacente 5' y/o 3' es un polinucleótido que consiste en nucleótidos idénticos,
- b) usar dicho polinucleótido de molde en una transcripción inversa o una polimerización de nucleótidos para obtener una cadena de ADNc y
- c) realizar una PCR a tiempo real cuantitativa (qPCR) incluyendo como molde o moldes dicho ADNc y, opcionalmente, el polinucleótido de molde, en el que

1) los cebadores usados para qPCR en la etapa c se seleccionan de

- al menos 2 oligonucleótidos, en el que al menos uno de dichos oligonucleótidos corresponde a o es complementario a una secuencia en la secuencia de nucleótidos adyacente 5' o 3' y
- al menos 2 oligonucleótidos, en el que al menos uno de dichos oligonucleótidos corresponde a o es complementario a una secuencia contigua en el polinucleótido de molde constituida por parte de la secuencia diana monocatenaria y parte de la secuencia de nucleótidos 5' o 3' adyacente, o en el que

2) la reacción de la etapa (b) utiliza un cebador de transcripción inversa o un cebador de polimerización de ADN, que corresponde a o es complementario a una secuencia contigua en el polinucleótido de molde constituida por parte de la secuencia diana monocatenaria y parte de la secuencia de nucleótidos 5' o 3' adyacente.

2. El procedimiento de acuerdo con la reivindicación 1, en el que los cebadores usados para la qPCR en la etapa c se seleccionan de

- al menos 2 oligonucleótidos, en el que al menos uno de dichos oligonucleótidos corresponde a o es complementario a una secuencia en la secuencia de nucleótidos adyacente 5' o 3'
- al menos 2 oligonucleótidos, en el que al menos uno de dichos oligonucleótidos corresponde a o es complementario a una secuencia contigua en el polinucleótido de molde constituida por parte de la secuencia diana monocatenaria y parte de la secuencia de nucleótidos 5' o 3' adyacente, en
- al menos 2 oligonucleótidos, en el que uno corresponde a una primera secuencia de nucleótidos en la secuencia diana monocatenaria y el otro es complementario a una segunda secuencia de nucleótidos en la secuencia diana monocatenaria y

en el que dichos cebadores usados para la qPCR pueden incluir cada uno independientemente un marcador detectable.

3. El procedimiento de acuerdo con la reivindicación 1 ó 2, en el que la reacción en la etapa (b) utiliza un cebador de transcripción inversa o un cebador de polimerización de ADN que corresponde a o es complementario a la secuencia diana monocatenaria o que corresponde a o es complementario a una secuencia contigua en el polinucleótido de molde constituida por parte de la secuencia diana monocatenaria y parte de la secuencia de nucleótidos 5' o 3' adyacente.

4. El procedimiento de acuerdo con la reivindicación 3, en el que dicho cebador de transcripción inversa o cebador de polimerización de nucleótidos es específico para al menos un ARN de longitud corta.

5. El procedimiento de acuerdo con una cualquiera de las reivindicaciones 1-4, en el que la secuencia diana monocatenaria y la secuencia o secuencias de nucleótidos adyacentes 5' y/o 3' están unidas covalentemente.

6. El procedimiento de acuerdo con una cualquiera de las reivindicaciones 1-5, en el que la secuencia diana monocatenaria y la secuencia o secuencias de nucleótidos adyacentes 5' y/o 3' están unidas no covalentemente.

7. El procedimiento de acuerdo con una cualquiera de las reivindicaciones 1-6, en el que la secuencia de nucleótidos adyacente 5' y/o 3' incluye un marcador detectable.

8. El procedimiento de acuerdo con una cualquiera de las reivindicaciones 1-7, en el que la secuencia de nucleótidos adyacente 5' y/o 3' se une a la secuencia diana monocatenaria por una reacción enzimática.

9. El procedimiento de acuerdo con una cualquiera de las reivindicaciones 1-7, en el que la secuencia de nucleótidos adyacente 5' y/o 3' se une a la secuencia diana monocatenaria por una reacción no enzimática.

10. El procedimiento de acuerdo con una cualquiera de las reivindicaciones 1-9, en el que la secuencia de nucleótidos adyacente 5' y/o 3' no aparece de forma natural en el organismo del que procede el ARN de muestra.

11. El procedimiento de acuerdo con una cualquiera de las reivindicaciones 1-10, en que la secuencia de nucleótidos adyacente 5' y/o 3' no es de mamífero.
12. El procedimiento de acuerdo con una cualquiera de las reivindicaciones 1-11, en que la etapa (a) comprende la preparación del polinucleótido de molde por ligación de la secuencia de nucleótidos adyacente 5' y/o 3' con el ARN de longitud corta, o en el que la etapa (a) comprende la preparación del polinucleótido de molde por unión de la secuencia de nucleótidos adyacente 5' y/o 3' al ARN de longitud corta en una reacción de transferasa terminal, preferentemente en una reacción de transferasa de poli A.
13. El procedimiento de acuerdo con la reivindicación 12, en que la ligación se selecciona de ligación de salientes y ligación de extremos romos, preferentemente ligación de salientes.
14. El procedimiento de acuerdo con la reivindicación 13, que comprende aparear, con el ARN de longitud corta, un oligonucleótido en parte complementario al extremo reactivo con ligasa de la secuencia de nucleótidos adyacente 5' o 3' y en parte complementario con el extremo reactivo con ligasa de la molécula de ARN de longitud corta para situar el extremo reactivo con ligasa de la secuencia de nucleótidos adyacente 5' o 3' directamente adyacente al extremo reactivo con ligasa de la molécula de ARN pequeña para permitir la ligación de salientes.
15. El procedimiento de acuerdo con una cualquiera de las reivindicaciones 12-14, en el que todo el ARN en la muestra se somete a la ligación o a la reacción de transferasa terminal.
16. El procedimiento de acuerdo con una cualquiera de las reivindicaciones 12-15, en el que la ligación o la reacción de transferasa terminal se realiza solamente en el extremo 3' de la secuencia diana.
17. El procedimiento de acuerdo con una cualquiera de las reivindicaciones 12-15, en el que la ligación con el extremo 5' de la secuencia diana se realiza por fosforilación del extremo 5' de la secuencia diana antes de la reacción de ligación.
18. El procedimiento de una cualquiera de las reivindicaciones 12-17, en el que la secuencia de nucleótidos adyacente 5' se bloquea en su extremo 5' terminal y la secuencia de nucleótidos adyacente 3' se bloquea en su extremo 3' terminal antes de la ligación.
19. El procedimiento de acuerdo con una cualquiera de las reivindicaciones 1-18, en el que la secuencia de nucleótidos adyacente 5' y/o 3' se une preferentemente o exclusivamente a un estado de procesamiento definido de dicho ARN de longitud corta en la etapa (a).
20. El procedimiento de acuerdo con la reivindicación 19, en el que el estado de procesamiento definido de dicho ARN es el estado maduro.
21. El procedimiento de acuerdo con una cualquiera de las reivindicaciones 12-20, en el que la etapa (b) comprende una transcripción inversa del polinucleótido de molde para obtener el ADNc.
22. El procedimiento de acuerdo con una cualquiera de las reivindicaciones 1-8, en el que la etapa (a) comprende una etapa de polimerización de nucleótidos para unir las secuencias de nucleótidos adyacentes.
23. El procedimiento de acuerdo con la reivindicación 22, en el que la polimerización se consigue por medio de una polimerasa seleccionada del grupo que consiste en una polimerasa independiente de molde y dependiente de molde.
24. El procedimiento de acuerdo con la reivindicación 23, en el que la polimerasa es una ADN polimerasa.
25. El procedimiento de acuerdo con una cualquiera de las reivindicaciones, en el que la polimerización consiste en la adición de una cola de poli-A, poli-G, poli-T o poli-C al extremo 3' de la secuencia diana.
26. El procedimiento de acuerdo con la reivindicación 22-25, en el que la etapa (a) comprende la preparación del polinucleótido de molde mediante las etapas de
 - aparear el extremo 3' del ARN de longitud corta con una sonda de captura oligonucleotídica cuyo extremo 5' es complementario al extremo 3' del ARN de longitud corta, y
 - extender el ARN de longitud corta por polimerización de nucleótidos usando la sonda de captura de oligonucleotídica como molde para obtener una molécula de ARN de longitud corta extendida que constituye el polinucleótido de molde.
27. El procedimiento de acuerdo con la reivindicación 26, en el que la polimerización de nucleótidos comprende una polimerización de ADN para obtener un híbrido de ARN-ADN que constituye el polinucleótido de molde.
28. El procedimiento de acuerdo con la reivindicación 26 ó 27, en el que la etapa (b) comprende que (i) la cadena híbrida de ARN-ADN se someta a transcripción inversa para obtener el ADNc, opcionalmente después de la eliminación de material que no se aparee con la sonda de captura oligonucleotídica.

29. El procedimiento de acuerdo con la reivindicación 28, en el que el cebador en la transcripción inversa es la sonda de captura oligonucleotídica o un cebador de transcripción inversa separado.

30. El procedimiento de acuerdo con la reivindicación 22-25, en el que la etapa (a) comprende la preparación del polinucleótido de molde mediante las etapas de

- 5 - aparear el extremo 5' del ARN de longitud corta con una sonda de captura oligonucleotídica cuyo extremo 3' es complementario al 5' del ARN de longitud corta, y cuyo extremo 5' comprende la secuencia de nucleótidos adyacente 5' y
 - extender la sonda de captura por transcripción inversa usando ARN de longitud corta como molde para obtener una sonda de captura extendida que constituye el polinucleótido de molde.

- 10 31. El procedimiento de acuerdo con la reivindicación 30, en el que la etapa (b) comprende que el ARN de longitud corta se elimine de la sonda de captura extendida, se permita que la sonda de captura se aparee en su extremo 3' con un oligonucleótido auxiliar que comprende una secuencia de nucleótidos complementaria a la secuencia de nucleótidos adyacente 3', y la sonda de captura se alargue adicionalmente en la dirección 5' → 3' para obtener el ADNc por medio de polimerización de ADN usando el oligonucleótido auxiliar como molde.

- 15 32. El procedimiento de acuerdo con una cualquiera de las reivindicaciones 26-31, en el que el oligonucleótido de captura contiene un resto que permite la inmovilización sobre un soporte sólido.

33. El procedimiento de acuerdo con la reivindicación 32, en el que la sonda de captura se inmoviliza después del apareamiento para permitir la eliminación del material no apareante.

- 20 34. El procedimiento de acuerdo con una cualquiera de las reivindicaciones 1-33, en el que la muestra en la etapa (a) está enriquecida para ARN de longitud corta.

35. El procedimiento de acuerdo con una cualquiera de las reivindicaciones 1-34, en el que la etapa (c) comprende el uso de una sonda de detección que comprende nucleótidos modificados.

36. El procedimiento de acuerdo con la reivindicación 35, en el que los nucleótidos modificados son nucleótidos de LNA.

- 25 37. El procedimiento de acuerdo con la reivindicación 35, en el que el nucleótido de LNA se selecciona de nucleótidos de oxi-LNA, alfa-LNA y/o xilo LNA.

38. El procedimiento de acuerdo con la reivindicación 35 ó 36, en el que la sonda de detección corresponde a o es complementaria a una secuencia en el ARN de longitud corta.

- 30 39. El procedimiento de acuerdo con una cualquiera de las reivindicaciones 35-38, en el que la sonda de detección de 6 a 30 nucleótidos comprende de 1 a 8 nucleótidos de LNA.

40. El procedimiento de acuerdo con una cualquiera de las reivindicaciones 35-39, en el que en la sonda de detección que comprende al menos dos nucleótidos de LNA, estos pueden ser consecutivos o estar separados por uno o más nucleótidos distintos de LNA.

- 35 41. El procedimiento de acuerdo con una cualquiera de las reivindicaciones 35-40, en el que la sonda de detección es de menos de aproximadamente 20 nucleótidos de longitud, tal como de menos de 15 nucleótidos, tal como de aproximadamente 7 u 8 ó 9 ó 10 u 11 nucleótidos.

42. El procedimiento de acuerdo con una cualquiera de las reivindicaciones 35-41, en el que la sonda de detección comprende una pareja de marcadores que interaccionan entre sí para producir una señal o para producir un cambio en una señal cuando se produce la hibridación de la sonda de detección con una secuencia diana.

- 40 43. El procedimiento de acuerdo con la reivindicación 42, en el que la sonda de detección comprende un resto fluoróforo y un resto inactivador, situados de tal modo que el estado hibridado de la sonda puede distinguirse del estado no hibridado de la sonda por un aumento en la señal fluorescente del nucleótido.

44. El procedimiento de acuerdo con una cualquiera de las reivindicaciones 1-43, en el que los cebadores usados en la transcripción inversa o en la polimerización de ADN comprenden nucleótidos modificados.

- 45 45. El procedimiento de acuerdo con la reivindicación 44, en el que los nucleótidos modificados son nucleótidos de LNA.

46. El procedimiento de acuerdo con una cualquiera de las reivindicaciones 1-45, en el que al menos un cebador usado en la qPCR en la etapa (c) está constituido por un cebador usado en la transcripción inversa o polimerización de nucleótidos de la etapa (b).

47. El procedimiento de acuerdo con una cualquiera de las reivindicaciones 1-46, en el que la secuencia de nucleótidos diana es una secuencia de microARN.

48. El procedimiento de acuerdo con la reivindicación 47, en el que la secuencia de nucleótidos diana es una secuencia de microARN maduro.

5 49. El procedimiento de acuerdo con la reivindicación 1, en el que

- una muestra de ARN total o una fracción de muestra de ARN que contiene solamente ARN de un tamaño por debajo de 200 nucleótidos se somete a una polimerasa de poli A para añadir a todas las moléculas diana de microARN una cola de nucleótidos de poli A.

10 - un cebador de poli T se usa posteriormente como cebador en una reacción de transcriptasa inversa (RT) para convertir la muestra de ARN en ADNc, en el que dicha reacción de RT se vuelve opcionalmente específica de secuencia permitiendo que la secuencia de cebador de RT solape en parte con la secuencia de microARN específica para microARN específicos o un grupo o familia de microARN y

15 - someter dicho ADNc a una amplificación por qPCR a tiempo real usando cebadores de qPCR específicos para una diana de microARN específica y, opcionalmente, una sonda de detección marcada, en el que dichos cebadores de qPCR solapan opcionalmente en su totalidad o en parte con la secuencia añadida.

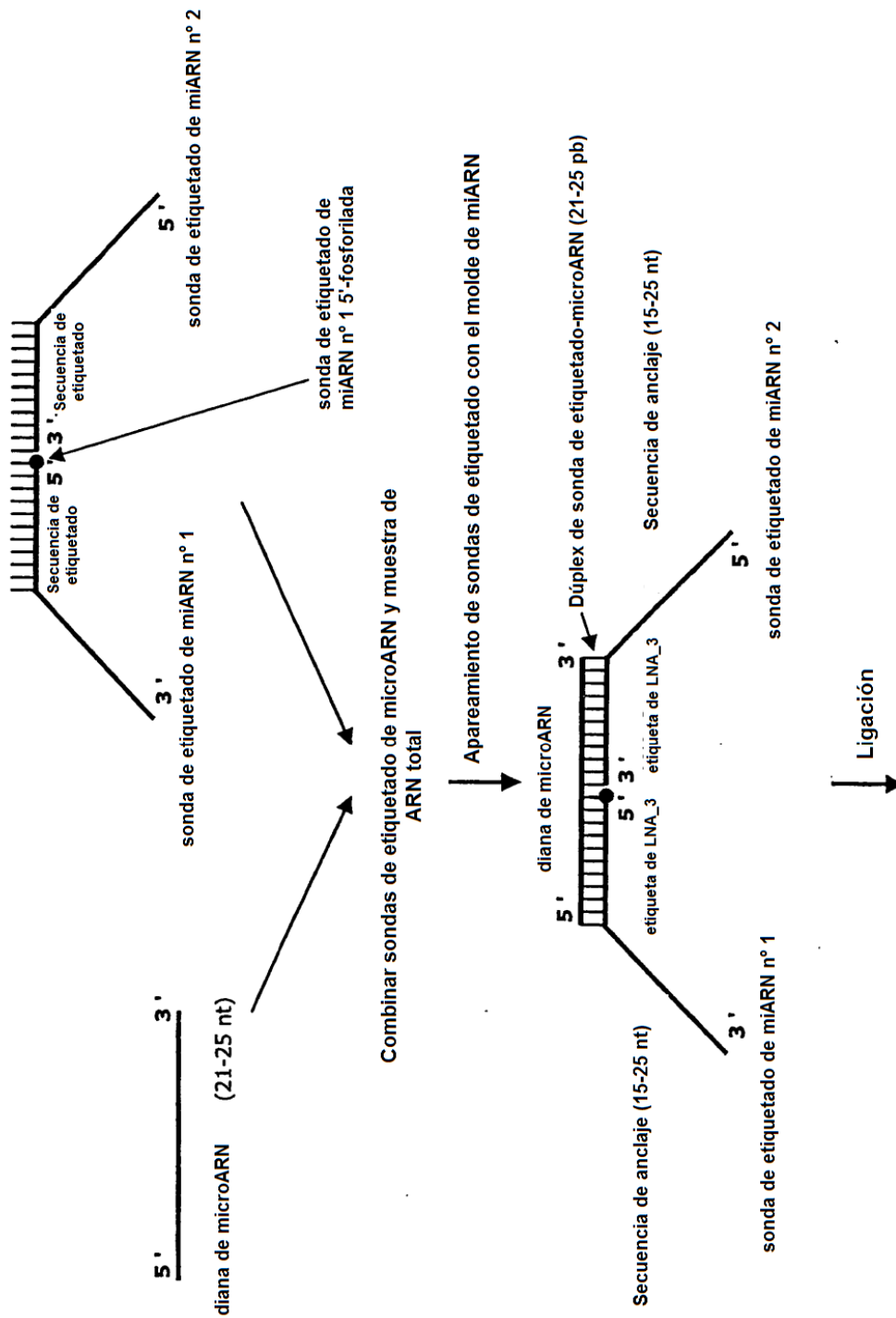


Fig. 1 (1/2)

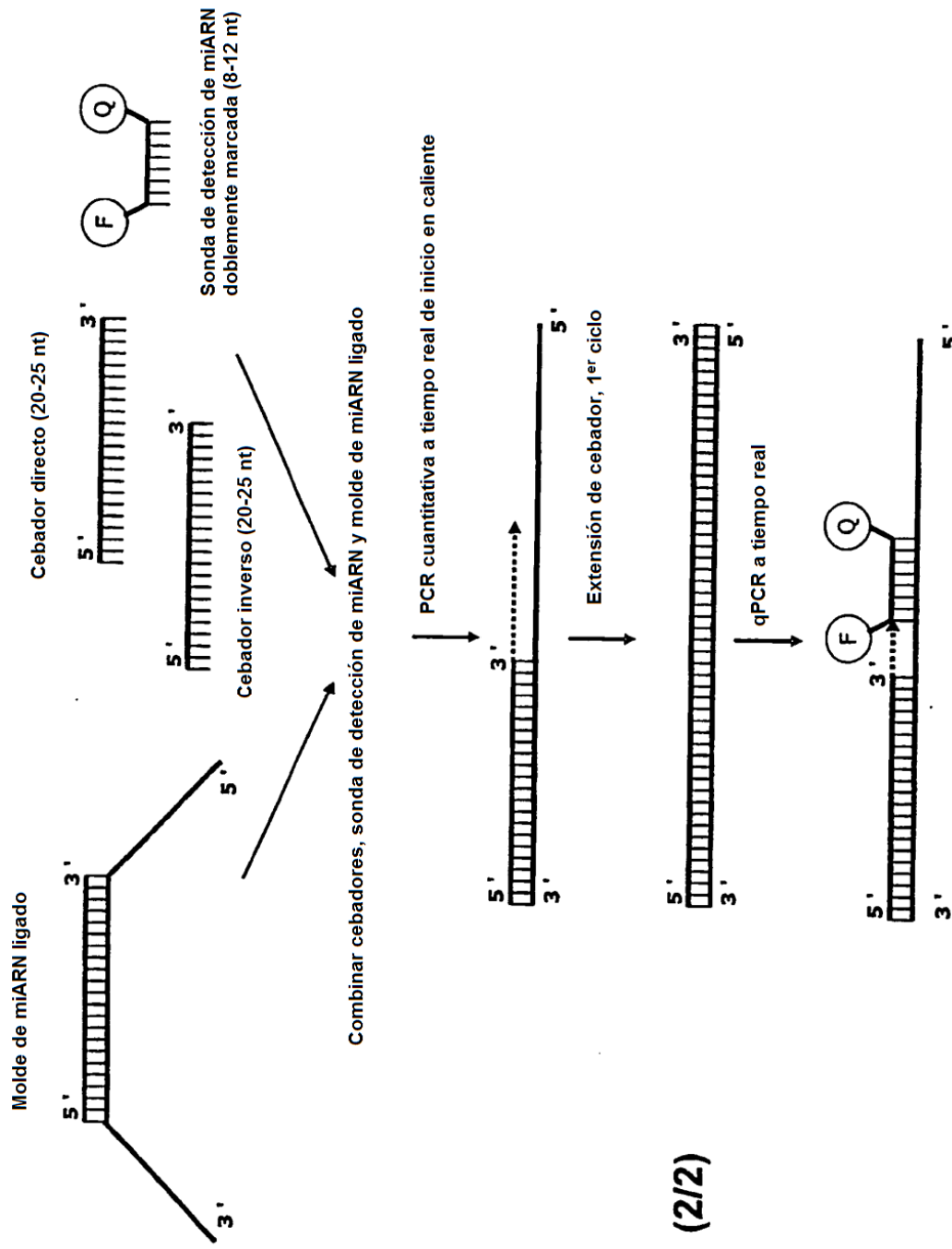


Fig. 1 (2/2)

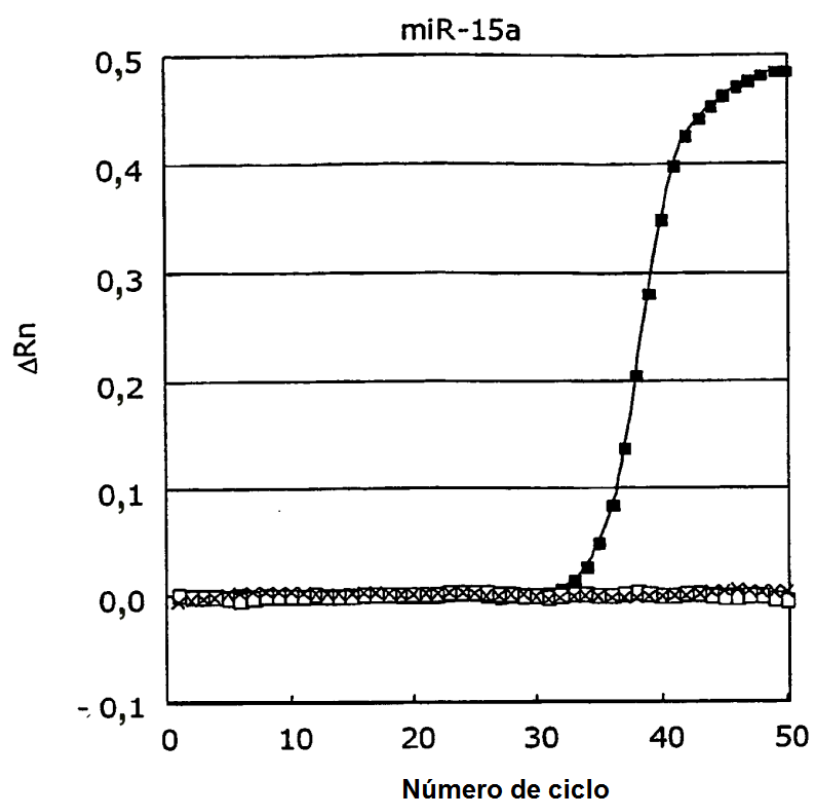


Fig. 2A

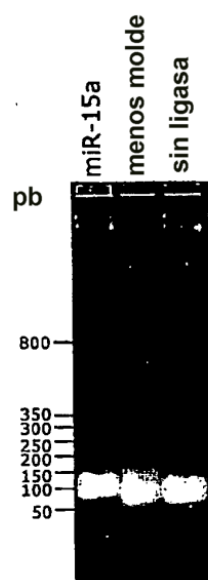


Fig. 2B

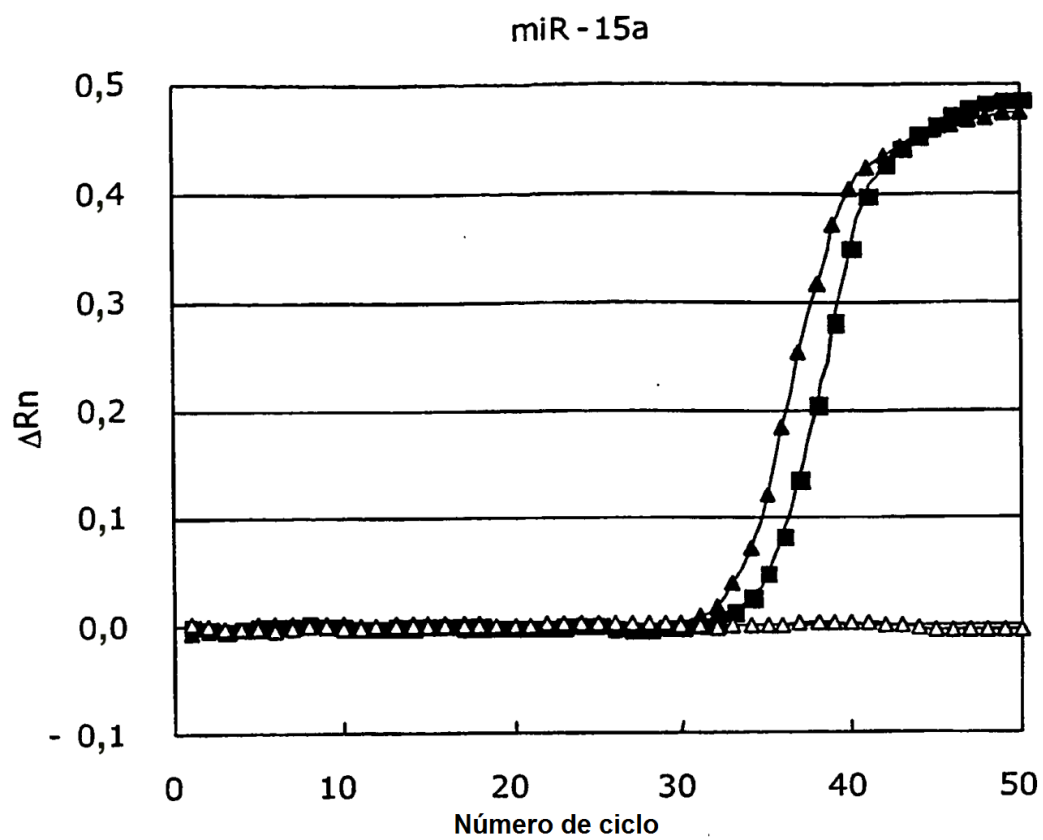


Fig. 3

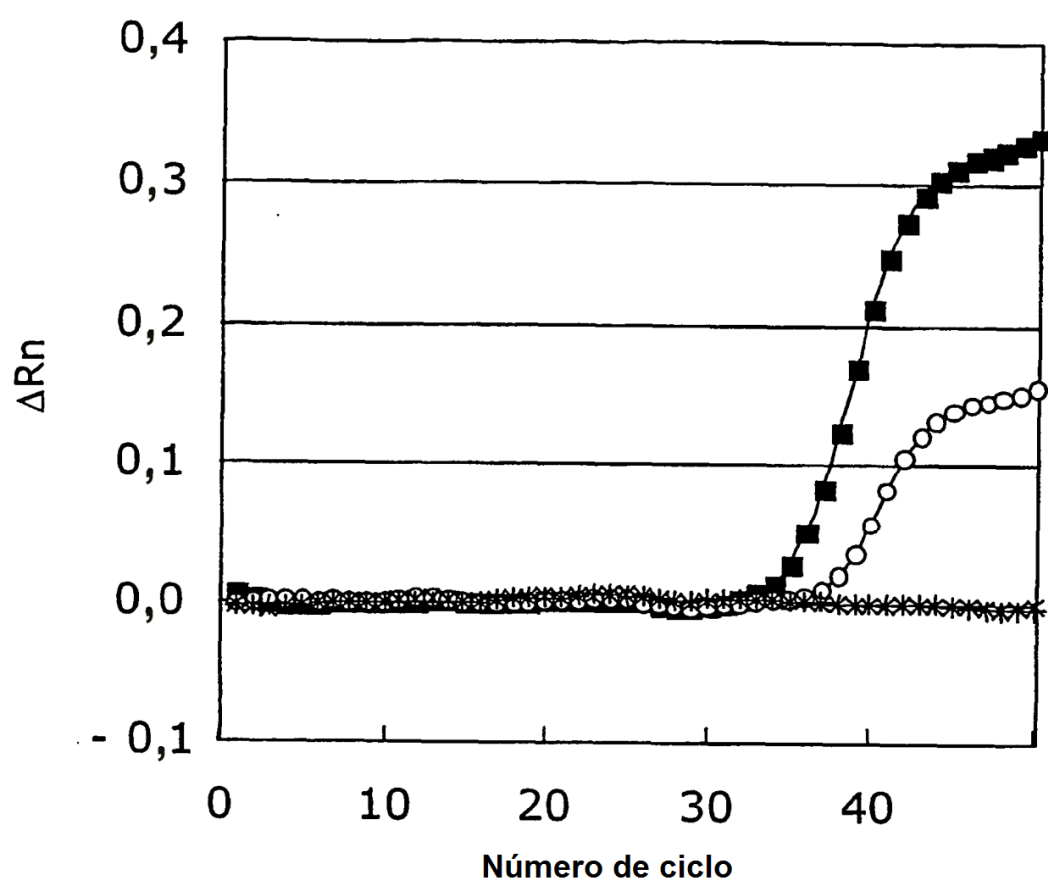


Fig. 4

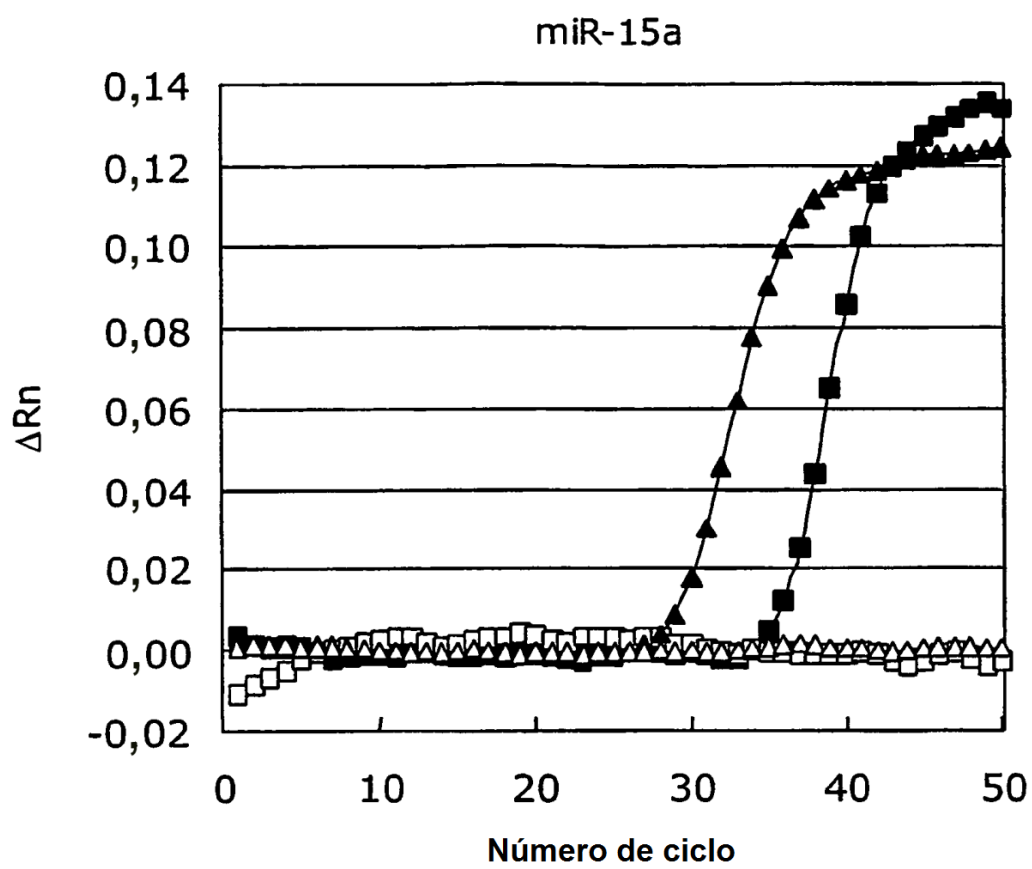


Fig. 5.

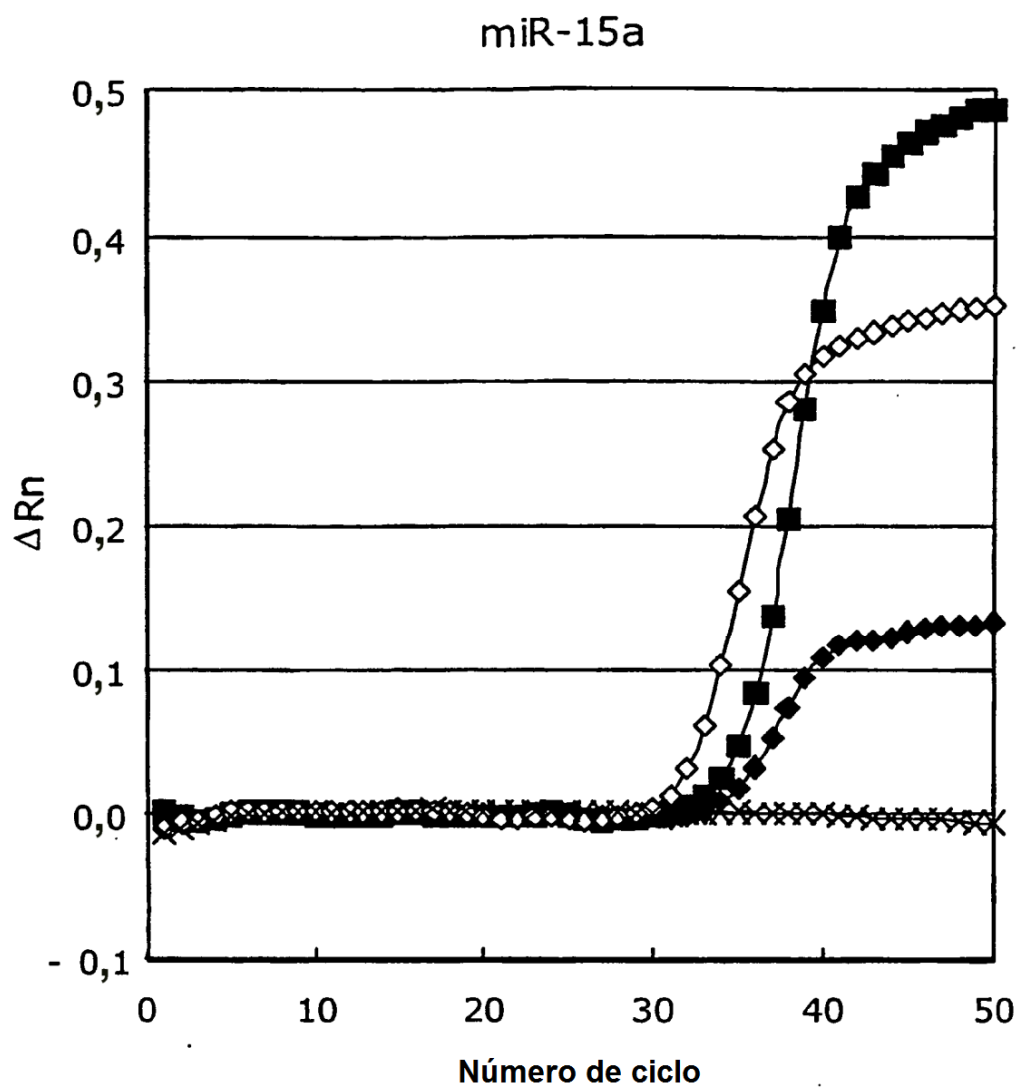


Fig. 6.

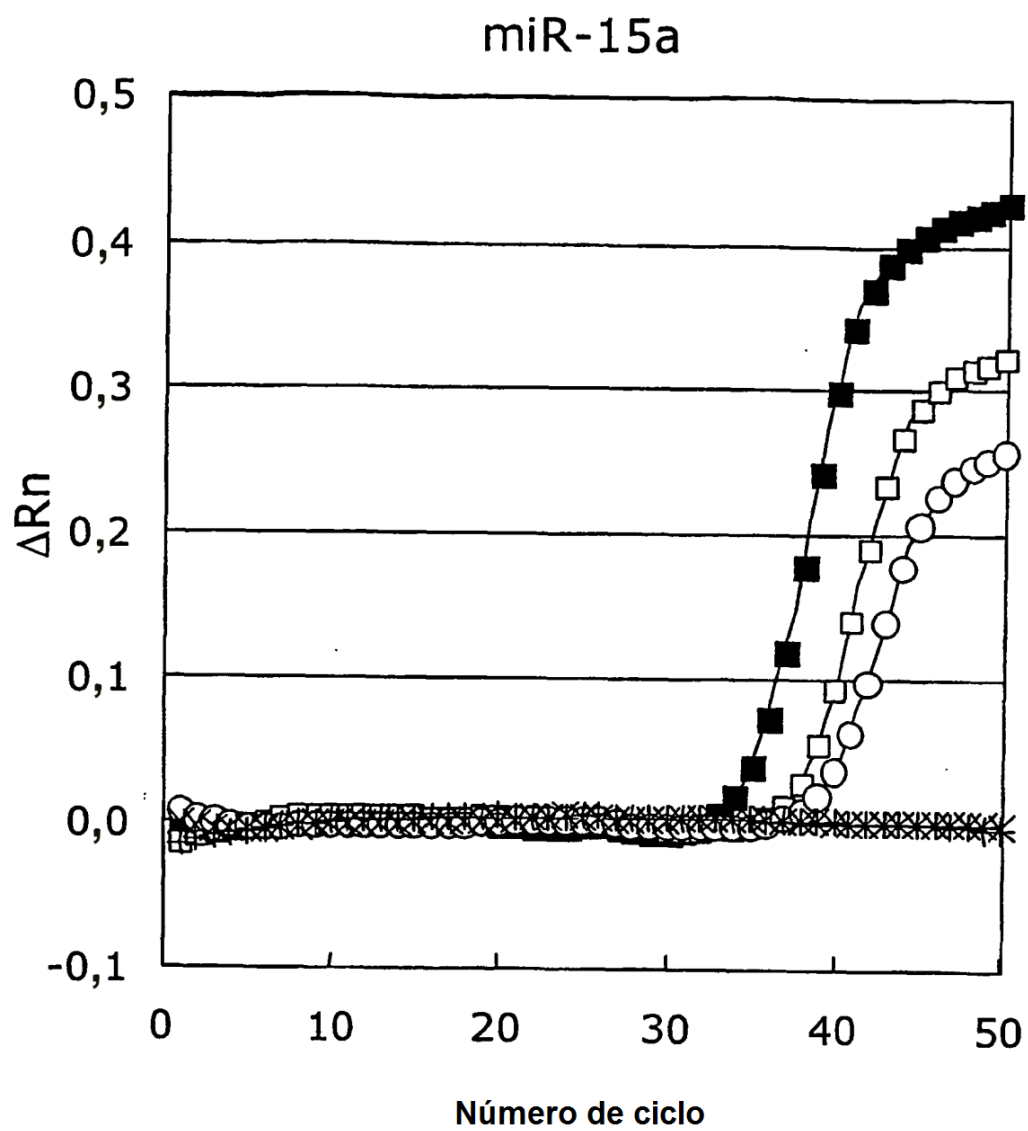


Fig. 7.

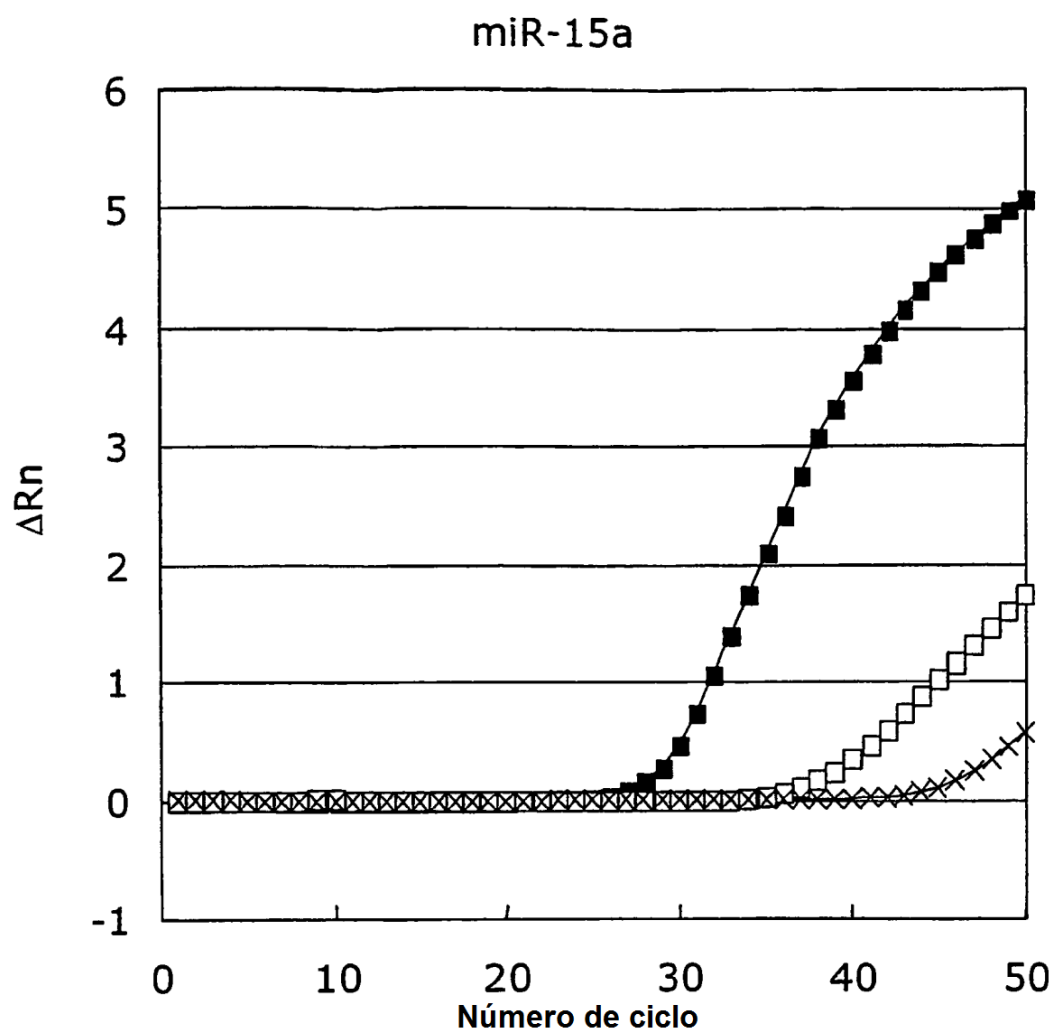


Fig. 8.

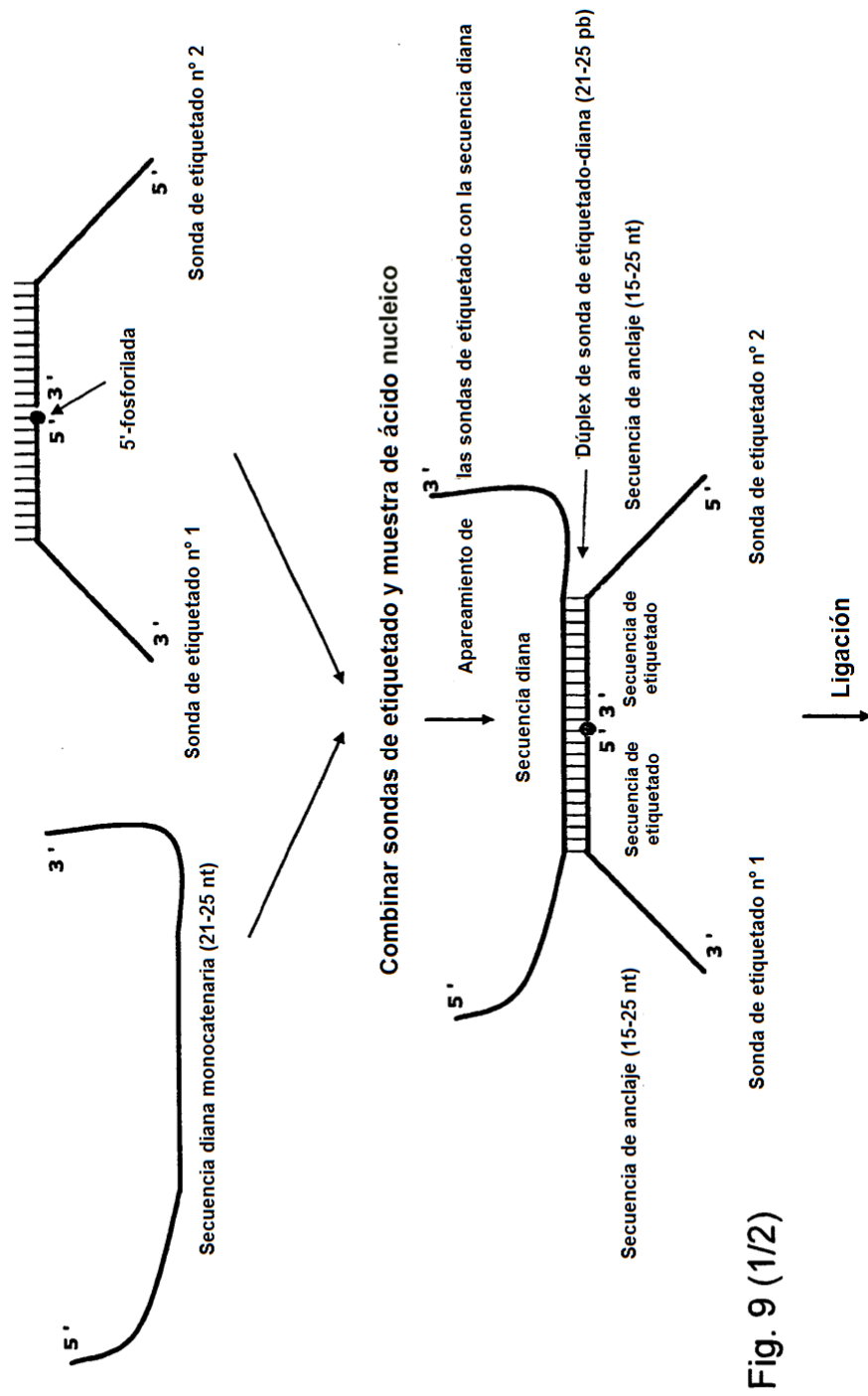


Fig. 9 (1/2)

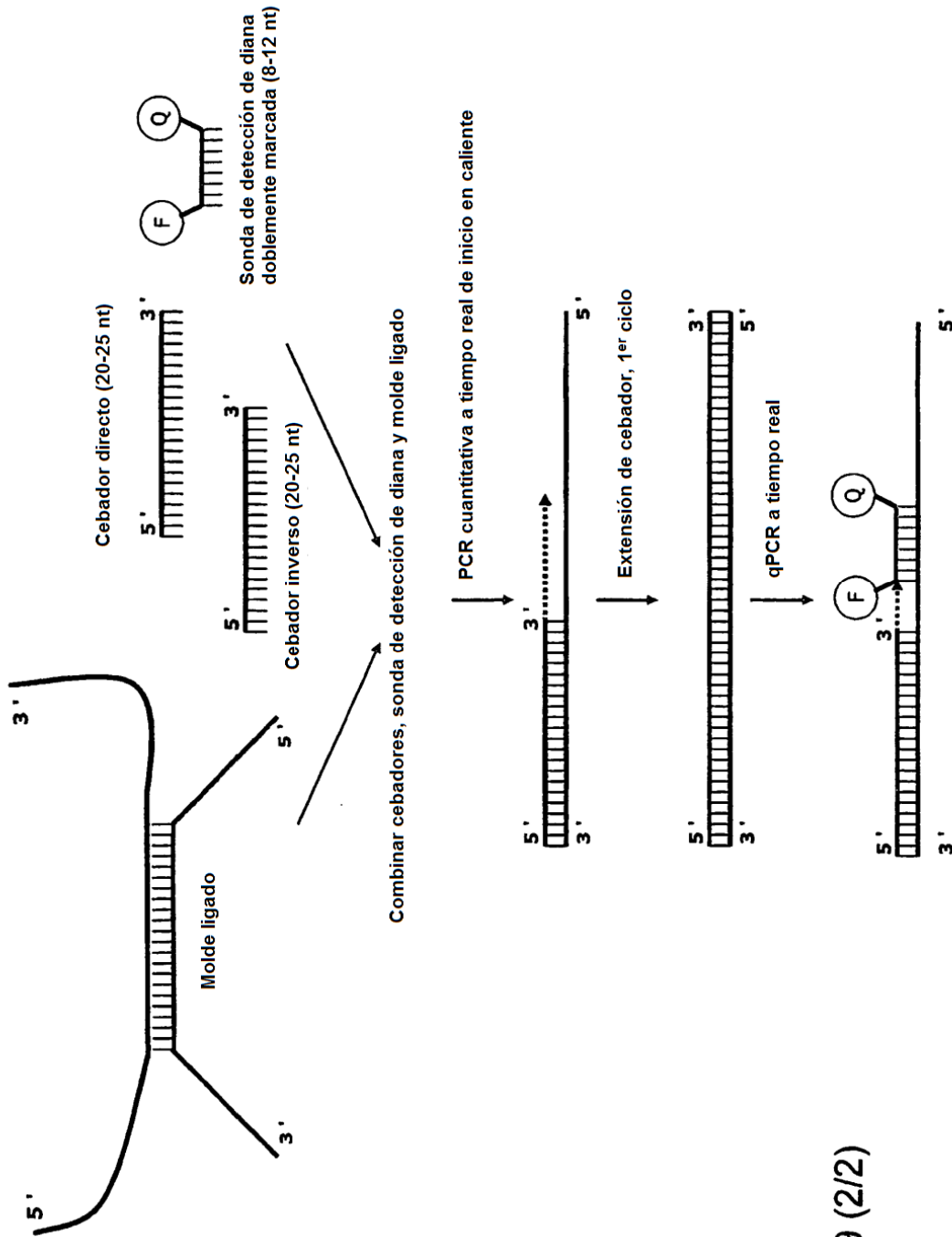


Fig. 9 (2/2)

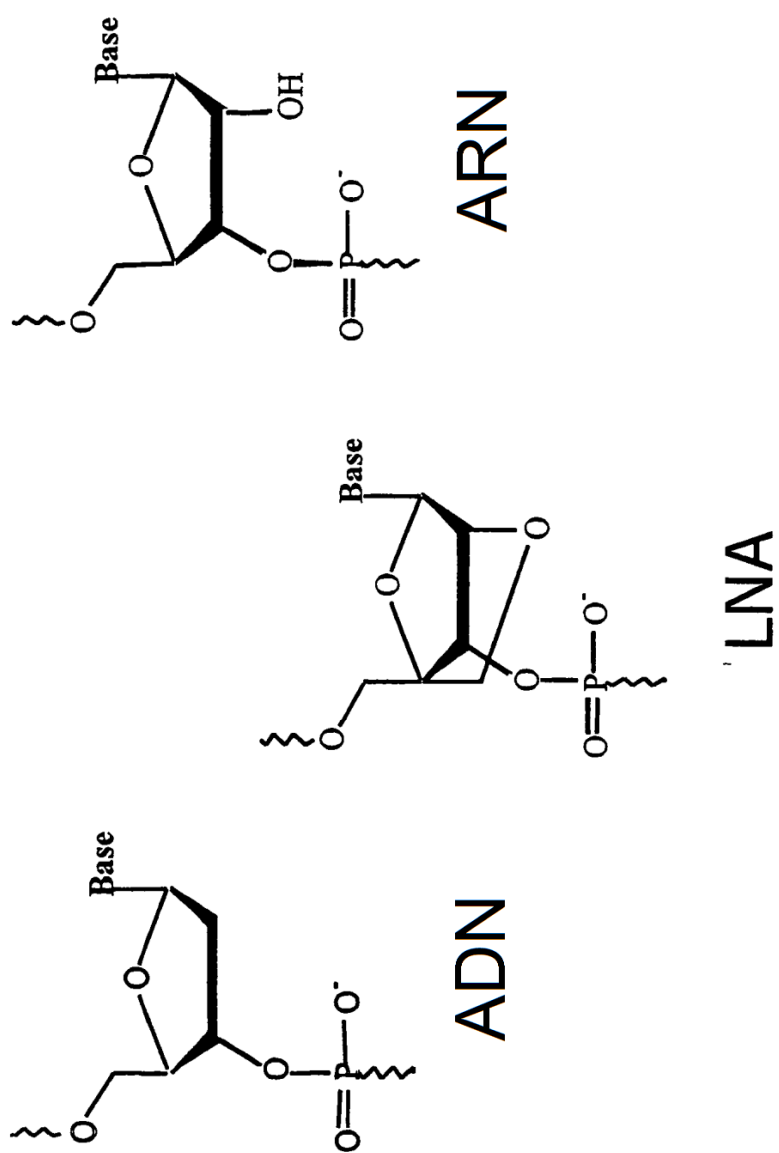
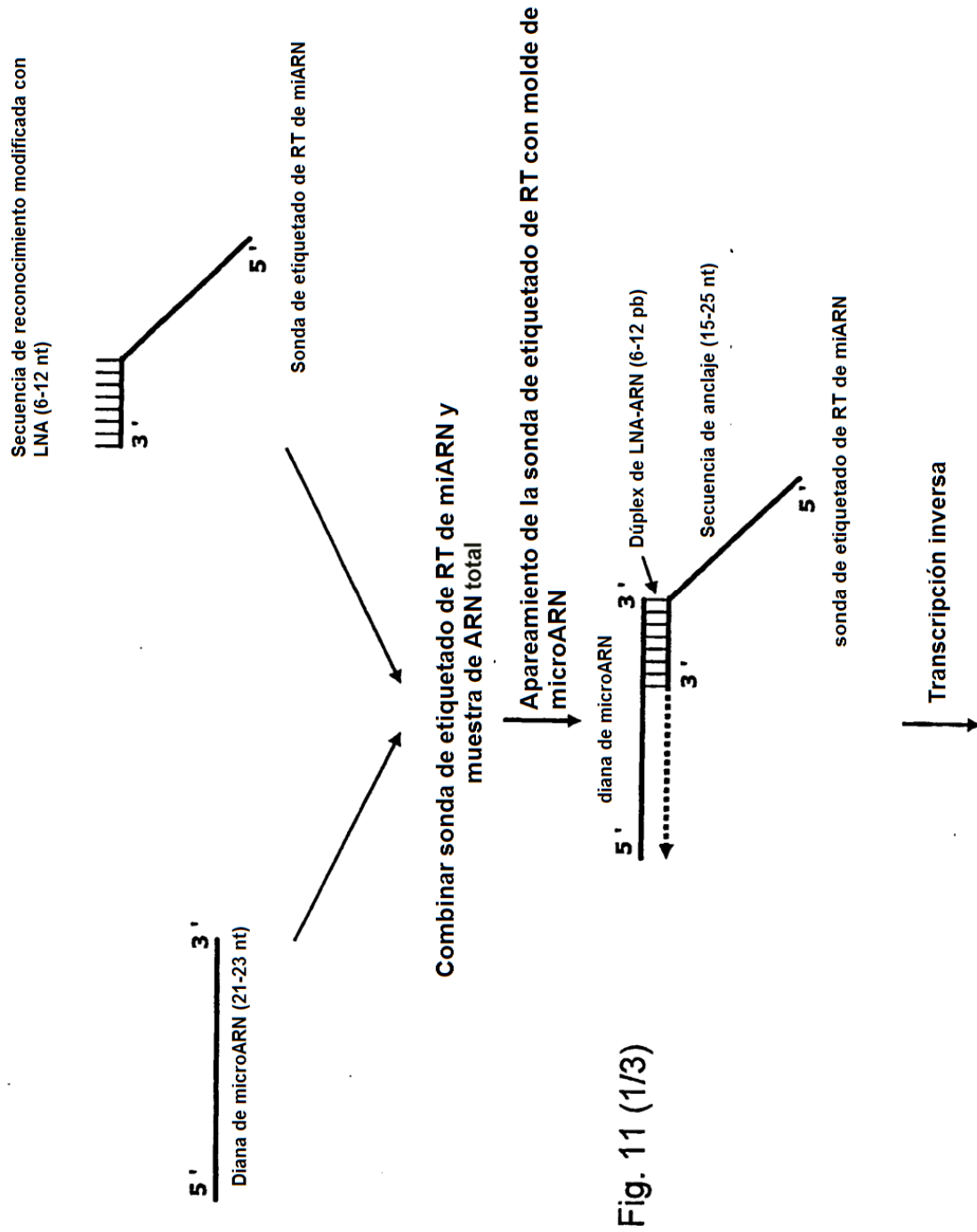
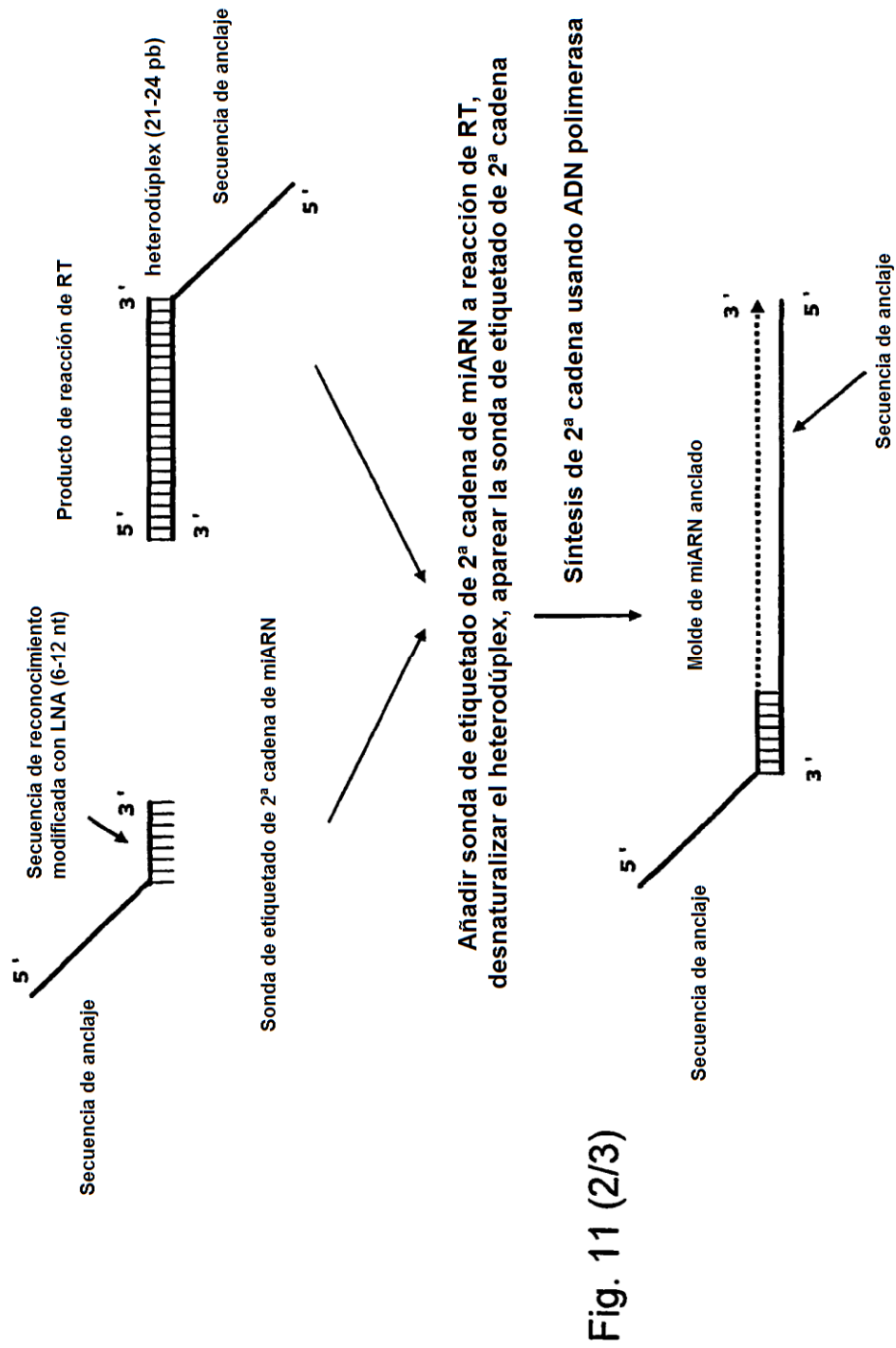


Fig. 10





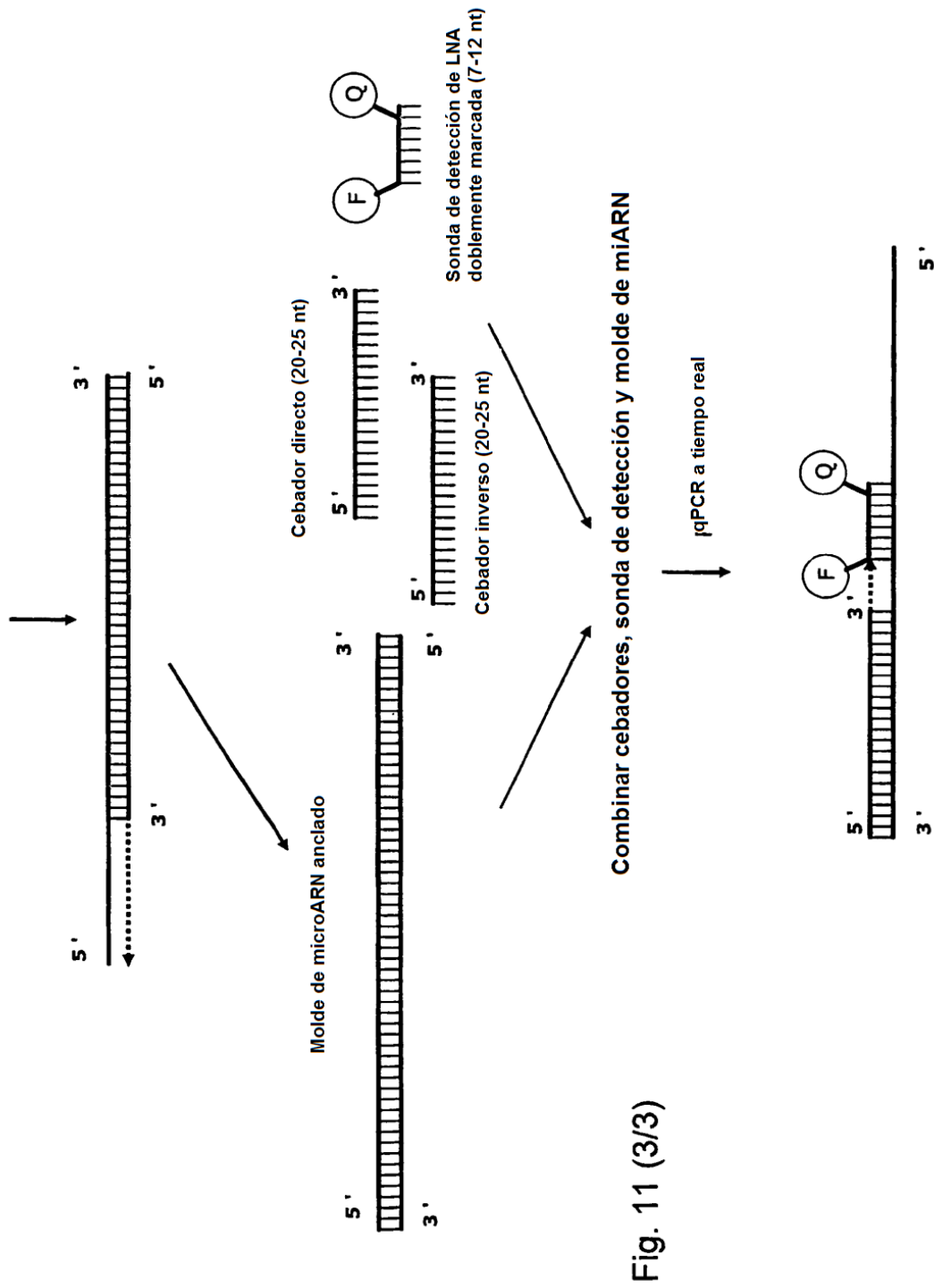
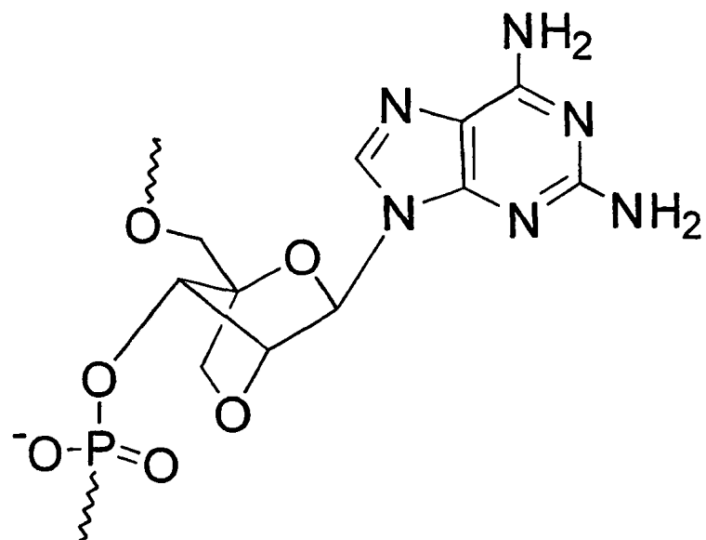


Fig. 11 (3/3)

A. LNA-2,6-diaminopurina



B. LNA-2-thiouracil (2-thio-T)

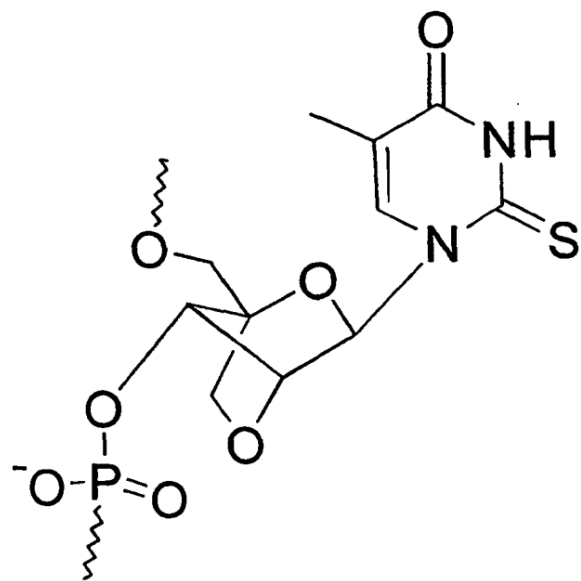
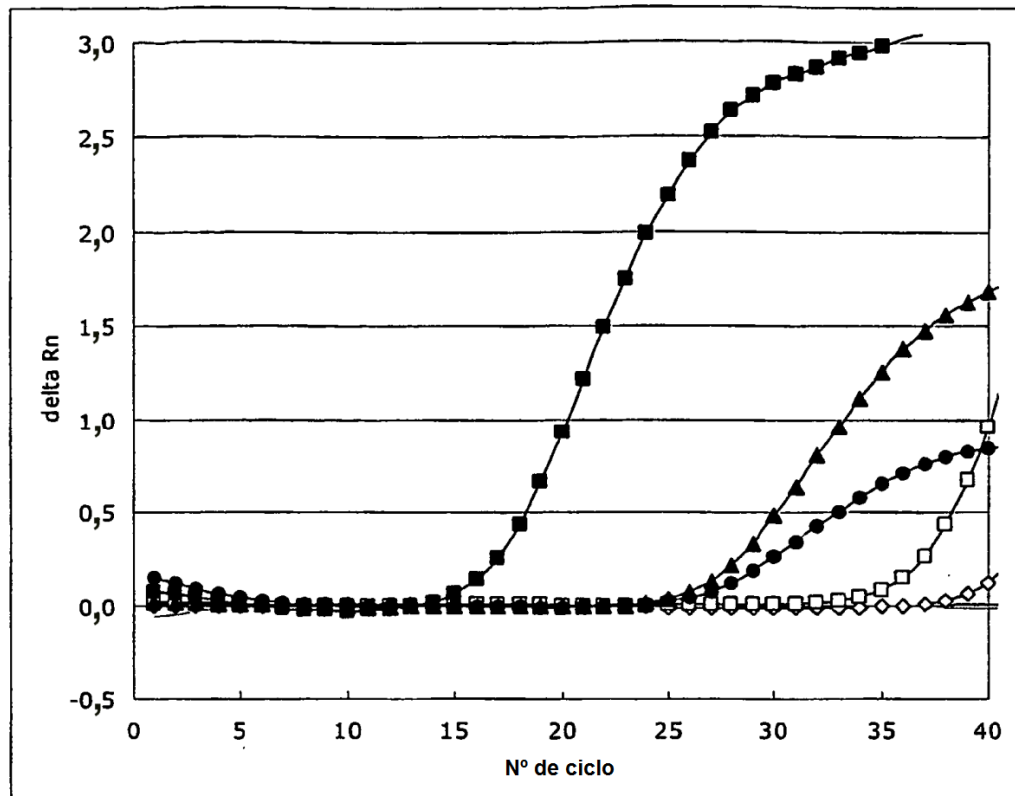


Fig. 12

Fig. 13



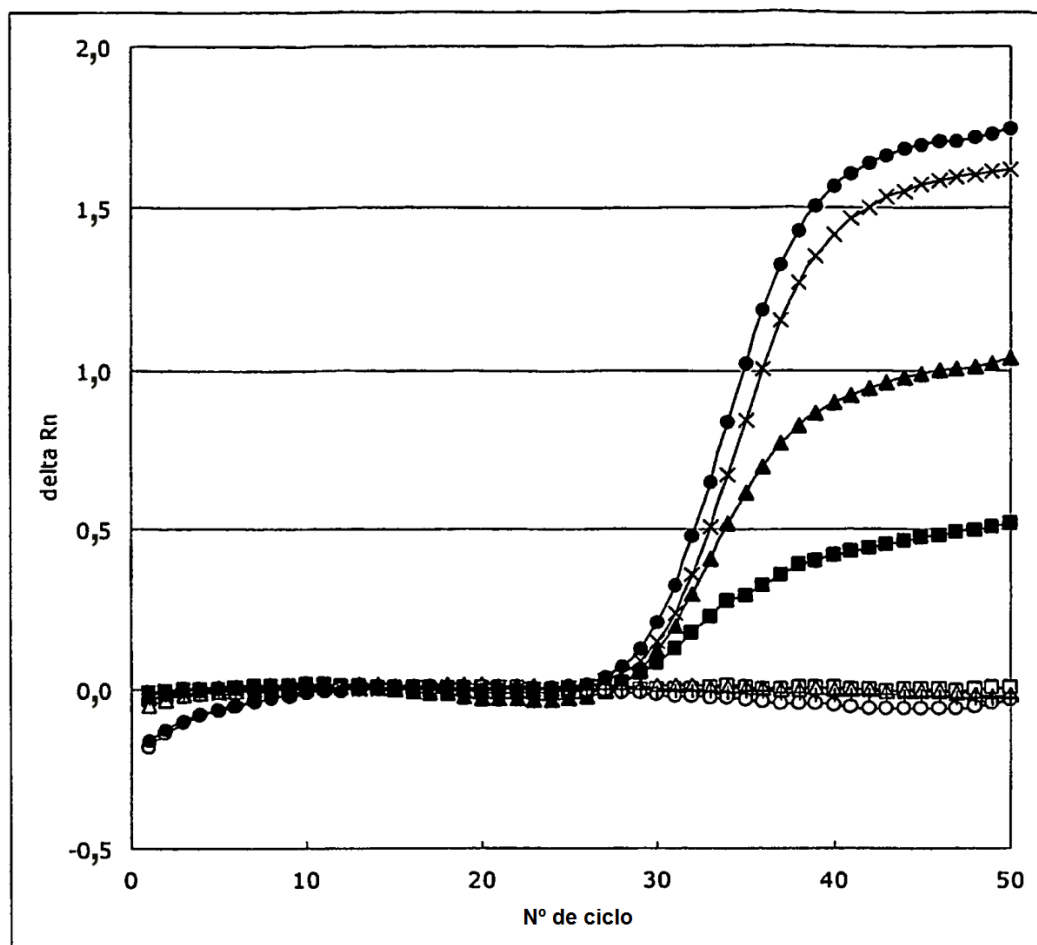


Fig. 14.

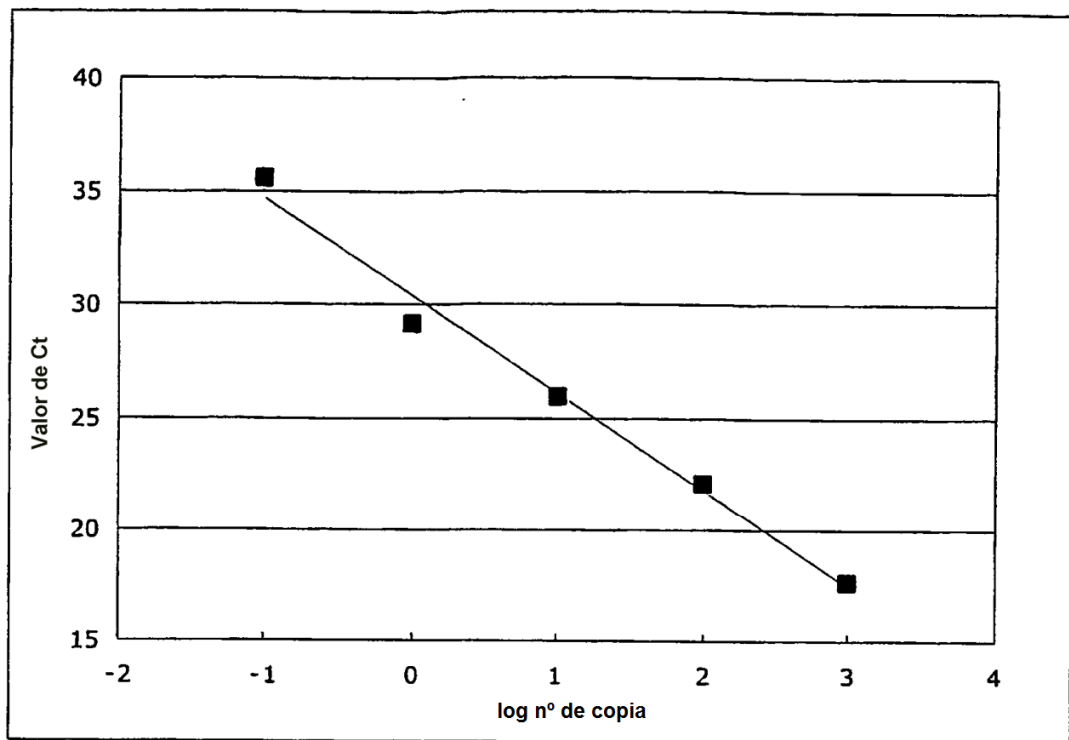


Fig. 15.

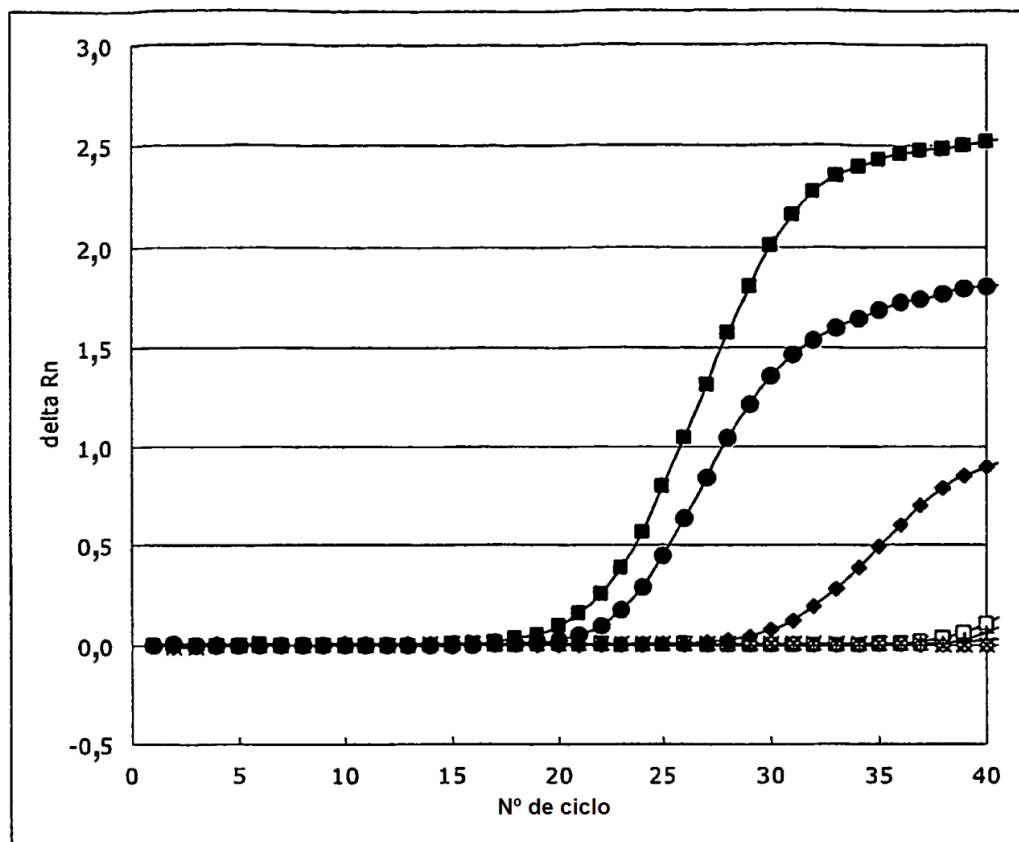


Fig. 16.

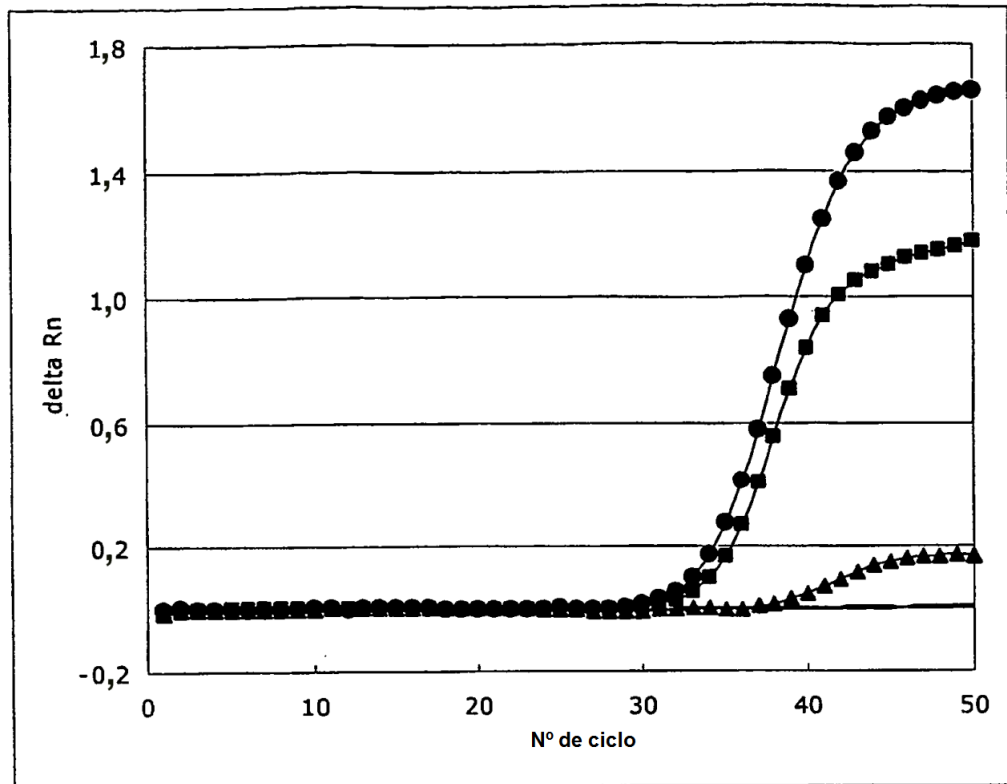


Fig. 17.

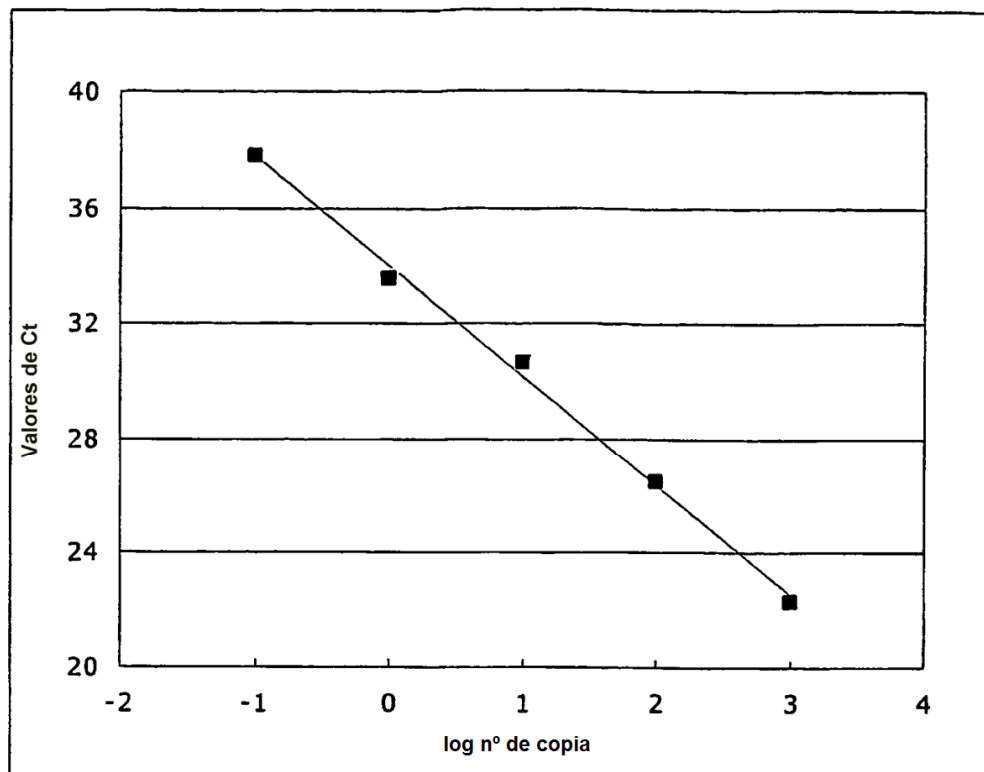


Fig. 18.

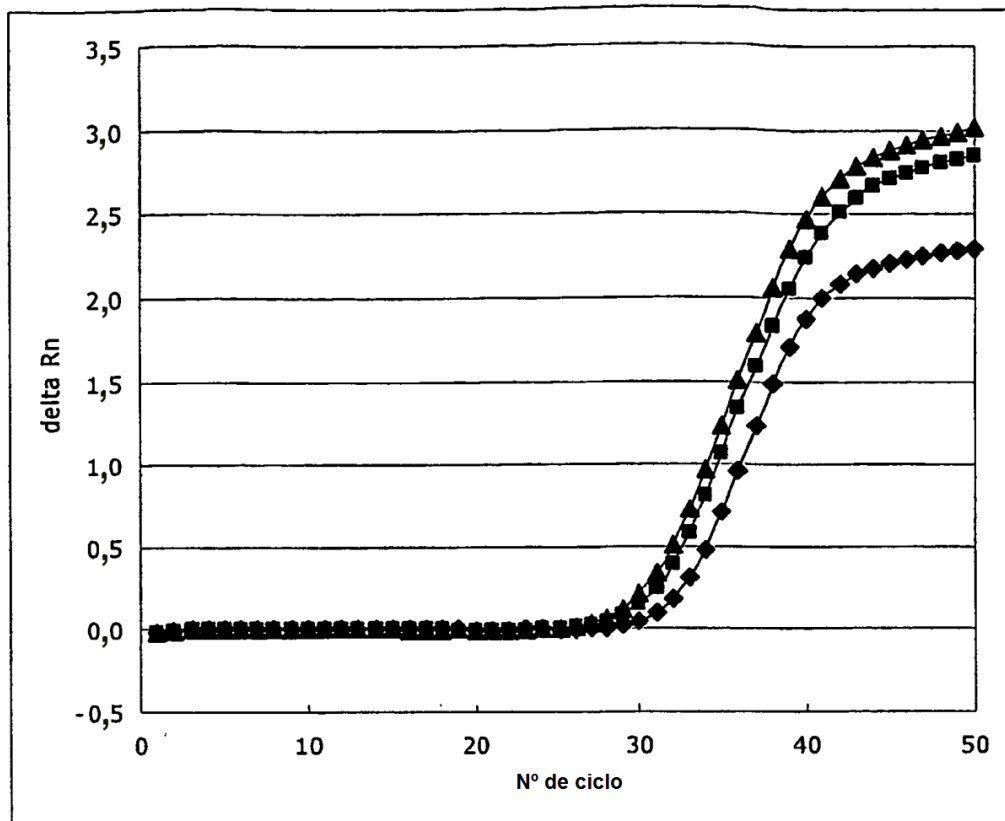


Fig. 19.

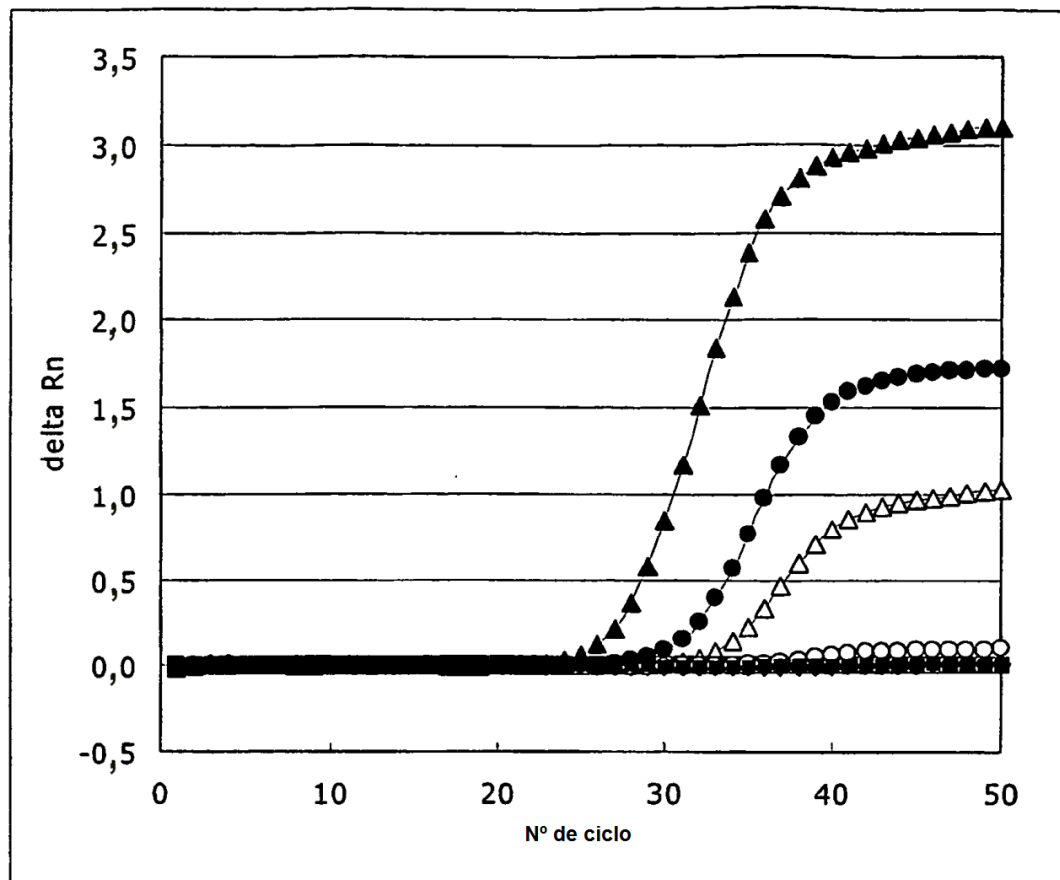


Fig. 20.

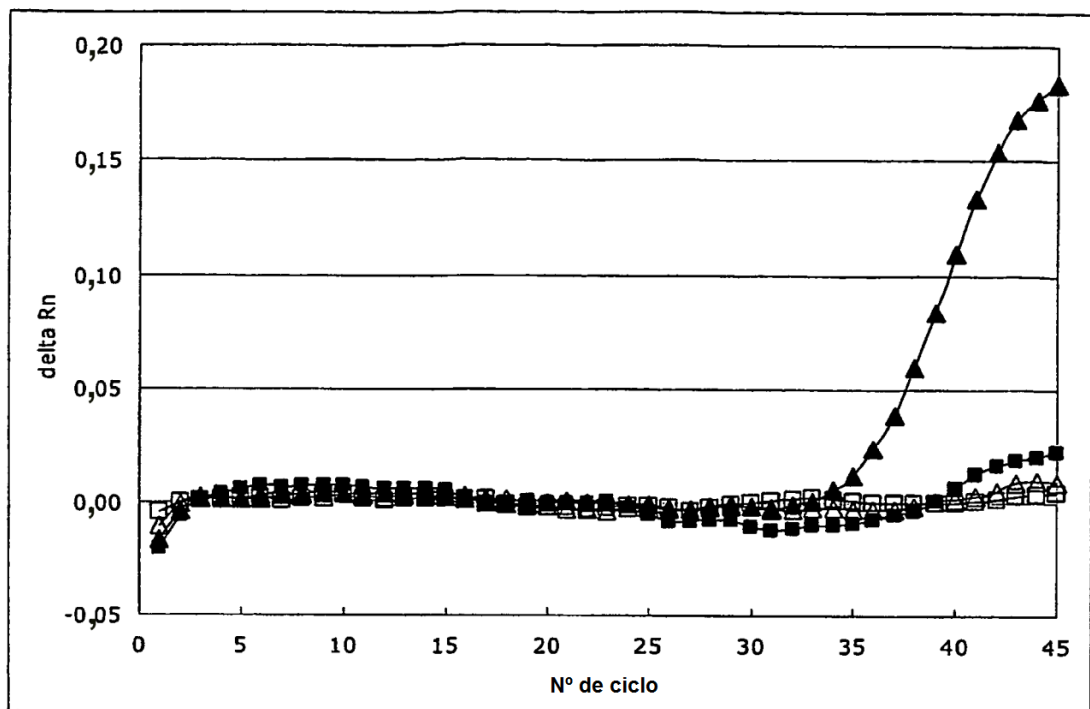


Fig. 21.

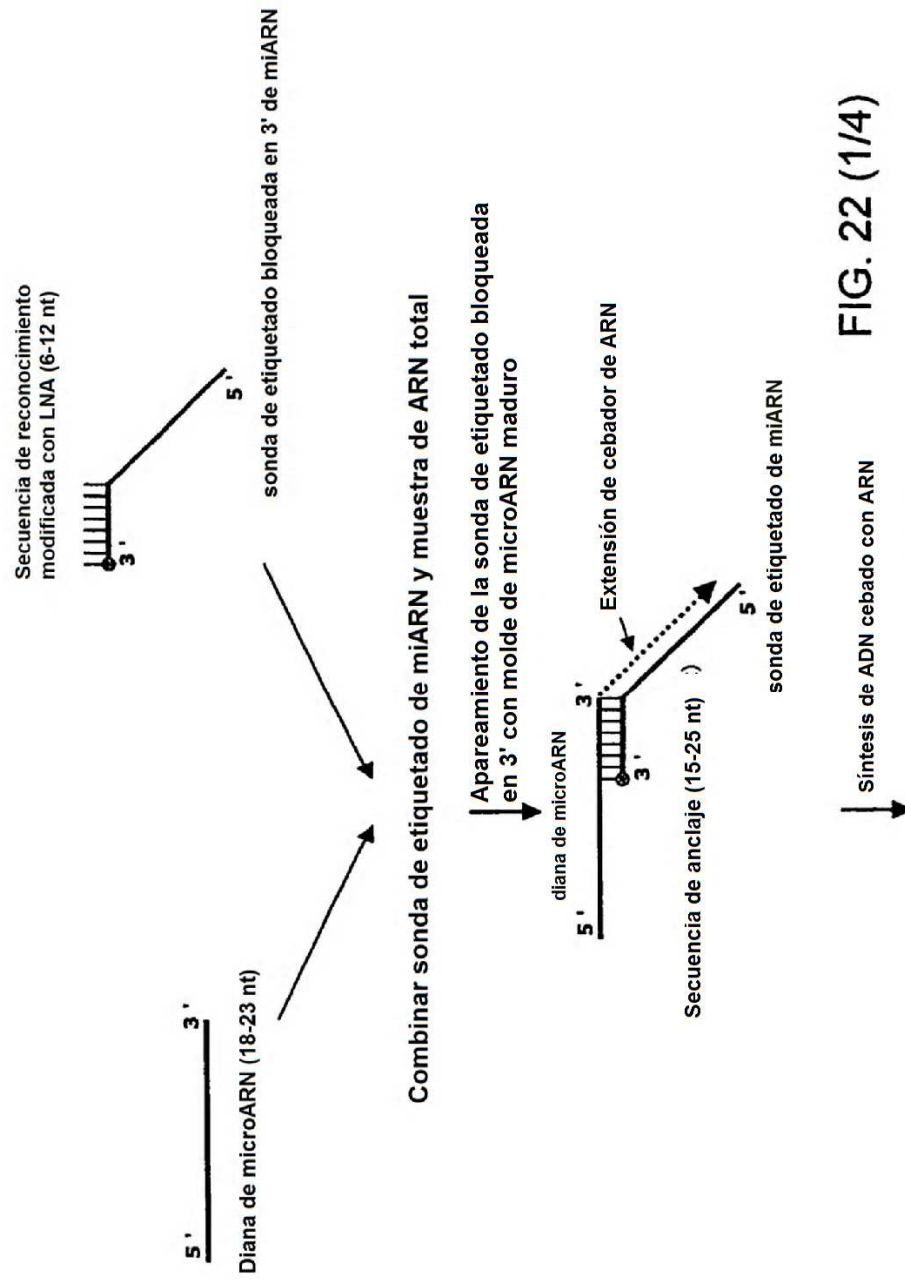


FIG. 22 (1/4)

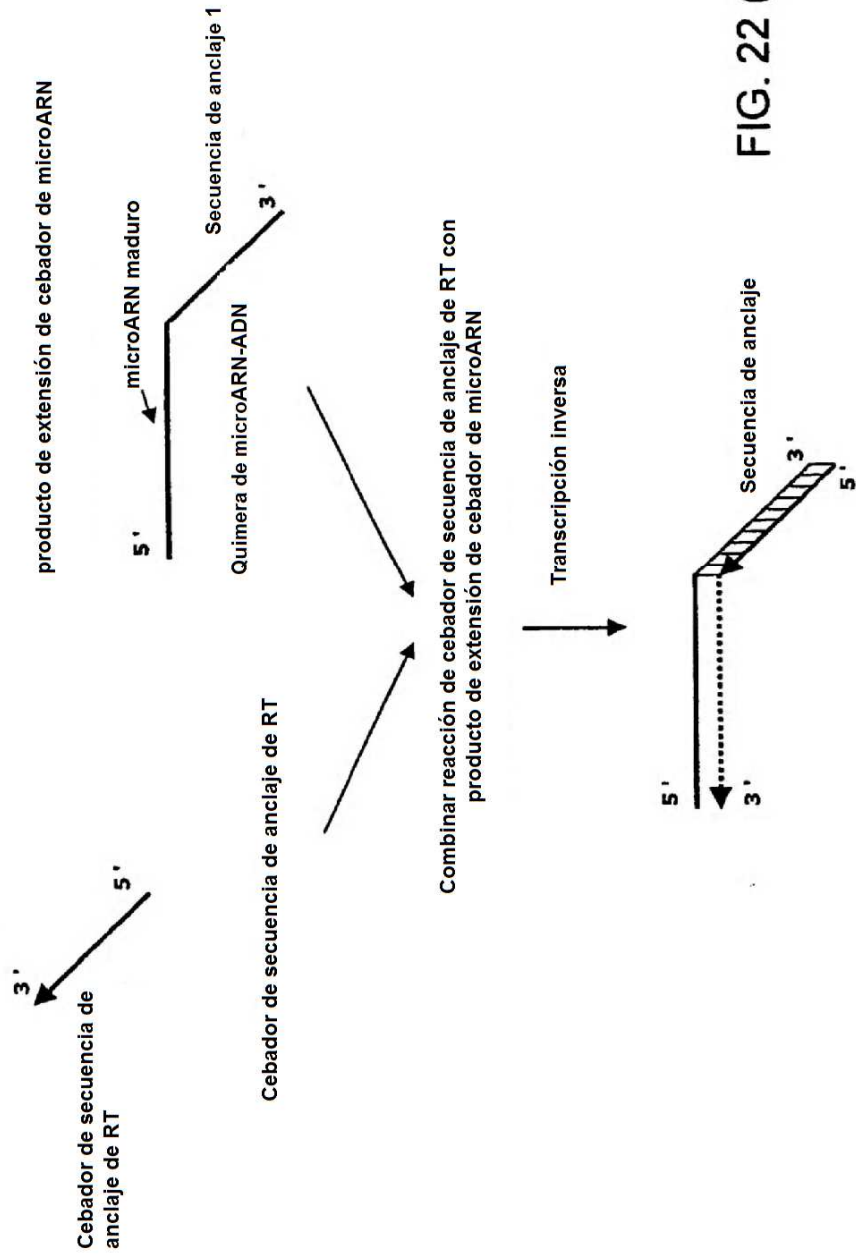


FIG. 22 (2/4)

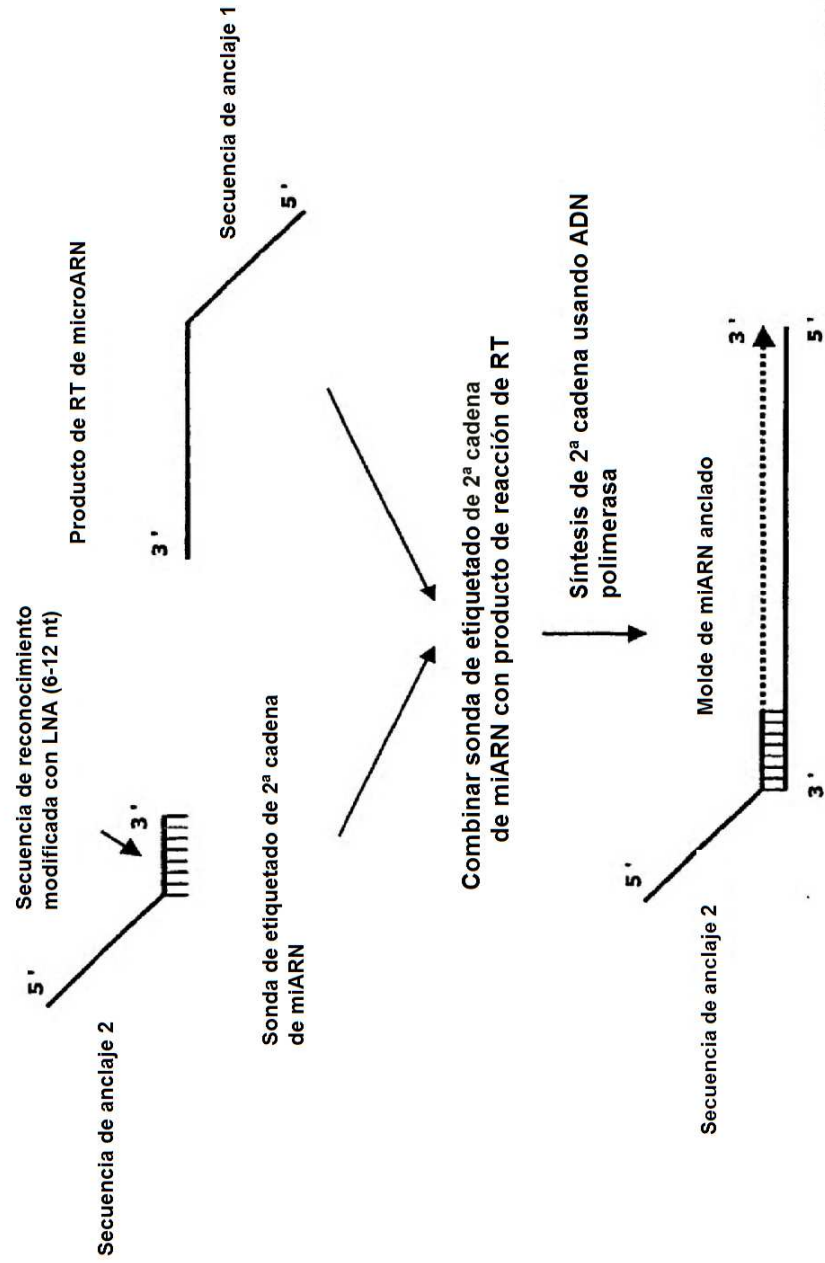


FIG. 22 (3/4)

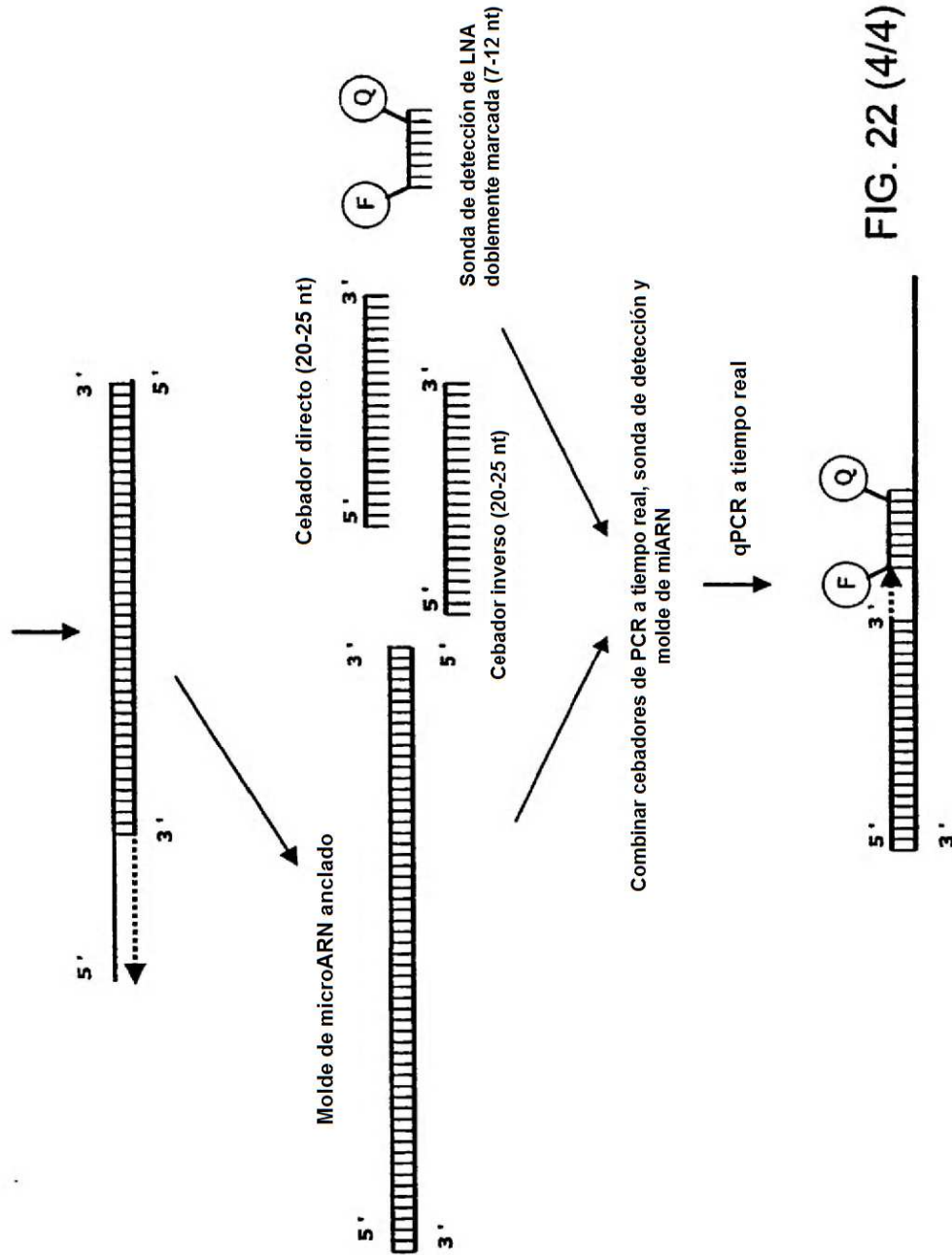


FIG. 22 (4/4)

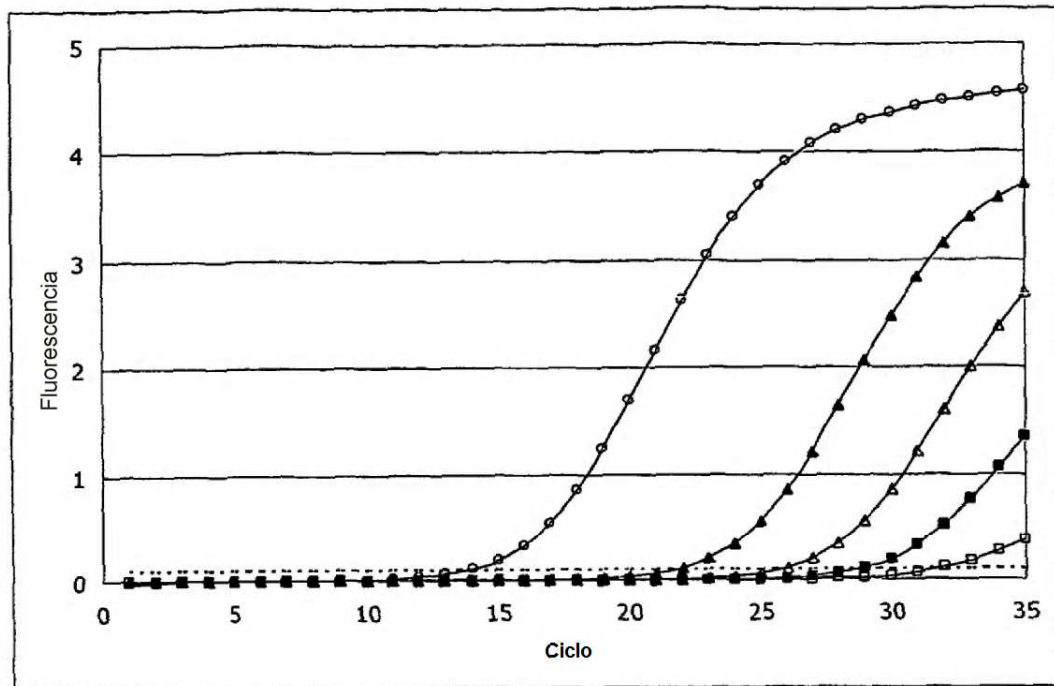
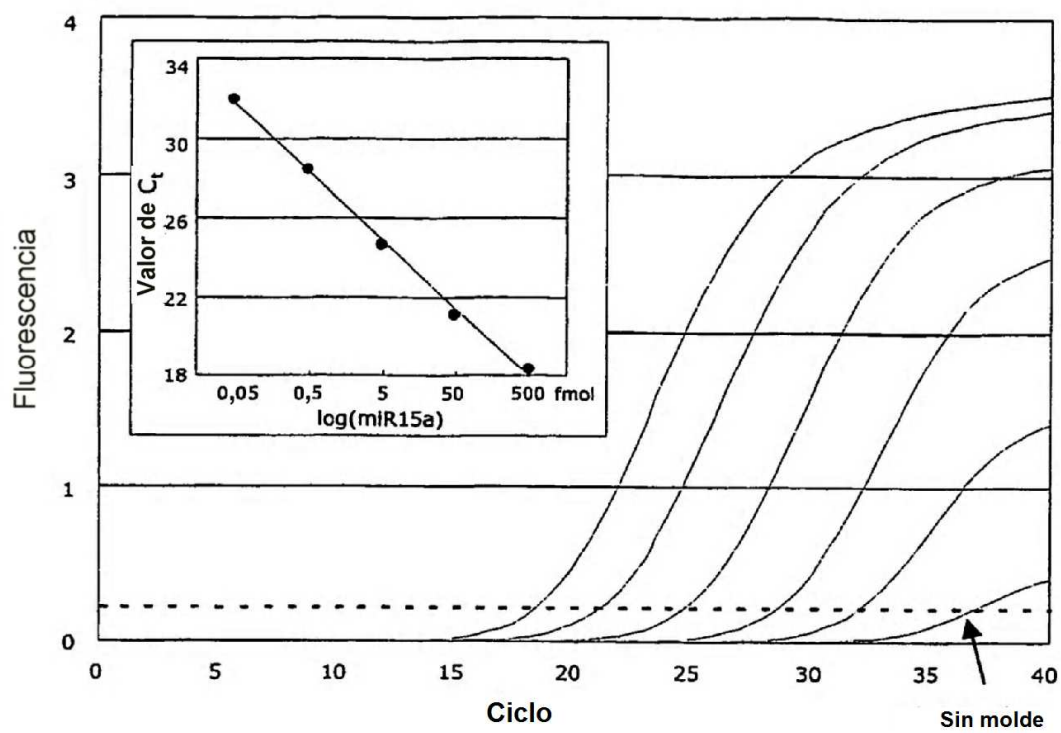


Fig. 23

Fig. 24



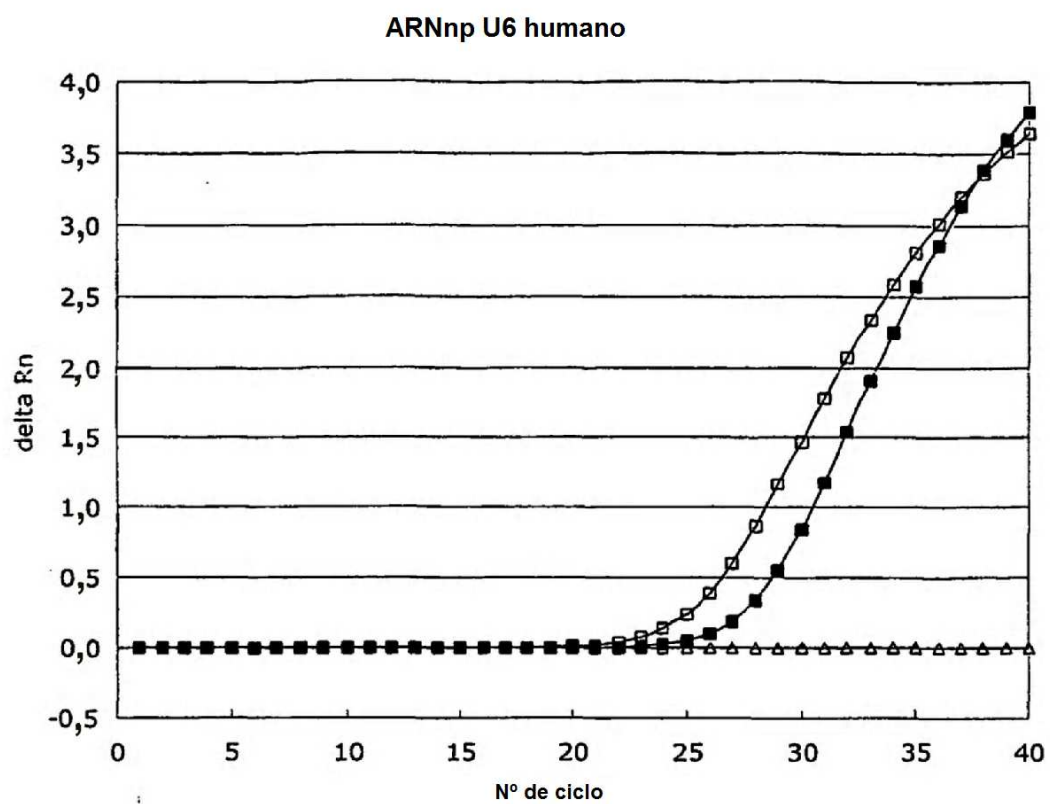


Fig. 25

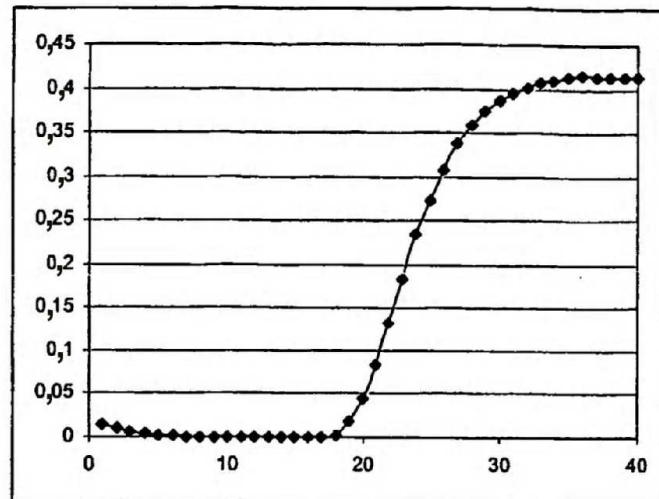
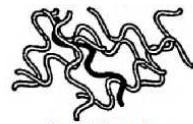


Fig. 26

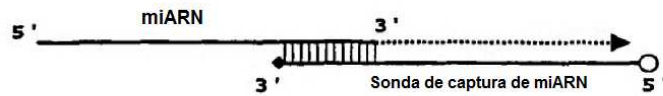
Muestra de ARN total
Diana de microARN maduro (18-23 nt)

Sonda de captura 5'-biotinilada bloqueada en 3'



Combinar la sonda de captura de miARN y la muestra de ARN total

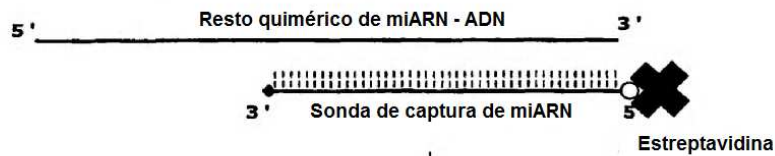
Aparear la sonda de captura con miARN maduro
seguido de una extensión de cebador de ARN



Permitir la unión de sonda de
captura biotinilada con moléculas de
estreptavidina



Eliminar por lavado el material no unido y
desnaturalizar el resto de miARN-ADN de la
sonda de captura



Retirar el sobrenadante que contiene el
resto de miARN - ADN a un nuevo tubo.
Realizar la transcripción inversa usando un
cebador de RT

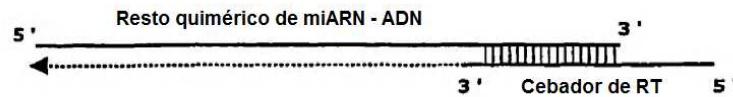


Fig. 27 (1/2)

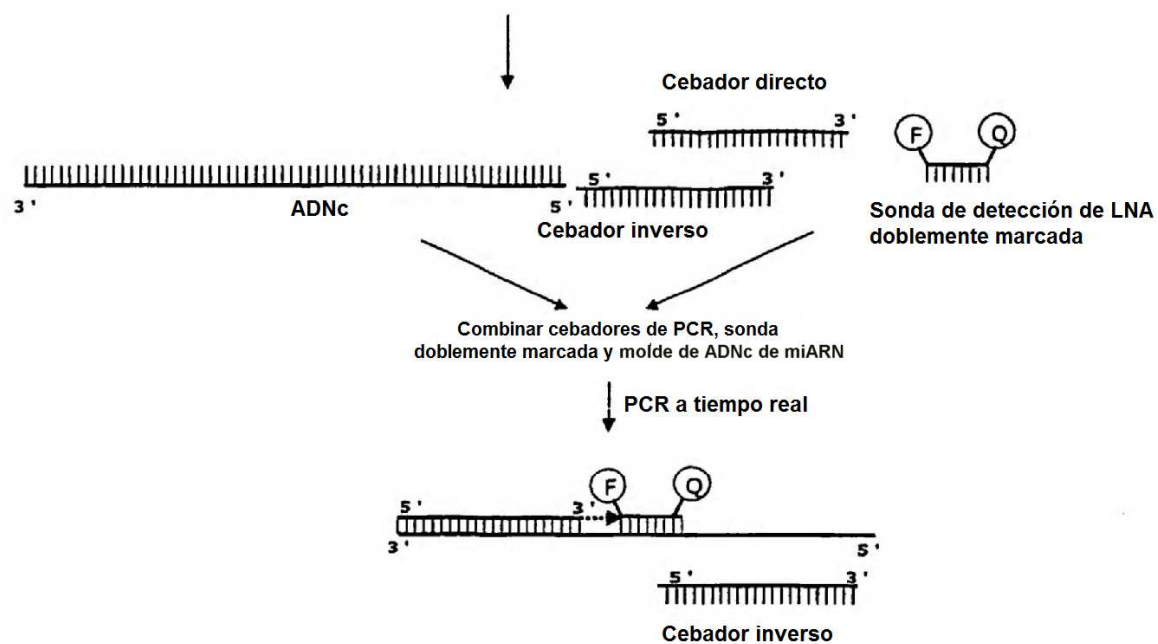


Fig. 27 (2/2)

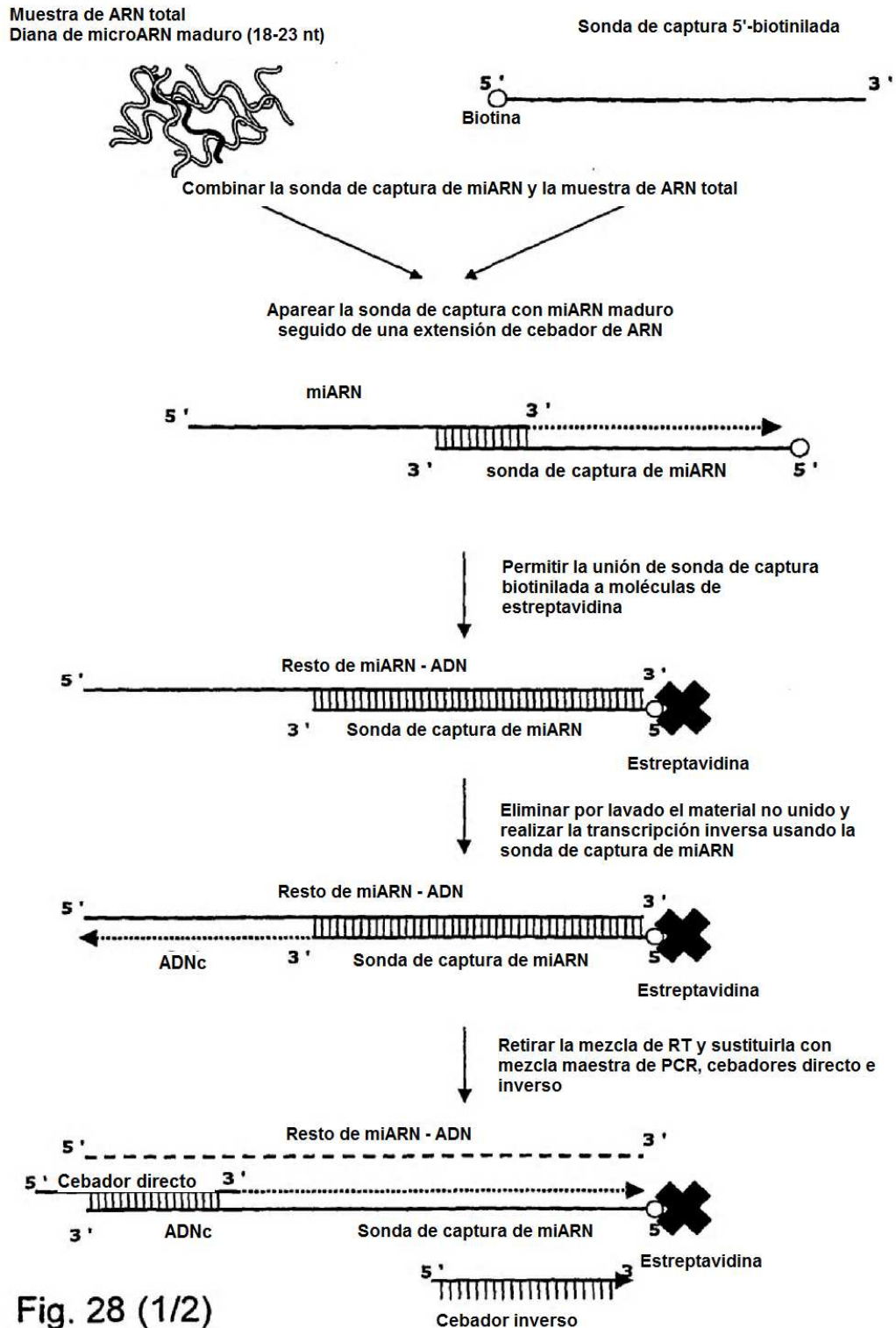


Fig. 28 (1/2)

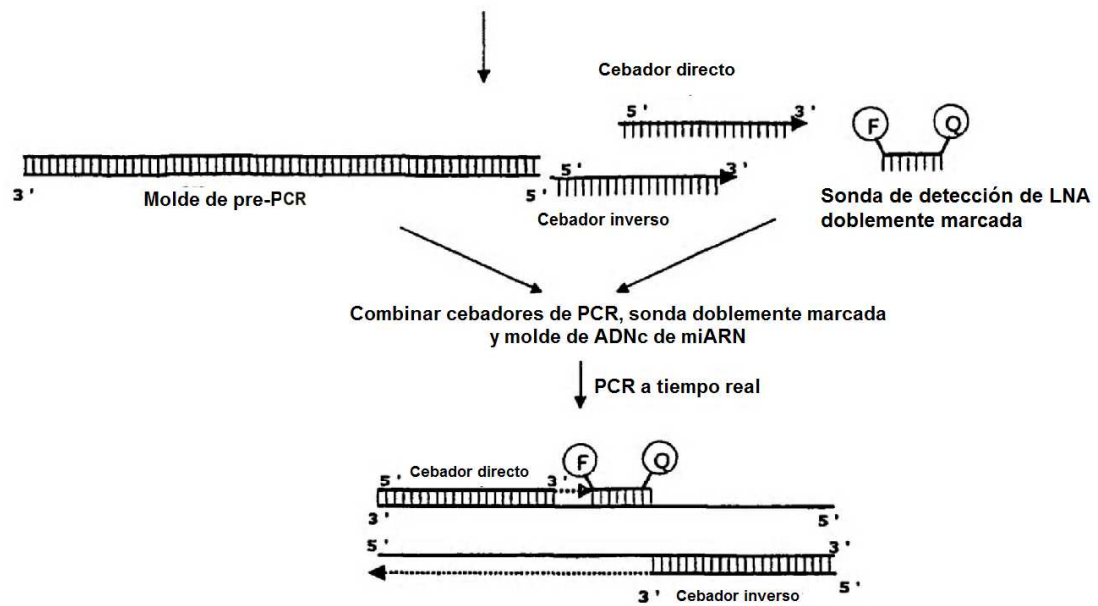
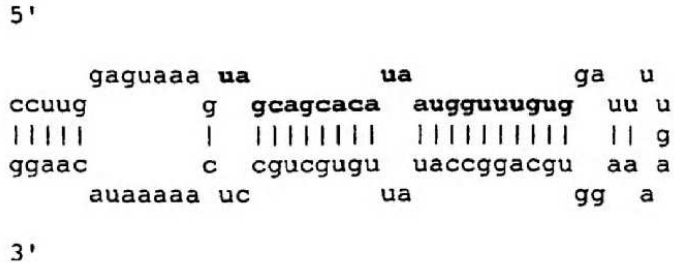


Fig. 28 (2/2)

Secuencias de Hsa miR-15a

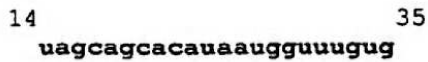
Tallo-Bucle:

Fig. 29



Cuando el miARN se localiza en la cadena superior de la molécula de tallo-bucle, el procesamiento mediante la enzima Dicer da como resultado un extremo 3' único del miR maduro

Maduro:



El apareamiento de un oligonucleótido modificado con LNA pequeño sobre el cebador de RT antes de la reacción de síntesis de ADNc introducirá una estructura helicoidal doble local en el cebador de RT

Reacción de transcriptasa inversa (RT):
Debido a la estructura helicoidal doble local del cebador de RT sólo el miR maduro servirá como molde para la síntesis de ADNc

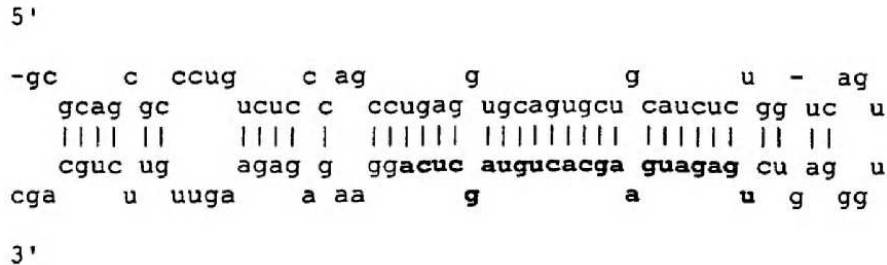
Después de la síntesis de ADNc, la inactivación por calor de la enzima de RT también eliminará por fusión el oligonucleótido modificado con LNA pequeño del ADNc

PCR a tiempo real:
PCR a tiempo real convencional que implica una Taq polimerasa de "inicio en caliente", si se desea. El primer ciclo de PCR debería usar una temperatura de apareamiento reducida en comparación con los 60 °C convencionales, los ciclos de PCR restantes pueden realizarse a condiciones de PCR a tiempo real convencionales

Secuencias de Hsa-miR-143

Tallo-bucle:

Fig. 30



Cuando el miARN se localiza en la cadena inferior de la molécula de tallo-bucle, el procesamiento mediante la enzima Dicer da como resultado un extremo 5' único del miR maduro, mientras que el extremo 3' es idéntico para el pre-miR y el miR maduro.

Maduro:

```

61                               82
ugagaugaagcacuguagcuca
  
```

Reacción de transcriptasa inversa (RT):

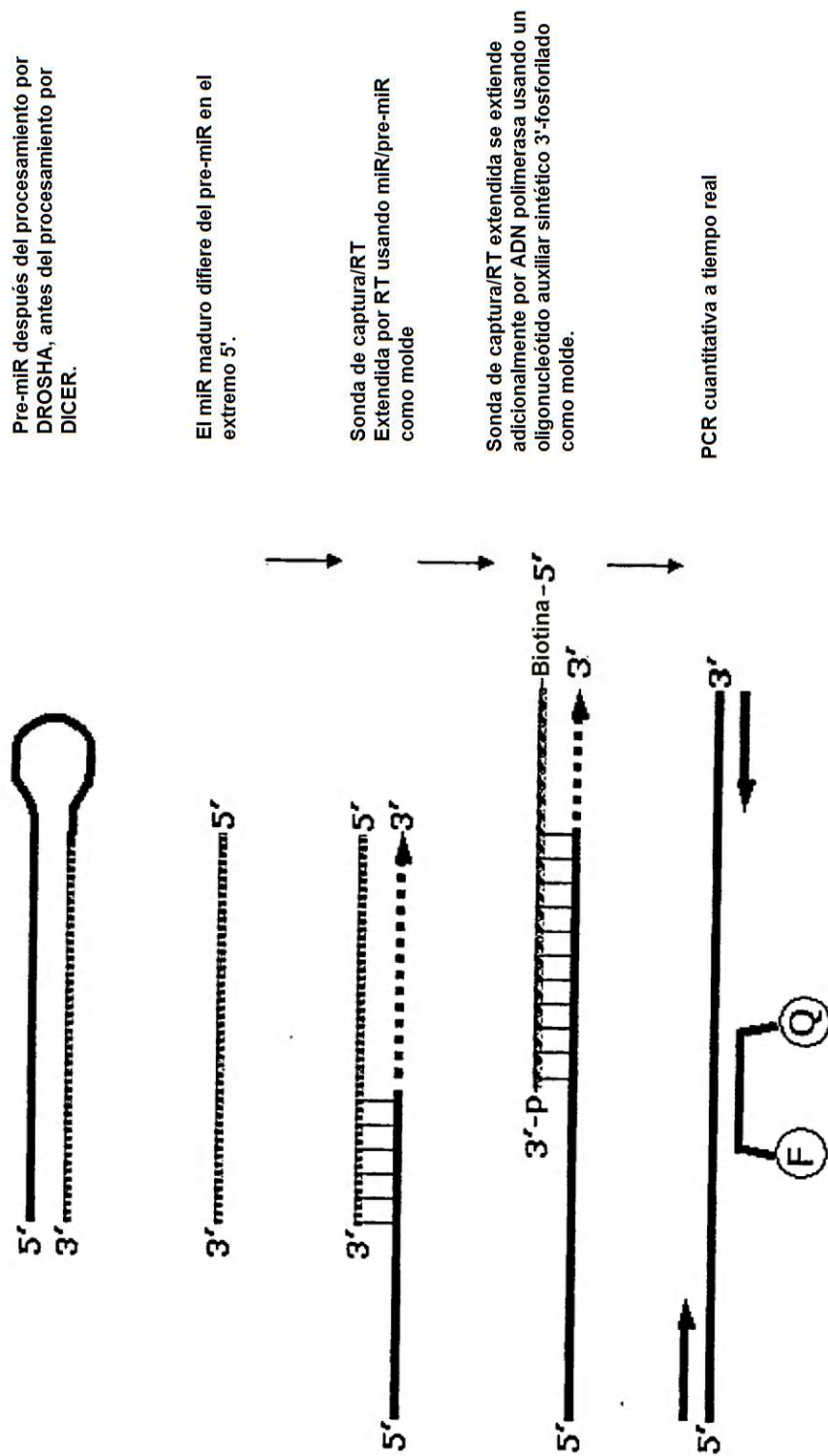
El cebador de RT se apareará tanto con el miR maduro como con el pre-miR (si está presente en la muestra) y la enzima transcriptasa inversa generará una copia de ADNc de ambas moléculas.

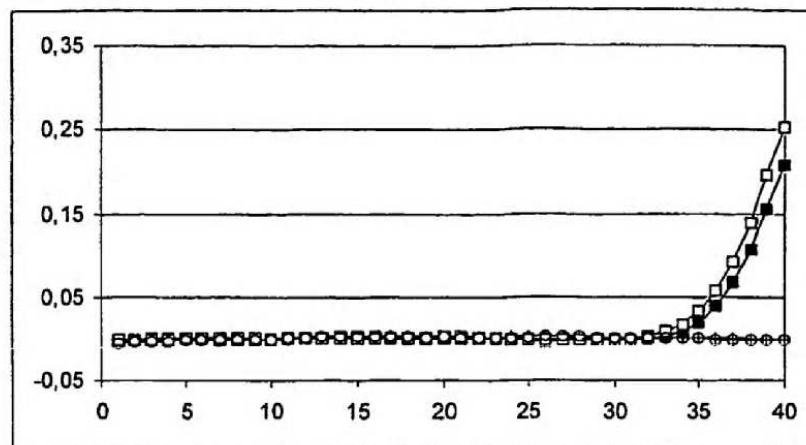
El apareamiento de un oligonucleótido modificado con LNA pequeño sobre el cebador de PCR directo antes de la reacción de PCR introducirá una estructura helicoidal doble local en el cebador de PCR

PCR a tiempo real:

Debido a la estructura helicoidal doble local del cebador de PCR directo, el cebador se apareará preferentemente con el ADNc derivado del miR maduro. El ciclo de PCR inicial, que es en realidad una reacción de extensión de cebador, debería realizarse con una Taq polimerasa que no sea de "inicio en caliente" o una enzima Klenow. La temperatura de apareamiento debería ser de aproximadamente 45 °C o lo bastante baja para asegurar que la estructura helicoidal doble local del cebador de PCR directo sea estable. La temperatura de extensión convencional de 60 °C debería funcionar bien. Los ciclos de PCR restantes pueden realizarse a condiciones de PCR a tiempo real convencionales.

Fig. 31





Los cuadrados en blanco representan la reacción con purificación de la etapa 2, los cuadrados rellenos representan la reacción sin purificación de la etapa 2. Las curvas que no surgen de la línea basal representan los controles "sin miR" correspondientes.

Fig. 32

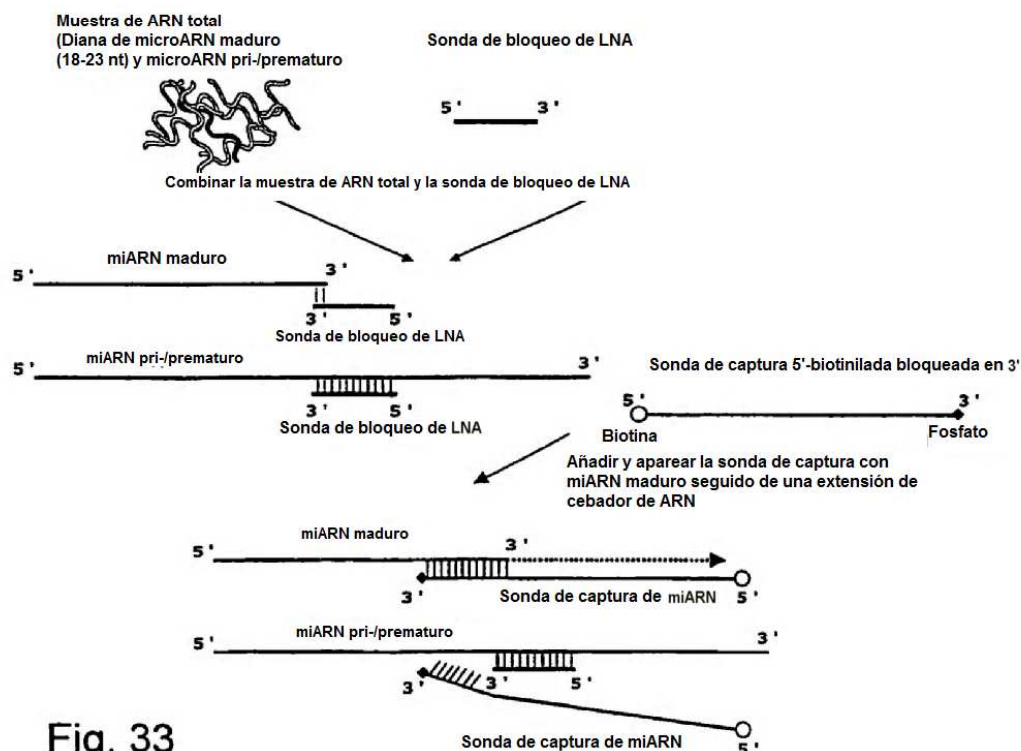
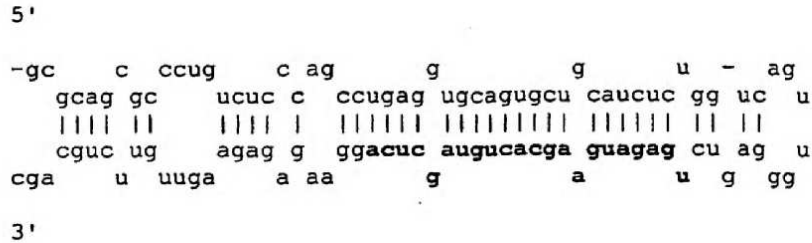


Fig. 33

Secuencias de Hsa- miR-143

Fig. 34

Tallo-bucle:

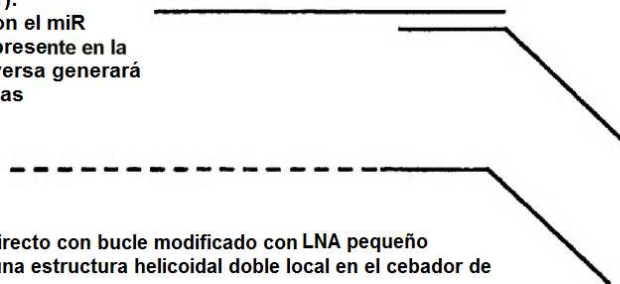


Cuando el miARN se localiza en la cadena inferior de la molécula de tallo-bucle, el procesamiento mediante la enzima Dicer da como resultado un extremo 5' único del miARN maduro, mientras que el extremo 3' es idéntico para el pre-miR y el miR maduro.

Maduro:

61 82
ugagaugaagcacuguagcuca

Reacción de transcriptasa inversa (RT):
 El cebador de RT se apareará tanto con el miR maduro como con el pre-miR (si está presente en la muestra) y la enzima transcriptasa inversa generará una copia de ADNc de ambas moléculas



El apareamiento de un cebador de PCR directo con bucle modificado con LNA pequeño antes de la reacción de PCR introducirá una estructura helicoidal doble local en el cebador de PCR.

PCR a tiempo real:

Debido al cebador de PCR directo con bucle, el cebador se apareará preferentemente con el ADNc derivado del miR maduro. El ciclo de PCR inicial, que es en realidad una reacción de extensión de cebador, debería realizarse con una Taq polimerasa que no sea de "inicio en caliente" o una enzima Klenow. La temperatura de apareamiento debería ser de aproximadamente 45 °C o lo bastante baja para asegurar que la estructura helicoidal doble local del cebador de PCR directo sea estable. La temperatura de extensión convencional de 60 °C debería funcionar bien. Los ciclos de PCR restantes pueden realizarse a condiciones de PCR a tiempo real convencionales.



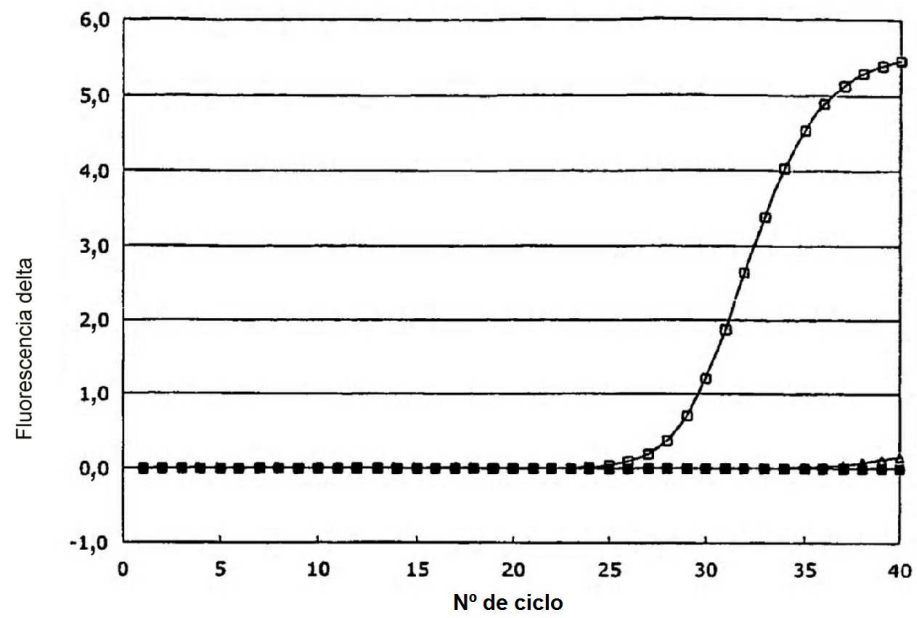


Fig. 35

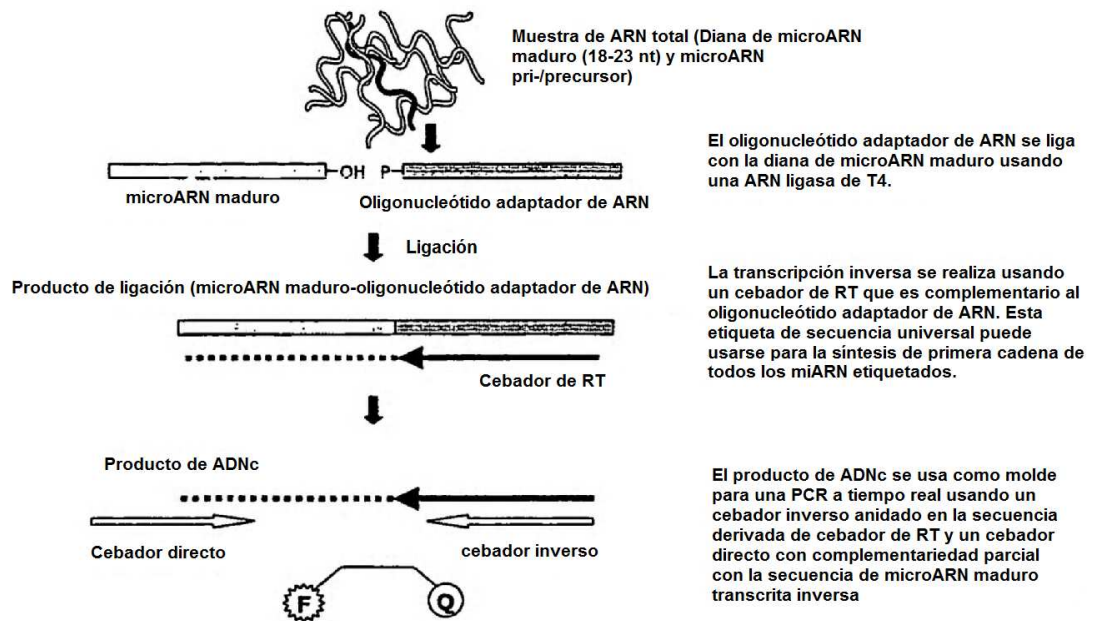


Fig. 36

