

19



OFICINA ESPAÑOLA DE
PATENTES Y MARCAS

ESPAÑA



11 Número de publicación: **2 445 748**

51 Int. Cl.:

C12Q 1/68 (2006.01)

12

TRADUCCIÓN DE PATENTE EUROPEA

T3

96 Fecha de presentación y número de la solicitud europea: **04.12.2001 E 01204688 (4)**

97 Fecha y número de publicación de la concesión europea: **20.11.2013 EP 1229130**

54 Título: **Ensayos basados en ácidos nucleicos de orgánulos celulares endosimbiontes**

30 Prioridad:

04.12.2000 EP 00204322
06.06.2001 EP 01202168

45 Fecha de publicación y mención en BOPI de la traducción de la patente:
05.03.2014

73 Titular/es:

PRIMAGEN B.V. (100.0%)
Bachmanstraat 42
2596 JD Den Haag, NL

72 Inventor/es:

VAN GEMEN, BOB;
DE RONDE, ANTHONIJ;
TIMMERMANS, EVELINE CATHERINA ANNA
CLASINA y
DOBELAER, IRENE JOHANNA MONICA

74 Agente/Representante:

UNGRÍA LÓPEZ, Javier

ES 2 445 748 T3

Aviso: En el plazo de nueve meses a contar desde la fecha de publicación en el Boletín europeo de patentes, de la mención de concesión de la patente europea, cualquier persona podrá oponerse ante la Oficina Europea de Patentes a la patente concedida. La oposición deberá formularse por escrito y estar motivada; sólo se considerará como formulada una vez que se haya realizado el pago de la tasa de oposición (art. 99.1 del Convenio sobre concesión de Patentes Europeas).

DESCRIPCIÓN

Ensayos basados en ácidos nucleicos de orgánulos celulares endosimbiontes

- 5 La invención se refiere al diagnóstico de enfermedad y/o determinación de actuación de organismos celulares, que son de naturaleza multicelular o unicelular, que son visibles por el ojo desnudo o que son un microorganismo.

10 Un especialista de diagnóstico de enfermedad que estudie el (mal) funcionamiento de organismos celulares, puede emplear de forma clásica una amplia serie de incursiones en dicho organismo para obtener información relevante con respecto a los diversos aspectos de dicho mal funcionamiento. Estas incursiones varían ampliamente, los ejemplos varían de detectar relaciones relativas de cálculos renales estudiando muestras urinarias obtenidas de diversos pacientes, de explorar con respecto a la presencia o ausencia de úlceras intestinales mediante endoscopia, de explorar con respecto a tumores detectables por resonancia magnética nuclear (RMN), de detectar diabetes ensayando con respecto a niveles de insulina y/o concentración de glucosa en plasma sanguíneo, a determinar la propensión a cáncer determinando los niveles de transcripción de los oncogenes, y así sucesivamente.

15 En la actualidad, la detección de enfermedad o mal funcionamiento (o viceversa, de salud y funcionamiento apropiado) de organismos superiores, tales como animales y plantas, se basa mucho en ensayar muestras obtenidas de estos organismos y estudiar estas muestras en un laboratorio. Con frecuencia cuando se ha descubierto un método fructífero capaz de determinar, identificar o detectar (aspectos de) una enfermedad o mal funcionamiento de un organismo es en general útil también para ensayar o explorar con respecto a compuestos o métodos útiles para el tratamiento de (aspectos de) dicha enfermedad o mal funcionamiento o útil en los ensayos o exploración con respecto a compuestos o métodos implicados en causar (aspectos de) dicha enfermedad o mal funcionamiento; usando el mismo o un método similar al que se usa en el diagnóstico es posible en general generar una evaluación de la utilidad de dichos compuestos o métodos candidatos al tratar y/o causar la enfermedad o mal funcionamiento en cuestión. Claramente, los laboratorios de ciencias de la vida siempre necesitan otras incursiones más en organismos para obtener aún más información con respecto a enfermedad o mal funcionamiento y compuestos y métodos relacionados con la causa y/o tratamiento de enfermedad o mal funcionamiento.

20 ZHANG H *et al.* ("Quantitation of mitochondrial DNA in human lymphoblasts by a competitive polymerase chain reaction method: application to the study of inhibitors of mitochondrial DNA content.", MOLECULAR PHARMACOLOGY vol. 46, N° 6, Diciembre de 1994, páginas 1063-1069) describe la cuantificación de ADN mitocondrial en linfoblastos humanos (células MOLT-4) por un método de PCR competitiva (cPCR) para estudiar inhibidores del contenido de ADN mitocondrial, tales como ciertos 2',3'-didesoxinucleótidos usados en terapia anti-VIH.

25 La divulgación proporciona un método para determinar el (mal) funcionamiento de un organismo celular que comprende determinar la relación relativa de un ácido nucleico de un orgánulo celular endosimbionte y/o producto génico del mismo en relación con otro ácido nucleico o producto génico presente en una muestra obtenida de dicho organismo. Con respecto a la invención, por una relación relativa se entiende la cantidad de dicho primer ácido nucleico de orgánulo celular endosimbionte y/o producto génico del mismo en relación con la cantidad de dicho segundo ácido nucleico y/o producto génico del mismo. Dicha relación relativa puede determinarse por ejemplo (entre otras cosas) dividiendo la cantidad de dicho primer ácido nucleico o producto génico del mismo por la cantidad de dicho segundo ácido nucleico o producto génico del mismo, o viceversa. La cantidad de uno o ambos compuestos también puede dividirse por, o restarse de, un valor de referencia. Por determinar el funcionamiento de un organismo celular se entiende en el presente documento determinar si dicho organismo celular está en su estado sano natural, o si dicho organismo se ve afectado de alguna manera, por ejemplo por una enfermedad y/o un compuesto (tóxico). Dicha enfermedad y/o compuesto (tóxico) puede afectar a dicho organismo en un grado tal que estén presentes síntomas clínicos. Como alternativa, dicha enfermedad o compuesto (tóxico) puede influir en dicho organismo aunque no se manifiesten (aún) síntomas clínicos.

30 Los orgánulos celulares endosimbionte son los orgánulos de una célula eucariota que se cree que han derivado de bacterias procariotas muy pronto en la evolución de las células eucariotas; estas bacterias (como se cree) han entrado en una simbiosis con células eucariotas tempranas, y en la actualidad, las células eucariotas que comprenden estos orgánulos endosimbiontes en general no puede vivir sin ellos, ninguna de las células eucariotas actuales actuaría apropiadamente sin mitocondrias, y la mayoría de las células vegetales se consideraría al menos que funcionan mal cuando no estuvieran presentes proplástidos, u orgánulos derivados de los mismos, tales como cloroplastos, etioplastos, amiloplastos, elaioplastos o cromoplastos. Parece en general que estos orgánulos son cuerpos al menos parcialmente auto-replicativos que, aunque están bajo algunos controles nucleares, aún poseen una considerable autonomía.

35 En particular, la invención proporciona un método por el que dicha relación relativa de un ácido nucleico de orgánulo celular endosimbionte y/o producto génico del mismo se determina en relación con la cantidad de ácido nucleico esencialmente nuclear detectable en dicha muestra (sea ADN o ARN), o en relación con productos génicos (derivables por la transcripción y/o traducción, tales como ARNm o (poli) péptidos) de dicho ácido nucleico nuclear, (ácido nucleico nuclear en el presente documento comprende ADN cromosómico y el ARN transcrito del mismo), por ejemplo presente en fracciones nucleares o citoplasmáticas o partes de dicha muestra. El ADN o los componentes

codificantes de ARNm correspondientes de ribonucleoproteína nuclear pequeña (SNRNP), u otro ácido nucleico esencialmente habitual derivado de ADN cromosómico, es particularmente útil para ensayar, debido a su presencia ubicua. De esta manera, la invención proporciona un método para estudiar por ejemplo enfermedad relacionada con orgánulos celulares endosimbiontes, como enfermedad relacionada con mitocondrias y/o proplástidos. Por enfermedad relacionada con orgánulos celulares endosimbiontes se entiende en el presente documento una afección en la que la cantidad y/o al menos una propiedad de ácido nucleico de dicho orgánulo celular endosimbionte y/o producto génico del mismo, está alterado en comparación con la situación natural. Por ejemplo, la expresión de dicho ácido nucleico puede estar reducida. La enfermedad relacionada con orgánulos celulares endosimbiontes, por ejemplo, codificada por defectos en el ADN de dicho orgánulo, se manifiesta en muchos síndromes diferentes y es con frecuencia variable en su expresión (y por lo tanto en general es difícil de detectar ensayando con respecto a parámetros clínicos solamente) debido a heteroplasmia, por lo que puede encontrarse ácido nucleico mutante y de tipo silvestre en una célula, por lo que su distribución puede variar. La enfermedad relacionada con orgánulos celulares endosimbiontes se agrava con frecuencia al aumentar la edad del individuo afectado. Con frecuencia pueden observarse también enfermedades relacionadas con orgánulos celulares endosimbiontes después del tratamiento contra otras enfermedades con diversos fármacos, y contribuye después a diversos efectos secundarios de estos fármacos que se querrían evitar durante el tratamiento. Estos efectos secundarios pueden estudiarse ahora mejor usando un método como se proporciona en el presente documento.

Además, la invención proporciona un método por el que dicha relación relativa de un primer ácido nucleico de orgánulo celular endosimbionte y/o producto génico del mismo se determina en relación con la cantidad de un segundo ácido nucleico de orgánulo celular endosimbionte (distinto) detectable en dicha muestra (sea de ADN o ARN), o en relación con productos génicos (derivables por transcripción y/o traducción, tales como ARNm o (poli) péptidos) de dicho ácido nucleico de orgánulo celular endosimbionte. En un aspecto de la invención el método implica determinar una relación entre ADN de orgánulo, tal como ADNmt, y el ARN de orgánulo derivable transcripcionalmente correspondiente, en el ejemplo el ARNmt relacionado, o producto génico traducido. De esta manera, puede determinarse el nivel de transcripción y/o traducción. Una alteración del nivel de transcripción y/o traducción, en comparación con el nivel natural de transcripción y/o traducción, es indicativa de un funcionamiento alterado de dicho orgánulo. Dicho funcionamiento alterado puede ser mal funcionamiento de dicho orgánulo, debido a una enfermedad y/o debido a efectos secundarios de un cierto tratamiento. Dicho mal funcionamiento puede comprender por ejemplo un nivel de transcripción reducido. Como alternativa, dicho funcionamiento alterado puede ser un funcionamiento mejorado de dicho orgánulo, por ejemplo durante el tratamiento y/o curación de una enfermedad relacionada con orgánulo celular endosimbionte.

Dicho mal funcionamiento puede también comprender un nivel de transcripción aumentado. Una enfermedad, o un tratamiento de una enfermedad, puede implicar la reducción de la cantidad de ADN del orgánulo endosimbionte. Sin embargo, dicha reducción puede compensarse al menos en parte por un aumento de la transcripción de dicho ADN, al menos en la primera etapa de dicha enfermedad. De esta manera, la cantidad de ARN derivado de dicho ADN de orgánulo endosimbionte puede no reducirse en absoluto, o reducirse relativamente menos en comparación con la cantidad de dicho ADN de orgánulo endosimbionte. Los efectos secundarios sintomáticos de dicha enfermedad o tratamiento pueden por lo tanto no sentirse aún (completamente). Sin embargo, tras la reducción adicional de la cantidad de dicho ADN de orgánulo endosimbionte, la cantidad de ARN derivada de dicho ADN con el tiempo también bajará significativamente. Pueden entonces producirse efectos secundarios. Convencionalmente, tras la manifestación de efectos secundarios, una enfermedad se trata o un tratamiento se reduce o se detiene. Sin embargo, de esta manera convencional, un paciente ya padece dicho o dichos efectos secundarios. Con un método de la invención, sin embargo, el efecto o los efectos secundarios que implican síntomas clínicos pueden predecirse. Por ejemplo, un nivel alterado de la transcripción y/o traducción de un ácido nucleico de orgánulo celular endosimbionte es indicativo de funcionamiento alterado de un organismo celular, por ejemplo mal funcionamiento de dicho organismo que implica efectos secundarios (futuros). Una alteración de la relación relativa del ADN de orgánulo celular endosimbionte y/o producto génico del mismo en relación con la cantidad de ácido nucleico nuclear o producto génico del mismo también es indicativa de funcionamiento alterado de un organismo celular.

En otro aspecto más, se determina la relación entre dos ADN de orgánulos distintos o productos génicos relacionados. En un aspecto, se proporciona un método en el que dicho primer ácido nucleico de orgánulo celular endosimbionte y dicho segundo ácido nucleico de orgánulo celular endosimbionte se obtienen del mismo tipo de orgánulo. Dicho orgánulo comprende, por ejemplo, una mitocondria.

Un método de la divulgación es particularmente adecuado para determinar el estadio de una enfermedad. Un organismo puede estar ya afectado por una enfermedad, aunque aún no estén presentes esencialmente o estén presentes pocos síntomas clínicos. Sin embargo, aunque no estén esencialmente presentes síntomas clínicos, la relación relativa de un primer ácido nucleico de orgánulo celular endosimbionte y/o producto génico del mismo en relación con la cantidad de un segundo ácido nucleico y/o producto génico del mismo puede ya estar alterada. Como se muestra en los ejemplos, dicha alteración de dicha relación relativa puede determinarse antes de que los síntomas clínicos y/o ensayos convencionales, como la determinación de la relación de lactato piruvato, indiquen un funcionamiento alterado de un organismo. Por lo tanto, dicha relación relativa es muy adecuada para determinar el estadio de una cierta enfermedad. La divulgación proporciona por lo tanto un aspecto un método para determinar el estadio de una enfermedad, que comprende determinar la relación relativa de un ácido nucleico de orgánulo celular endosimbionte y/o producto génico del mismo en una muestra obtenida de un organismo que padece o está

en riesgo de padecer dicha enfermedad.

Un método de la divulgación para determinar el estadio de una enfermedad puede usarse para diagnóstico. Por ejemplo, puede ensayarse rutinariamente a las personas por un método de la invención con ciertos intervalos temporales. Como alternativa, las personas pueden ensayarse en el momento en que tengan algunos síntomas clínicos. Una alteración de dicha relación relativa es indicativa de un cierto grado de enfermedad. No es necesario diagnosticar el tipo de dicha enfermedad por un método de la invención.

Otros usos posibles de la divulgación quedan en los ensayos de fármacos candidatos, para actividad beneficiosa y/o efectos secundarios de posibles medicamentos o composiciones farmacéuticas tales como compuestos anti-parasitarios candidatos, compuestos antibióticos, compuestos citostáticos, y así sucesivamente. Por ejemplo, la invención proporciona un método para determinar la actividad terapéutica y/o efectos secundarios posibles de un compuesto candidato, por ejemplo al determinar su utilidad para el tratamiento del mal funcionamiento de un organismo celular, que comprenden determinar la relación relativa de un ácido nucleico de orgánulo celular endosimbionte y/o producto génico del mismo en una muestra obtenida de dicho organismo, preferentemente dicho organismo o de un organismo esencialmente relacionado, tal como que pertenece a la misma especie o género, al que se ha proporcionado dicho compuesto. Si la relación relativa de un ácido nucleico de orgánulo celular endosimbionte y/o producto génico del mismo, de un cierto organismo se altera después de administrarse dicho compuesto candidato a dicho organismo, esto indica actividad terapéutica y/o efectos secundarios implicados con dicho compuesto cuando se administra a dicho organismo. Adicionalmente, esto también indica la actividad terapéutica y/o efectos secundarios implicados con dicho compuesto en un organismo esencialmente relacionado. Por lo tanto, para determinar la actividad terapéutica y/o efectos secundarios de un compuesto candidato para tratamiento de mal funcionamiento de un organismo celular, no es necesario usar exactamente el mismo organismo en un método de la invención. También puede usarse un organismo esencialmente relacionado.

En otro aspecto, la invención proporciona un método para determinar la actividad terapéutica y/o posibles efectos secundarios de un medicamento que comprende determinar la relación relativa de un ácido nucleico de orgánulo celular endosimbionte y/o producto génico del mismo en una muestra obtenida de un organismo, preferentemente habiéndose proporcionado a dicho organismo dicho medicamento.

Con respecto a la invención, la actividad terapéutica significa la capacidad de al menos en parte, tratar una enfermedad. En una realización de la invención, dicha actividad terapéutica comprende una actividad terapéutica contra una enfermedad relacionada con VIH y/o enfermedad relacionada con tumor. Dicho medicamento puede por ejemplo comprender un citostático, opcionalmente combinado con otra terapia antirretroviral. De acuerdo con el estudio de ATHENA en los Países Bajos, el cuarenta por ciento de los pacientes que se someten a una terapia antirretroviral necesitan cambiar de terapia antirretroviral debido a los efectos secundarios adversos. Por lo tanto, un método de la invención es muy conveniente durante dichas terapias, debido a que dicho método puede detectar los efectos secundarios antes de que estén esencialmente presentes síntomas clínicos (graves). Dicha terapia puede entonces detenerse y/o cambiarse ya antes de que estén esencialmente presentes dichos efectos clínicos. En ese caso dicho síntomas clínicos pueden no presentarse, o hacerlo en menor grado. Esto evitará mucho sufrimiento. Por lo tanto, en un aspecto preferido se proporciona un método de la invención en el que dichos efectos secundarios esencialmente no se manifiestan en el momento en que se realiza dicho método. Con respecto a la invención, por "esencialmente no se manifiesta" se entiende que dicho efecto secundario no se manifiesta (aún), o se manifiesta sólo parcialmente, por síntomas clínicos.

En un aspecto se proporciona un método de la invención en el que dicho compuesto o medicamento comprende un citostático. Los citostáticos habitualmente usados comprenden por ejemplo, compuestos alquilantes, citostáticos antimetabólicos, antibióticos antitumorales e inhibidores de topo-isomerasa. Los ejemplos no limitantes de los mismos comprenden clorambucilo, ciclofosfamida, estramustina, ifosamida, melfalán tiotepa busulfán, treosulfán carmustina, lomustina cisplatino, carboplatino, oxaliplatino dacarbazina, procarbazona, temozolomida vinblastina, vincristina, vindesina docetaxel, paclitaxel daunorrubicina, doxorubicina, epirubicina, idarubicina, mitoxantrona bleomicina, dactinomomicina, mitomicina irinotecán, topotecán etopósido, tenipósido amsacrina, asparaginasa, cladribina, hidroxycarbamida, bentostatina metotrexato y/o raltitrexed.

Durante el tratamiento antirretroviral, y/o tratamiento de enfermedad relacionada con tumor, se usa con frecuencia un análogo de nucleósido y/o nucleótido. Estos análogos implican un alto riesgo de efectos secundarios, debido a que interfieren con los procesos de replicación y/o transcripción de un organismo. La cantidad de ácido nucleico de orgánulo celular endosimbionte por lo tanto también está con frecuencia alterada. Por lo tanto, un método de la invención es muy adecuado cuando se trata de un organismo con un medicamento que implica análogos de nucleósidos y/o nucleótidos.

En un aspecto, la invención proporciona un método de la invención en la que dicho compuesto o medicamento comprende un análogo de nucleósido y/o nucleótido. Son ejemplos no limitantes de dichos análogos fludarabina, mercaptopurina, tioguanina, citarabina, fluorouracilo y/o gemcitabina. En otro aspecto más se proporciona un método de la invención en el que dicho compuesto o medicamento comprende AZT, ddI, ddC, d4T, 3TC y/o tenofovir. En un método de la invención se ha proporcionado preferentemente a dicho organismo o un organismo esencialmente relacionado dicho compuesto u organismo.

El tratamiento de ciertas enfermedades, como por ejemplo una enfermedad relacionada con VIH, debe realizarse durante un periodo largo. Un método de la invención es particularmente adecuado durante el tratamiento de una enfermedad durante un periodo de tiempo largo. Durante dicho periodo largo, pueden evolucionar muchos efectos secundarios, y un paciente puede controlarse ahora regularmente incluso aunque no estén presentes (aún) síntomas clínicos. Por lo tanto, en un aspecto se proporciona un método de la invención en el que dicho medicamento se usa durante al menos 3 meses, preferentemente durante al menos 6 meses, más preferentemente durante al menos 12 meses. En un aspecto, dicho medicamento se usa para el tratamiento de una enfermedad crónica. Por una enfermedad crónica se entiende en el presente documento una enfermedad que no puede curarse completamente. Una vez que un individuo ha adquirido dicha enfermedad, dicha enfermedad siempre está presente en dicho individuo, aunque los síntomas clínicos pueden variar ampliamente. Dichos síntomas pueden en ocasiones incluso no observarse por dicho individuo. Una enfermedad crónica por ejemplo comprende una enfermedad relacionada con VIH.

Por un efecto secundario de un compuesto se entiende en el presente documento otro efecto distinto del fin de dicho compuesto. Dicho efecto secundario puede ser un efecto no deseado. Por ejemplo, un compuesto terapéutico puede contrarrestar una enfermedad y simultáneamente reducir el metabolismo de un organismo. Dicha reducción de dicho metabolismo se denomina entonces efecto secundario (negativo). Como alternativa, un efecto secundario de un compuesto puede ser un efecto beneficioso, como por ejemplo inmunidad contra otra enfermedad más.

Se proporciona en el presente documento uso también para ensayo de toxina (selectivo), de por ejemplo herbicidas, insecticidas, compuestos antiparasitarios, compuestos antibióticos. La divulgación proporciona un método para determinar la actividad tóxica de un compuesto candidato, por ejemplo al determinar su utilidad para provocar mal funcionamiento de un organismo celular, por ejemplo, teniendo un efecto citostático o incluso citotóxico, que comprende determinar la relación relativa de un ácido nucleico de orgánulo celular endosimbionte y/o producto génico del mismo en una muestra obtenida de un organismo, preferentemente dicho organismo u organismo relacionado al que se ha proporcionado dicho compuesto.

En una realización preferida, también se ensaya la selectividad, usando o aplicando el método como se proporciona en el presente documento (preferentemente en experimentos paralelos) en o a un primer organismo y en o a un segundo organismo esencialmente no relacionado, si se desea perteneciente a una familia u orden diferente, pero preferentemente perteneciente a al menos una clase o filo diferente, más preferentemente perteneciente a un reino de organismos diferente. Se ensayan por ejemplo aspectos de la selectividad ensayando los compuestos en (si se desea solamente en células de) un primer organismo diana (tal como una bacteria o parásito) así como ensayando el hospedador o células del mismo, que es un segundo organismo esencialmente no relacionado, por ejemplo un mamífero o planta, o ensayando una planta de cultivo o células de la misma así como ensayando una planta de maleza esencialmente no relacionada o células de la misma con dicho compuesto, para determinar, por ejemplo, los efectos tóxicos selectivos o terapéuticos selectivos. También se proporciona para ensayar células normales derivadas de un individuo en paralelo o en comparación con células aberrantes, tales como células tumorales derivadas del mismo individuo, para detectar o explorar con respecto a un compuesto citotóxico o citostático específico de tumor o al menos selectivo para su uso en terapia de dicho individuo u otros con enfermedad similar o relacionada.

Con un método de la invención, se determina por ejemplo una relación relativa midiendo la cantidad de dicho o dichos ácidos nucleicos y/o productos génicos presentes en dicha muestra, habitualmente después de al menos una etapa de procesamiento, como por ejemplo amplificación de ácido nucleico diana. Después de haberse medido dichas cantidades, puede determinarse dicha relación relativa dividiendo una cantidad entre otra.

Pueden detectarse cantidades mínimas de ácido nucleico diana y cuantificarse usando amplificación enzimática. Son ejemplos de técnicas de amplificación enzimática una reacción en cadena de la polimerasa (PCR)¹, amplificación basada en secuencia de ácidos nucleicos (NASBA)², SDA, TMA y otras. Puede conseguirse amplificación específica de una secuencia de ácido nucleico diana añadiendo dos secuencias de cebadores a una reacción. Puede detectarse una región amplificada al final de una reacción de amplificación por sondas que son específicas para dicha región amplificada. Como alternativa, puede detectarse una región amplificada durante la generación de dicho ácido nucleico amplificado en dicha reacción de amplificación³. En este último protocolo puede hacerse detectable una señal de un marcador unido con una sonda después de que dicha sonda ha hibridado con un ácido nucleico complementario. Son ejemplos de dichas sondas que permiten detección homogénea en tiempo real en reacciones de amplificación TaqMan³ y sondas de Balizas Moleculares^{4, 5}.

La cuantificación de una secuencia de ácido nucleico diana se consigue habitualmente añadiendo una molécula competidora, que se amplifica usando los mismos cebadores y que contiene secuencias que permiten diferenciar entre secuencia de ácido nucleico diana y competidora^{2,6}. La relación entre la secuencia de ácido nucleico diana y competidora amplificada puede usarse para cuantificar dicha secuencia de ácido nucleico. La detección de secuencia de ácido nucleico diana o competidora puede por ejemplo conseguirse al final de la reacción de amplificación por sondas que son específicas para dicha región amplificada de secuencia de ácido nucleico diana o competidor o durante la generación de dicho ácido nucleico amplificado en la reacción de amplificación. En este último protocolo una señal de un marcador unido con una sonda puede hacerse detectable después de que dicha

sonda ha hibridado con un ácido nucleico diana complementario y cuando dicha diana ha excedido un nivel umbral, el tiempo o número de ciclo hasta el positivo. En otros métodos de cuantificación, el tiempo hasta el positivo puede usarse para cuantificación sin adición de un competidor⁷.

5 Un método de la divulgación es muy adecuado para, entre otras cosas, determinar el (mal) funcionamiento de un organismo celular, ensayos de fármacos candidatos y ensayos de toxina selectivos. Muchas reacciones se han
 llevado a cabo usando un método de la divulgación, que se ha demostrado que es una herramienta útil (véase
 ejemplos). Puede obtenerse un resultado aún más preciso usando un método de la invención cuando se evita doble
 dispersión en el resultado. En general, se obtiene doble dispersión en el resultado de un método de la invención
 10 debido a variaciones en las condiciones en diferentes mezclas de reacción. Por ejemplo, para poder detectar y
 cuantificar ácidos nucleicos específicos presentes en una muestra, con frecuencia es necesaria una etapa de
 amplificación. Sin embargo, la temperatura de la mezcla de reacción de ácido nucleico 1 puede ser ligeramente
 mayor que la temperatura de la mezcla de reacción del ácido nucleico 2. Esto puede dar como resultado un mayor
 rendimiento del ácido nucleico 1 y, por lo tanto, una mayor relación de la cantidad de ácido nucleico 1 frente a ácido
 15 nucleico 2 que la que se obtendría si la temperatura de la mezcla de reacción 1 hubiera sido exactamente la misma
 que la temperatura de mezcla de reacción 2. Debido a dicha diferencia de temperatura en dichas mezclas de
 reacción, la relación determinada no es exactamente la misma que la relación real de los dos ácidos nucleicos
 presentes en la muestra inicial. De forma similar, variaciones mínimas en otras condiciones como, por ejemplo, la
 cantidad de enzima añadida pueden conducir a variaciones en las cantidades determinadas de los ácidos nucleicos
 20 1 y 2. Por lo tanto, las cantidades medidas de los ácidos nucleicos 1 y 2 pueden variar independientemente una de
 la otra. Las variaciones independientes en dichas cantidades determinadas pueden dar como resultado una
 variación aún mayor en la relación calculada de dichas cantidades medidas. Esto se denomina la doble dispersión
 en el resultado. Por lo tanto, por doble dispersión se entiende en el presente documento al menos una variación en
 un resultado obtenido, debido a una variación de al menos una condición de reacción en al menos dos mezclas de
 25 reacción. Por ejemplo, la cantidad total de volumen también puede diferir ligeramente entre dos mezclas de
 reacción.

En algunos casos particulares, la doble dispersión en un resultado puede exceder las variaciones de la relación
 relativa de un ácido nucleico de orgánulo celular endosimbionte y/o producto génico del mismo en un organismo que
 30 se debe a una cierta enfermedad o tratamiento. Por ejemplo, con frecuencia se usan inhibidores de polimerasa viral
 para el tratamiento de VIH. Los inhibidores de polimerasa viral también pueden afectar a la polimerasa mitocondrial
 gamma. Por lo tanto, la cantidad de polimerasa mitocondrial gamma puede reducirse durante dicho tratamiento del
 VIH, lo que puede dar como resultado una cantidad reducida de mitocondrias por célula. Una reducción de por
 ejemplo el 50 % de las mitocondrias puede dar como resultado efectos secundarios. La relación del ADN
 35 mitocondrial frente al ADN nuclear puede estar reducido en un factor de 2. Sin embargo, una reducción del ADN
 mitocondrial en un factor de 2 puede en algunos casos quedar dentro de la doble dispersión de la medición de dicha
 relación debido a las variaciones mencionadas en las condiciones. Por lo tanto, esta diferencia biológicamente
 importante en la cantidad de mitocondrias puede no detectarse de forma fiable debido a la doble dispersión en el
 resultado. Por lo tanto, la doble dispersión puede en algunos casos reducir la fiabilidad de la detección de diferencias
 40 biológicamente importantes en una relación de ácidos nucleicos y/o sus productos génicos. Por lo tanto, una
 realización de la presente invención proporciona un método para determinar el funcionamiento de un organismo
 celular, sin doble dispersión en el resultado, que comprende determinar la relación relativa de un primer ácido
 nucleico de orgánulo celular endosimbionte y/o producto génico del mismo en una muestra obtenida de dicho
 organismo en relación con la cantidad de un segundo ácido nucleico y/o producto génico del mismo. Dicha doble
 45 dispersión puede evitarse en una realización preferida de la presente invención mediante la determinación de dicha
 relación en el mismo ensayo. Esto significa que se realiza una etapa de procesamiento y/o una medición de las
 cantidades de al menos 2 ácidos nucleicos y/o productos génicos de los mismos en el mismo ensayo. Con respecto
 a la invención, un ensayo típicamente utiliza una mezcla de reacción. Preferentemente, todos los componentes de
 un ensayo de la invención se mezclan aleatoriamente en dicho ensayo. Dicha mezcla de reacción puede estar
 50 presente en un tubo de reacción.

Sin embargo, un experto en la materia puede pensar en más métodos para evitar la doble dispersión en el resultado.
 Puede por ejemplo usar un recipiente de reacción que se divide en diferentes partes por una membrana (semi)
 permeable. Siempre que al menos una condición de reacción varíe de forma dependiente en dichas partes
 55 diferentes, se evita la doble dispersión y el resultado obtenido será más preciso.

En una realización de la presente invención se amplifican al menos dos secuencias diana en un ensayo. Dichas dos
 secuencias diana puede ser dicho ácido nucleico de orgánulo celular endosimbionte y dicho segundo ácido nucleico.
 Por lo tanto en una realización de la presente invención se proporciona un método de la invención, que comprende
 60 amplificación de dicho ácido nucleico de orgánulo celular endosimbionte y dicho segundo ácido nucleico en el mismo
 ensayo. Cuando se amplifican al menos dos secuencias diana en un ensayo, las variaciones en las condiciones de
 reacción en dicho ensayo pueden influir en la cantidad obtenida de cada secuencia presente en dicho ensayo de
 forma dependiente. Por ejemplo, la cantidad obtenida de cada secuencia presente en dicho ensayo se verá influida
 por la misma temperatura, el mismo volumen global y así sucesivamente. Puede conseguirse detección de dichas
 65 dos secuencias diana usando dos sondas específicas durante la generación de ácidos nucleicos amplificados
 durante una reacción de amplificación. Dichas dos sondas pueden tener cada una un marcador diferente que

5 permita la diferenciación entre dichas dos sondas y de este modo entre dichas dos secuencias diana diferentes. Puede conseguirse cuantificación relacionando el tiempo con el resultado positivo así como la pendiente del aumento de fluorescencia relativo de ambas reacciones de amplificación en tiempo real. Preferentemente, se crea una curva de referencia antes. La cuantificación de dicho ácido nucleico puede después realizarse comparando el
10 valor o los valores obtenidos con dicha curva de referencia. Por lo tanto no hay necesidad de un patrón interno como por ejemplo una molécula competidora. Un método de cuantificación relativa de dos dianas en un ensayo tiene una precisión mejorada en comparación con la cuantificación en dos ensayos separados, y requiere menos tiempo de manipulación y reactivos. Los inventores descubrieron que la duplicación de dos reacciones de amplificación en el mismo tubo proporciona una indicación inmediata de la relación de las dianas. Las condiciones de ambas reacciones
15 de amplificación son iguales, excluyendo variaciones de esas condiciones sin la necesidad de calibradores internos o externos. Por lo tanto, se evita ahora la doble dispersión en el resultado. Por lo tanto, en un aspecto la invención proporciona un método, en el que se determina una relación relativa directamente dividiendo una cantidad de ácido nucleico por otra. Preferentemente, dicha relación relativa se determina por comparación con una curva de referencia. Con respecto a la invención, determinado directamente significa que es posible una indicación inmediata de la relación de las dos dianas, por ejemplo comparando la intensidad de dichos dos marcadores fluorescentes diferentes de dichas dos sondas específicas. En esta realización, se realiza división de una cantidad de ácido nucleico por otra dividiendo la intensidad del marcador fluorescente correspondiente por otro. No se usan patrones internos en un método de la invención en el que dicha relación relativa se determina directamente.

20 En un aspecto, se proporciona un método de la invención en el que dicho ácido nucleico de orgánulo celular, dicho producto génico del mismo, dicho segundo ácido nucleico y/o dicho producto génico del mismo se obtienen de una célula mononuclear de sangre periférica (PBMC) y/o un fibroblasto. Especialmente se prefiere el uso de PBMC porque entonces puede usarse una muestra sanguínea de dicho organismo. Una muestra sanguínea es fácil de obtener y están con frecuencia disponibles cantidades relativamente grandes. Por lo tanto, en una realización preferida se proporciona un método donde dicha muestra comprende una muestra sanguínea.

30 Un método de la invención es especialmente útil para cuantificar un ácido nucleico diana y/o producto génico del mismo con un contenido variable en relación con un ácido nucleico diana y/o producto génico del mismo con un contenido constante. Un ejemplo es la cuantificación del contenido celular variable de ADN mitocondrial con el contenido celular constante del ADN de un gen nuclear (dos por cada célula diploide). Otro ejemplo comprende la cuantificación de ARN expresado de forma variable como ARN mitocondrial con ARN expresado constitutivamente que es esencial para la supervivencia celular como el ARN que codifica SNRP U1A implicado en el corte y empalme u otros ácidos nucleicos esencialmente habituales derivados de ADN nuclear con una presencia ubicua. Los inventores descubrieron que es posible determinar una relación relativa de un factor de 2 a 3.

35 En un aspecto, la invención proporciona un método de la invención en el que dicho primer ácido nucleico comprende ARN y en el que dicho segundo ácido nucleico comprende ADN. Un método de la invención es por ejemplo particularmente adecuado para la cuantificación del contenido celular de ARN mitocondrial con el contenido celular de ADN de un gen nuclear como U1A. Esto se muestra en el Ejemplo 22.

40 Además, la divulgación proporciona un kit de diagnóstico que comprende al menos un medio para realizar un método de acuerdo con la invención, comprendiendo dicho kit al menos un conjunto de sondas o cebadores selectivo para la amplificación y detección de un ácido nucleico relacionado con o derivado de orgánulos celulares endosimbiontes y, cuando se desee, reactivos de amplificación necesarios, tales como los que pueden encontrarse ejemplificados en la descripción detallada del presente documento o que se conocen de otro modo en la técnica. En particular, la divulgación proporciona un kit de diagnóstico en el que dicho kit comprende más de un conjunto de cebadores o sondas para la amplificación de secuencias de ácido nucleico relacionadas con orgánulos celulares, preferentemente complementadas con un conjunto de cebadores o sondas para la amplificación de ácido nucleico
50 relacionado con los cromosomas, tales como un cebador o sonda específico de SNRP. En particular, la divulgación proporciona un kit que comprende al menos un cebador o sonda de la Tabla 1 para la amplificación de secuencias de ácido nucleico relacionadas con orgánulos celulares. Se prefiere por supuesto que dichos reactivos de amplificación, cuando se proporcionan con el kit, comprendan una enzima con actividad transcriptasa inversa, tal como la requerida para amplificación por PCR o NASBA. Por supuesto, también se proporciona en el presente documento un kit que comprende un medio para la detección de un producto génico distinto de ácido nucleico para su uso en un método de acuerdo con la invención.

60 La divulgación proporciona además el uso de un compuesto que puede obtenerse o es detectable por un método de acuerdo con la invención en la preparación de un medicamento, un herbicida, insecticida, anti-parasitario, citostático, etc., y un medicamento, herbicida, insecticida, anti-parasitario, etc. que puede obtenerse, derivarse o identificarse por un método de acuerdo con la invención.

65 La invención se explica adicionalmente en la descripción detallada en el presente documento, donde la mayoría de los ejemplos se dirigen como ejemplo al ensayo de mitocondrias, que son centrales para la provisión y uso de energía en una célula, sin embargo, se entenderá fácilmente que los mismos principios se aplican a ensayos usando otros orgánulos endosimbiontes, tales como cloroplastos, que son centrales para la provisión de carbohidratos a una célula vegetal.

Ejemplos

Ingredientes usados y metodología general

5 En la Tabla 1 se resumen los cebadores y sondas usados en los ejemplos. Se realizaron reacciones de amplificación de ácido nucleico NASBA convencionales en un volumen de reacción de 20 μ l y contenían: Tris 40 mM- pH 8,5, KCl 70 mM, MgCl₂ 12 mM, ditiotreitolo 5 mM, dNTP 1 mM (cada uno), rNTP 2 mM (cada uno), cebador 0,2 μ M (cada uno), baliza molecular 0,05 μ M, sorbitol 375 mM, albúmina de suero bovino 0,105 μ g/ μ l, 6,4 unidades de AMV RT, 32 unidades de ARN polimerasa T7, 0,08 unidades de RNasa H y ácido nucleico de entrada. La mezcla completa, excepto las enzimas, sorbitol y/o albúmina de suero bovino, antes de añadir la mezcla enzimática, se calentó a 65 °C durante 2 minutos para desnaturalizar cualquier estructura secundaria en el ARN y permitir que los cebadores se hibridaran. Después de enfriar la mezcla a 41 °C se añadieron las enzimas. La amplificación tuvo lugar a 41 °C durante 90 minutos en un fluorímetro (CytoFluor 2000) y la señal fluorescente se midió cada minuto (usando el conjunto de filtros 530/25 nm y 485/30 nm). Para la amplificación de secuencias diana de ADN la etapa de desnaturalización 65 °C se reemplazó con una etapa de desnaturalización a 95 °C durante 2 a 5 minutos.

10 Para conseguir cuantificación, se amplificó una serie de diluciones de secuencia diana para un conjunto de cebadores particular y se representaron los puntos temporales en los que las reacciones se hicieron positivas (el tiempo hasta el positivo, TTP) frente a las cantidades de entrada de ácido nucleico. De esta manera se creó una curva de calibración que podría usarse para leer valores de TTP de reacciones con cantidades desconocidas de entrada y deducir la cantidad de entrada. Se muestran ejemplos de curvas patrón típicas para cuantificación de ARN y ADN en la Figura 1.

15 Para algunas de las secuencias diana no estaban disponibles series de dilución con cantidad de copias absoluta fiable determinada. A esas series se les proporcionó una unidad arbitraria como medición en lugar de copias de ADN o ARN, por ejemplo equivalente celular o unidad ET. Como resultado en ocasiones parece que hay menos ARN que ADN, que es lo opuesto de lo que se espera. Se cultivaron células (fibroblastos y PBMC) en condiciones convencionales en medios convencionales conocidos por los expertos en la materia con adición de fármacos o compuestos tóxicos o estimulantes potenciales como se define en los ejemplos. Los ácidos nucleicos se aislaron de las células con el método descrito por Boom *et al* (Boom R, Sol CJ, Salimans MM, Jansen CL, Wertheimvan Dillen PM, van der Noordaa J, 1990. Rapid and simple method for purification of nucleic acids. J Clin Microbiol; 28 (3):495-503) o con kits de aislamiento dedicados obtenidos de Qiagen (Qiagen GmbH, Max Volmer Strasse 4, 40724 Hilden, Alemania) y usados de acuerdo con los protocolos del fabricante. Se analizó una alícuota pequeña del ácido nucleico aislado en un gel de agarosa y el resto se almacenó a -80 °C hasta su análisis posterior. Habitualmente el ácido nucleico se diluyó 10 veces con agua y del ácido nucleico diluido se usaron habitualmente 5 μ l como entrada en las reacciones de amplificación de NASBA.

35

Ejemplo 1

En este ejemplo se explica qué tipo de relaciones pueden medirse con un método de acuerdo con la divulgación y el significado que pueden tener en el sentido de diagnóstico:

40 La invención por ejemplo proporciona determinar la relación relativa de ADN de orgánulos y ADN cromosómico. Esta relación, cuando se compara con valores normales o se determina en al menos dos puntos en el tiempo, muestra la reducción o aumento de orgánulos por célula. También se proporciona determinar la relación de ARN de orgánulos y ARN codificado por cromosoma. Esta relación cuando se compara con los valores normales o se determina en al menos dos puntos en el tiempo, muestra la reducción o aumento de la actividad de transcripción de los orgánulos por célula, normalizada para el estado activo (es decir, estado de transcripción) de la célula.

45 También se proporciona determinación de la relación de ARN de orgánulos y ADN cromosómico. Esta relación cuando se compara con valores normales o se determina en al menos dos puntos en el tiempo, muestra la reducción o el aumento de la actividad de transcripción de orgánulos por célula. También se proporciona determinación de la relación de ADN de orgánulos y ARN de orgánulos. Esta relación, cuando se compara con valores normales o se determina en al menos dos puntos en el tiempo, muestra la reducción o el aumento de la transcripción en el orgánulo, lo que indica la regulación en el nivel transcripcional para conseguir un cierto nivel de ARNm (y por lo tanto proteína).

50 También se proporciona determinación de la relación de ADN de orgánulos y ARN codificado por cromosoma. Esta relación, cuando se compara con los valores normales o se determina en al menos dos puntos en el tiempo, muestra la reducción o el aumento de la transcripción en la célula, en relación con los niveles de transcripción de ARN cromosómico, lo que indica el estado de actividad del orgánulo, que es especialmente útil cuando se determina ARN cromosómico que codifica una proteína de orgánulo u otro componente de la misma.

Ejemplo 2

60

Se cultivaron células de fibroblastos *in vitro* en presencia de los fármacos antivirales DDC, AZT y D4T a dos concentraciones cada uno, 3 μ M y 30 μ M, respectivamente, durante 4 semanas. Como controles también se realizaron cultivos celulares con bromuro de etidio y sin fármacos. Se sabe que el bromuro de etidio agota el ADN mitocondrial completamente de las células y es un control positivo con respecto a conseguir un efecto en el contenido mitocondrial de las células. A intervalos de una semana se recogió parte de las células y se analizó con

65

respecto a la cantidad de ADN mitocondrial (cebadores MtD p1 y MtD p2 y sonda MtD mb) y ADN cromosómico (cebadores SnrpD p1 y SnrpD p2 y sonda SnrpD mb) en el protocolo de NASBA descrito. Los cultivos con AZT, D4T y sin aditivo no mostraron cambio medible en la relación de ADN mitocondrial y ADN cromosómico en el periodo de cultivo de 4 semanas. El cultivo con bromuro de etidio mostró una reducción del contenido de ADN mitocondrial como se esperaba. Se muestran los resultados para DDC en la Figura 2.

Los datos de la Figura 2 muestran claramente una reducción de la cantidad de ADN mitocondrial por célula con más de 2 log y con ello la toxicidad mitocondrial del fármaco antiviral DDC.

Ejemplo 3

Se cultivaron células de fibroblastos *in vitro* en presencia de los fármacos antivirales DDC, AZT y D4T a dos concentraciones cada uno, 3 μ M y 30 μ M, respectivamente, durante 4 semanas. Como controles también se realizaron cultivos celulares con bromuro de etidio y sin fármacos. Se sabe que el bromuro de etidio agota el ADN mitocondrial completamente de las células y es un control positivo con respecto a conseguir un efecto en el contenido de mitocondrias de las células. A intervalos de una semana se recogió parte de las células y se analizó con respecto a cantidad de ARN mitocondrial (cebadores MtR p1 y MtR p2 y sonda MtR mb) y ARN codificado por cromosomas (cebadores SnrpR p1 y SnrpR p2 y sonda SnrpR mb) en el protocolo de NASBA descrito. Los cultivos con AZT, D4T y sin aditivo no mostraron cambio medible en la relación de ARN mitocondrial y ARN codificado por cromosoma en el periodo de cultivo de 4 semanas. El cultivo con bromuro de etidio mostró una reducción del contenido de ARN mitocondrial como se esperaba. Los resultados para DDC se muestran en la Figura 3. Los datos de la Figura 3 muestran claramente una reducción en la cantidad de ARN mitocondrial por célula con al menos 2 log y con ello la toxicidad mitocondrial del fármaco antiviral DDC. El punto temporal a las 3 semanas tiene un valor muy bajo y supuestamente esta es una medición algo discrepante.

Ejemplo 4

Se cultivaron células de fibroblastos *in vitro* en presencia de los fármacos antivirales DDC, AZT y D4T a dos concentraciones cada uno, 3 μ M y 30 μ M, respectivamente, durante 4 semanas. Como controles también se realizaron cultivos celulares con bromuro de etidio y sin fármacos. Se sabe que el bromuro de etidio agota el ADN mitocondrial completamente de las células y es un control positivo con respecto a conseguir un efecto en el contenido de mitocondrias de las células. A intervalos de una semana se recogió parte de las células y se analizó con respecto a cantidad de ARN mitocondrial (cebadores MtR p1 y MtR p2 y sonda MtR mb) y ADN cromosómico (cebadores SnrpD p1 y SnrpD p2 y sonda SnrpD md) en el protocolo de NASBA descrito.

Los cultivos con AZT, D4T y sin aditivo no mostraron cambio medible en la relación de ARN mitocondrial y ADN cromosómico en el periodo de cultivo de 4 semanas. El cultivo con bromuro de etidio mostró una reducción en el contenido de ARN mitocondrial como se esperaba. Los resultados para DDC se muestran en la Figura 4.

Los datos de la Figura 4 muestran claramente una reducción en la cantidad del ARN mitocondrial por célula con casi 3 log y con ello la toxicidad mitocondrial del fármaco antiviral DDC. El punto temporal a las 3 semanas tiene un valor muy bajo y supuestamente esta es una medición algo discrepante.

Ejemplo 5

Se cultivaron células de fibroblastos *in vitro* en presencia de los fármacos antivirales DDC, AZT y D4T a dos concentraciones cada uno, 3 μ M y 30 μ M, respectivamente, durante 4 semanas. Como controles se realizaron también cultivos celulares con bromuro de etidio y sin fármacos. Se sabe que el bromuro de etidio agota el ADN mitocondrial completamente de las células y es un control positivo con respecto a conseguir un efecto en el contenido de mitocondrias de las células. A intervalos de una semana se recogió parte de las células y se analizó con respecto a la cantidad de ARN mitocondrial (cebadores MtR p1 y MtR p2 y sonda MtR mb) y ADN mitocondrial (cebadores MtB p1 y MtD p2 y sonda MtD mb) en el protocolo de NASBA descrito.

Los cultivos con AZT, D4T y sin aditivo no mostraron cambios medibles en la relación de ARN mitocondrial y ADN mitocondrial en el periodo de cultivo de 4 semanas. El cultivo con bromuro de etidio mostró una reducción en el contenido de ARN y ADN mitocondrial como se esperaba. Los resultados para DDC se muestran en la Figura 5.

Los datos de la Figura 5 muestran claramente que la relación de ADN y ARN mitocondrial no cambia significativamente durante el periodo de 4 semanas. El punto temporal a las 3 semanas en la figura 5 tiene un valor bajo para ARN mitocondrial que se muestra, esta medición es supuestamente una medición algo discrepante.

Ejemplo 6

Se cultivaron células de fibroblastos *in vitro* en presencia de los fármacos antivirales DDC, AZT y D4T a dos concentraciones cada uno, 3 μ M y 30 μ M, respectivamente, durante 4 semanas. Como controles se realizaron también cultivos celulares con bromuro de etidio y sin fármacos. Se sabe que el bromuro de etidio agota el ADN mitocondrial completamente de las células y es un control positivo con respecto a conseguir un efecto en el contenido de mitocondrias de las células. A intervalos de una semana se recoge parte de las células y se analiza con respecto a la cantidad de ARN codificado por cromosoma (cebadores SnrpR p1 y SnrpR p2 y sonda SnrpR mb) y ADN cromosómico (cebadores SnrpD p1 y SnrpD p2 y sonda SnrpD mb) en el protocolo de NASBA descrito.

Los cultivos con AZT, D4T, bromuro de etidio y sin aditivo no mostraron cambio medible en la relación en el periodo de cultivo de 4 semanas. Los resultados para DDC se muestran en la Figura 6.

Los datos en la Figura 6 muestran claramente que la relación de ADN y ARN cromosómico no cambia significativamente durante el periodo de 4 semanas.

5

Ejemplo 7

Se cultivaron células de fibroblastos *in vitro* en presencia del fármaco antiviral DDC a una concentración de 30 μM durante 4 semanas. Después de ese periodo el cultivo celular continuó pero ahora en ausencia de DDC. Durante este periodo de cultivo sin DDC se recogió parte de las células y se analizó con respecto a la cantidad de ADN mitocondrial (cebadores MtD p1 y MtD p2 y sonda MtD mb) y ADN cromosómico (cebadores SnrpD p1 y SnrpD p2 y sonda SnrpD mb) en el protocolo de NASBA descrito a intervalos de dos semanas durante un periodo de 12 semanas. Los resultados del análisis se muestran en la Figura 7.

10

15

Los resultados de la Figura 7 muestran claramente que la cantidad de mitocondrias por célula aumenta en más de 2 log después de retirarse DDC del cultivo. Este resultado muestra que el efecto tóxico de DDC puede invertirse si aún quedan algunas mitocondrias en las células para repoblar las células de nuevo crecimiento.

Ejemplo 8

Se cultivaron células de fibroblastos *in vitro* en presencia del fármaco antiviral DDC a una concentración de 30 μM durante 4 semanas. Después de ese periodo el cultivo celular continuó pero ahora en ausencia de DDC. Durante este periodo de cultivo sin DDC se recogió parte de las células y se analizó con respecto a la cantidad de ARN mitocondrial (cebadores MtR p1 y MtR p2 y sonda MtR mb) y ARN codificado por cromosoma (cebadores SnrpR p1 y SnrpR p2 y sonda SnrpR mb) en el protocolo de NASBA descrito a intervalos de dos semanas durante un periodo de 12 semanas. Los resultados del análisis se muestran en la Figura 8.

20

25

Los resultados de la Figura 8 muestran claramente que la cantidad de ARN mitocondrial por célula aumenta en más de 2 log después de retirarse DDC del cultivo. Estos resultados muestran que el efecto tóxico de DDC puede invertirse y que la función de las mitocondrias vuelve como se muestra por la síntesis de ARN y posteriormente proteínas.

30

Ejemplo 9

Se cultivaron células mononucleares de sangre periférica nueva (PBMC) de un donante de sangre sano *in vitro* en presencia de los fármacos antivirales DDC, AZT y D4T a dos concentraciones cada uno, 6 μM y 60 μM , respectivamente, durante 5 días. Como controles también se realizaron cultivos celulares con DMSO y sin fármacos. DMSO es parte del disolvente en el que se solubilizan los fármacos. Después de 5 días las células se recogieron y se analizaron con respecto a la cantidad de ADN mitocondrial (cebadores MtD p1 y MtD p2 y sonda MtD mb) y ADN cromosómico (cebadores SnrpD p1 y SnrpD p2 y sonda SnrpD mb) en el protocolo de NASBA descrito.

35

40

Los cultivos con AZT, D4T, DMSO y sin aditivo no mostraron cambio medible en relación en los 5 días de periodo de cultivo. Los resultados para DDC se muestran en la Figura 9.

Los resultados en la Figura 9 muestran claramente la reducción en PBMC del ADN mitocondrial por célula de más de 1 log durante el periodo de cultivo de 5 días.

45

Ejemplo 10

Se cultivaron células mononucleares de sangre periférica nueva (PBMC) de un donante de sangre sano *in vitro* en presencia de los fármacos antivirales DDC, AZT y D4T a dos concentraciones cada uno, 6 μM y 60 μM , respectivamente, durante 5 días. Como controles se realizaron también cultivos celulares con DMSO y sin fármacos. El DMSO es parte del disolvente en el que se solubilizan los fármacos. Después de 5 días las células se recogieron y se analizaron con respecto a la cantidad de ARN mitocondrial (cebadores MtR p1 y MtR p2 y sonda MtR mb) y ARN codificado por cromosoma (cebadores SnrpR p1 y SnrpR p2 y sonda SnrpR mb) en el protocolo de NASBA descrito.

50

55

Los cultivos con AZT, D4T, DMSO y sin aditivos no mostraron cambios medibles en la relación en los 5 días de periodo de cultivo. Los resultados para DDC se muestran en la Figura 10. Resulta interesante que los resultados de la Figura 10 no muestran claramente una reducción en las PBMC del ARN mitocondrial por célula durante el periodo de cultivo de 5 días a la mayor concentración de DDC usada. Esto se diferencia del ADN mitocondrial como se muestra en el Ejemplo 9. Probablemente, la reducción en el ADN mitocondrial se compensa por un aumento en la transcripción, manteniendo el nivel de ARN mitocondrial. Este mecanismo retarda la reducción del ARN mitocondrial. En consecuencia, se puede decir que el ARN mitocondrial es un reflejo del estado actual de la funcionalidad de las mitocondrias y que el ADN mitocondrial es predictivo de lo que sucederá en el futuro (cercano) con la función mitocondrial y por lo tanto tiene un carácter más pronóstico.

60

65

Ejemplo 11

Usando los cebadores y sondas Rubisco-DNA p1, Rubisco-DNA p2, Rubisco-DNA MB, Rubisco-RNA p1, Rubisco-RNA p2 y Rubisco-RNA-MB (Tabla 1) se puede cuantificar el ADN y ARN de cloroplastos de *Oryza sativum* (arroz) y puede determinarse la relación del ADN y ARN cromosómico usando los cebadores y sondas OryzaDNA p1, OryzaDNA p2, OryzaDNA mb, OryzaRNA p1, OryzaRNA p2, OryzaRNA mb (Tabla 1). Durante la aplicación de compuestos herbicidas (u otros) pueden evaluarse las condiciones de las plantas midiendo el contenido de ácido nucleico de cloroplastos de las células usando métodos de amplificación como PCR y NASBA que se conocen por los expertos en la materia. Al mismo tiempo, usando conjuntos de cebadores adecuados para malezas, puede controlarse el deterioro de las plantas no deseadas. Resulta evidente que estas herramientas moleculares son muy adecuadas en la investigación para nuevos herbicidas que ataquen específicamente a un grupo de plantas y no a otros.

Ejemplo 12

En este ejemplo las reacciones de amplificación de ácido nucleico de NASBA para secuencias diana de ADN se realizaron en un volumen de reacción de 20 μ l y contenían: Tris 40 mM - pH 8,5, KCl 70 mM, MgCl₂ 12 mM, ditiotreitól 5 mM, dNTP 1 mM (cada uno), rNTP 2 mM (cada uno), cebadores 0,2 μ M (cada uno), baliza molecular 0,05 μ M, 1,5 unidades de enzima de restricción Msp I, sorbitol 375 mM, albúmina de suero bovino 0,105 μ g/ μ l, 6,4 unidades de AMV RT, 32 unidades de ARN polimerasa T7, 0,08 unidades de RNasa H y ácido nucleico de entrada. La mezcla completa, excepto las enzimas, sorbitol y albúmina de suero bovino, antes de añadir la mezcla enzimática, se incubó a 37 °C durante 25 minutos y posteriormente se calentó a 95 °C durante dos minutos para desnaturalizar el ADN y permitir que los cebadores se hibridaran. Después de enfriar la mezcla a 41 °C se añadió la mezcla enzimática. La amplificación tuvo lugar a 41 °C durante 90 minutos en un fluorímetro (CytoFluor 2000) y se midió la señal fluorescente cada minuto (usando el conjunto de filtros 530/25 nm y 485/30 nm). Para conseguir cuantificación, se amplificó una serie de diluciones de secuencia diana para un conjunto de cebadores particular y se representaron los puntos temporales en los que las reacciones se volvieron positivas (el tiempo hasta el positivo, TTP) frente a las cantidades de entrada de ácido nucleico. De este modo se creó una curva de calibración que podría usarse para leer los valores de TTP de reacciones con cantidades desconocidas de entrada y deducir la cantidad de entrada. Se cultivaron células mononucleares de sangre periférica nueva (PBMC) de un donante de sangre sano *in vitro* durante 5 días. Después de 5 días las células se recogieron y se analizaron con respecto a la cantidad de ADN cromosómico (cebadores SnrpD p1 y SnrpD2 p2 y sonda SnrpD mb) con el protocolo de NASBA descrito en el capítulo "ingredientes usados y metodología general" y se compararon con el protocolo de NASBA como se describe en este ejemplo. Como puede verse claramente en la Figura 11 las reacciones de NASBA de ADN con pretratamiento de enzima de restricción rinden mucho mejor que sin él. El fundamento para esta observación es la extensión directa desde el 3' creado por Msp I sobre la parte del promotor de T7 del cebador p1.

Ejemplo 13

Usando los cebadores y sondas tRNA-L-D p1, tRNA-L-D p2, tRNA-L-D MB, petB RNA p1, petB RNA p2 y petB RNA MB (Tabla 1) puede cuantificarse el ADN y ARN de cloroplastos de *Oryza sativum* (arroz) y puede determinarse la relación del ADN y ARN cromosómico usando los cebadores y sondas OryzaDNA p1, OryzaDNA p2, OryzaDNA mb, OryzaRNA p1, OryzaRNA p2, OryzaRNA mb (Tabla 1). Durante la aplicación de compuestos herbicidas (u otros) pueden evaluarse las condiciones de las plantas midiendo el contenido de ácido nucleico de cloroplastos de las células usando métodos de amplificación como PCR y NASBA que se conocen por los expertos en la materia. Al mismo tiempo, usando conjuntos de cebadores adecuados para malezas, puede controlarse el deterioro de las plantas no deseadas. Resulta evidente que estas herramientas moleculares son muy adecuadas en la investigación de nuevos herbicidas que atacan específicamente un grupo de plantas y no otros.

Ejemplo 14

Se mezclaron miles de moléculas de plásmido que contenía ADN Snrp con 4×10^5 , 2×10^5 , 10^5 , 5×10^4 , $2,5 \times 10^4$ o 10^4 moléculas de plásmido que contenían ADN mitocondrial, y la mezcla se usó como entrada para las reacciones. Se preparó una mezcla de reacción similar a la del Ejemplo 12, excepto que los cebadores y balizas difirieron para amplificar ADN mitocondrial y nuclear Snrp en un tubo. La mezcla de reacción (mezcla doble) contenía dos conjuntos de cebadores y baliza: SnrpD p1 y SnrpD p2, y MtD p1_2 y MtD p2_2 (cada uno 0,2 μ M) con balizas SnrpD mb (marcada con ROX) y MtD mb_2 (marcada con FAM) (cada una 0,05 μ M). Se realizaron digestión con enzimas de restricción, amplificación y detección como en el Ejemplo 12. Se adaptaron los conjuntos de filtros del fluorímetro (CytoFluor 2000) para medir simultáneamente el marcador FAM y el ROX (485/20 y 530/25 para FAM, 590/20 y 645/40 para ROX). En una reacción doble con dos amplificaciones de competición la relación de la pendiente de las curvas de fluorescencia en el tiempo es proporcional a la relación de la cantidad de las moléculas de cada especie amplificada (véase la Figura 12).

Ejemplo 15

Se cultivaron PBMC en ausencia y presencia de ddC 5 μM . Después de 5 días se extrajeron muestras de PBMC. Los ácidos nucleicos se aislaron de 10^5 PBMC de acuerdo con el método descrito por Boom *et al.* y se disolvieron en 50 μl de agua sin RNasa y DNasa. Se realizó una dilución 1:10 y 1:100, y se pusieron 5 μl de la dilución (equivalente a 1000 o 100 PBMC, respectivamente) en la mezcla de reacción para amplificar las dianas específicas. En paralelo, se mezclaron 10^3 moléculas de plásmido que contenía ADN Snrp con 4×10^5 , 2×10^5 , 10^5 o 5×10^4 moléculas de plásmido que contenía ADN mitocondrial, y la mezcla se usó como entrada para las reacciones. Se preparó una mezcla de reacción similar a la del Ejemplo 12, excepto que los cebadores y balizas diferían para amplificar ADN mitocondrial y nuclear Snrp en un tubo. La mezcla de reacción (mezcla doble) contenía dos conjuntos de cebadores y baliza: SnrpD p1 and SnrpD p2, and MtD p1_2 and MtD p2_2 (cada uno 0,2 μM) con las balizas SnrpD mb (marcada con ROX) y MtD mb_2 (marcado con FAM) (cada una 0,05 μM). Se realizaron digestión con enzimas de restricción, amplificación y detección como en el Ejemplo 12. Los conjuntos de filtros del fluorímetro (CytoFluor 2000) se adaptaron para medir simultáneamente el marcador FAM y el ROX (485/20 y 530/25 para FAM, 590/20 y 645/40 para ROX). En una reacción doble con dos amplificaciones de competición la relación de la pendiente de las curvas de fluorescencia en el tiempo es proporcional a la relación de la cantidad de las moléculas de cada especie amplificada. Se usaron los datos de las mezclas de ADN mitocondrial/Snrp plasmídico para crear una curva patrón en la que podría evaluarse la relación desconocida de ADN mitocondrial y nuclear Snrp de las muestras de PBMC en las diluciones 1:10 y 1:100 en ausencia y presencia de ddC 5 μM (véase Figura 13).

Ejemplo 16

De un paciente infectado por VIH-1 que murió como resultado de acidosis láctica grave se analizaron 4 muestras sanguíneas con respecto al contenido mitocondrial de las células mononucleares de sangre periférica (PBMC). La muestra 1 se tomó 1 año antes del momento de la muerte, la muestra 2 se tomó 3 meses antes del momento de la muerte, la muestra 3 se tomó 1,5 meses antes del momento de la muerte y la muestra 4 se tomó justo antes de la muerte. La sangre se usó para preparar células mononucleares de sangre periférica (PBMC) por purificación de Ficoll-Isopaque. Se congelaron de forma viable PBMC en medio más DMSO 5 % y se almacenaron en nitrógeno líquido hasta su uso. Se extrajeron ácidos nucleicos de 10^5 PBMC usando el método de Boom. Se usaron ácidos nucleicos equivalentes de 1000 PBMC como entrada para el NASBA que mide el ADN mitocondrial (cebadores MtD p1 y MtD p2 y sonda MtD mb) y el NASBA que mide el ADN cromosómico (cebadores SnrpD p1 y SnrpD P2 y sonda SnrpD mb). Véase Tabla 1 para secuencias de cebadores y sondas. El resultado de este ensayo se expresa como las copias de ADN mitocondrial por copia de ADN cromosómico (véase Figura 14).

Ejemplo 17

Se analizaron diferentes relaciones de dianas de ADN mitocondrial y cromosómico en plásmidos en este ejemplo: se incluyeron 2×10^3 moléculas de ADN de U1a/ 8×10^3 de ADN de Mt, 2×10^3 de ADN de U1a/ 2×10^4 de ADN de Mt, 2×10^3 de ADN de U1a/ 4×10^4 de ADN de Mt, 2×10^3 de ADN de U1a/ 10^5 de ADN de Mt, 2×10^3 de ADN de U1a/ 2×10^5 de ADN de Mt, 2×10^3 de ADN de U1a/ 4×10^5 de ADN de Mt y 2×10^3 de ADN de u1a/ 8×10^5 de ADN de Mt. Se preparó una mezcla de reacción similar a la del Ejemplo 12, excepto que los cebadores y las balizas difirieron para amplificar ADN cromosómico y mitocondrial en un tubo. La mezcla de reacción (mezcla doble) contenía dos conjuntos de cebadores y balizas: SnrpD p1 y SnrpD2 p2 (primer conjunto de cebadores, cada uno 0,2 μM), y MtD p1_2 y MtD P2_2 (segundo conjunto de cebadores, cada uno 0,3 μM) con las balizas SnrpD mb_2 (marcado con FAM) y MtD mb_3 (marcado con ROX) (cada uno 0,04 μM). Véase Tabla 1 para secuencias de sondas y cebadores. Se realizaron digestión con enzimas de restricción, amplificación y detección como en el Ejemplo 12. Se adaptaron los conjuntos de filtros del fluorímetro (CytoFluor 2000 o analizador EasyQ) para medir simultáneamente el marcador FAM y el ROX (485/20 y 530/25 para FAM, 590/20 y 645/40 para ROX). En una reacción doble con dos amplificaciones de competición la relación de la pendiente de las curvas de fluorescencia en el tiempo es proporcional a la relación de la cantidad de moléculas de cada especie amplificada. Los resultados se muestran en la Figura 16. La relación entre la proporción de las pendientes de señal de FAM y ROX es lineal para la proporción de ADN mitocondrial y ADN cromosómico en la entrada. Este resultado puede usarse para generar una curva de calibración y el número de copias de ADN mitocondrial por célula puede calcularse a partir de esta curva de calibración convencional.

Ejemplo 18

Se cultivaron fibroblastos en presencia del fármaco antirretroviral ddC (30 μM) durante 4 semanas. Después de ese periodo, el cultivo celular continuó, en presencia, pero también en ausencia de ddC durante otras 6 semanas. Durante este periodo de cultivo, parte de las células se recogieron y se analizaron con respecto a la relación de lactato-piruvato usando métodos convencionales conocidos por los expertos en la materia. Los resultados de las mediciones de la relación lactato-piruvato se muestran en la Figura 17.

Los datos de la Figura 17 muestran claramente que en presencia de ddC la relación de lactato-piruvato aumenta, pero puede observarse aumento significativo solamente después de 4 semanas de cultivo. Durante el cultivo

continuado en presencia de ddC la relación de lactato-piruvato permanece alta, sin embargo, en cultivo continuado después de la semana 4 en ausencia de ddC, la relación de lactato-piruvato se reduce a niveles normales. Además, las mismas muestras se usaron para determinar la relación de ADN mitocondrial y ADN cromosómico como se describe en el Ejemplo 17. Los resultados se muestran en la Figura 18.

5 Los datos de la Figura 18 muestran claramente que en presencia de ddC los fibroblastos pierden su ADN mitocondrial (caída de la línea negra en los paneles superiores). Ya puede observarse un aumento significativo del contenido de ADN mitocondrial después de 2 semanas y apenas puede observarse ningún ADN mitocondrial después de 3 semanas de cultivo en presencia de ddC. Estos datos se diferencian de las mediciones tradicionales de lactato-piruvato en las que un cambio significativo podría observarse solamente después de 4 semanas. Estos resultados muestran claramente el valor predictivo de la medición del contenido de ADN mitocondrial para efectos sobre la funcionalidad en el tiempo.

10 En el cultivo continuado en presencia de ddC la cantidad de ADN mitocondrial permanece muy baja (dos paneles inferiores izquierdos). El cultivo continuado en ausencia de ddC muestra un claro rebote en la cantidad de ADN mitocondrial en los fibroblastos (dos paneles inferiores derechos).

Ejemplo 19

20 Se cultivaron PBMC en presencia del fármaco antirretroviral ddC (5 μ M) y con una concentración correspondiente del disolvente (DMSO) del fármaco como un control, durante 11 días. Durante este periodo de cultivo, cada dos días se recogió parte de las células y se analizó con respecto a la relación de ADN mitocondrial y ADN de U1a como se ha descrito en el Ejemplo 17. Los resultados se muestran en la Figura 19.

25 Los datos de este experimento muestran claramente que el contenido de ADN mitocondrial de PBMC en cultivo en presencia de ddC se reduce rápidamente. El día dos el contenido de ADN mitocondrial de las PBMC cultivadas en presencia de ddC se ha reducido al 20 %, en comparación con cultivos de control. El número de copias de ADN mitocondrial en PBMC se reduce adicionalmente a niveles indetectables el día 11 del cultivo en presencia de ddC.

Ejemplo 20

30 Se seleccionaron aleatoriamente cuarenta y ocho pacientes infectados por VIH-1 para terapia antiviral con AZT, AZT + ddl o AZT + ddC. Se extrajo sangre en la semana 0, 4, 24 y 48 semanas después del inicio de la terapia. La sangre se usó para preparar células mononucleares de sangre periférica (PBMC) por purificación de Ficoll-Isopaque. Las PBMC se congelaron de forma viable en medio más DMSO 5 % y se almacenaron en nitrógeno líquido hasta su uso.

35 Se extrajeron ácidos nucleicos de 10^5 PBMC usando el método de Boom. Se usaron ácidos nucleicos equivalentes de 1000 PBMC como entrada para el NASBA doble en tiempo real de un tubo que mide el ADN tanto mitocondrial como cromosómico como se descrito en el Ejemplo 17. El resultado de este ensayo se expresa como el contenido de ADN mitocondrial por célula (es decir, PBMC) de la muestra del paciente. Los resultados se resumen en la Tabla 2.

40 El contenido de ADNmt de las PBMC de los pacientes al comienzo de la terapia se comparó con el contenido de ADNmt a la semana 4, 24 y 48 y se analizó con respecto a cambios estadísticamente significativos (véase Tabla 3 y Figuras 20 + 21). Los datos muestran claramente que los pacientes que se someten a terapia que contiene AZT + ddl o ddC experimentan una reducción significativa del contenido de ADN mitocondrial en sus PBMC.

Ejemplo 21

50 Se analizaron diferentes relaciones de diana de ARN mitocondrial y diana de ADN cromosómico en un plásmido en este ejemplo: se incluyeron 2×10^3 moléculas de ADN de U1a/ 5×10^4 de ARN de Mt, 2×10^3 de ADN de U1a/ $2,5 \times 10^5$ de ARN de Mt, 2×10^3 de ADN de U1a/ 5×10^5 de ARN de Mt, 2×10^3 de ADN de U1a/ $2,5 \times 10^6$ de ARN de Mt, 2×10^3 de ADN de U1a/ 5×10^6 de ARN de Mt, 2×10^3 de ADN de U1a/ 10^7 de ARN de Mt, 2×10^3 de ADN de U1a/ $2,5 \times 10^7$ de ARN de Mt. Se preparó una mezcla de reacción similar a la del Ejemplo 12, excepto que los cebadores y las balizas diferían para amplificar ADN cromosómico y ARN mitocondrial en un tubo. La mezcla de reacción (mezcla doble) contenía dos conjuntos de cebadores y balizas: SnrpD p1 y SnrpD2 p2 (primer conjunto de cebadores, cada uno de 0,1 μ M) y MtR p1_2 y MtR P2_2 (primer conjunto de cebadores, cada uno 0,4 μ M) con las balizas SnrpD mb (marcada con ROX) y MtR mb (marcada con FAM) (cada una 0,04 μ M). Véase la Tabla 1 para secuencias de cebadores y sondas. Se realizaron digestión con enzimas de restricción, amplificación y detección como en el Ejemplo 12. Se adaptaron los conjuntos de filtros del fluorímetro (CytoFluor 2000 o EasyQ) para medir simultáneamente el marcador FAM y el ROX (485/20 y 530/25 para FAM, 590/20 y 645/40 para ROX). En una reacción doble con dos amplificaciones de competición la relación de la pendiente de las curvas de fluorescencia en el tiempo es proporcional a la relación de la cantidad de moléculas de cada especie amplificada. Los resultados se muestran en la Figura 22. La relación entre la proporción de las pendientes de señal de FAM y ROX es lineal con la proporción de ARN mitocondrial y ADN cromosómico en la entrada. Este resultado puede usarse para generar una curva de calibración y puede calcularse el número de copias de ARN mitocondrial por célula a partir de esta curva patrón de calibración.

Ejemplo 22

Se cultivaron fibroblastos en presencia del fármaco antirretroviral ddC (30 µM) durante 8 semanas. Después de ese periodo, continuó el cultivo celular, en presencia, pero también en ausencia, de ddC durante otras 8 semanas. Durante este periodo de cultivo, se recogió parte de las células en diferentes puntos temporales y se analizó con respecto a la relación de ARN mitocondrial y ADN cromosómico como se ha descrito en el Ejemplo 21. Los resultados se muestran en la Figura 23.

Los datos de la Figura 23 muestran claramente que en presencia de ddC los fibroblastos pierden su ARN mitocondrial. En el cultivo continuado en presencia de ddC la cantidad de ARN mitocondrial permanece muy baja. El cultivo continuado en ausencia de ddC muestra un claro rebote en la cantidad de ARN mitocondrial en los fibroblastos (puntos temporales de semana 10, 12, 14 y 16).

Ejemplo 23

Se analizaron dos pacientes infectados por VIH-1 en (paciente 1 y 2) tratados con terapia antiviral (AZT + ddI) con respecto al contenido de ARN mitocondrial en sus PBMC. Se extrajo sangre en la semana 0, 4, 24 y 48 semanas después del inicio de la terapia. La sangre se usó para preparar células mononucleares de sangre periférica (PBMC) por purificación de Ficoll-Isopaque. Las PBMC se congelaron de forma viable en medio más DMSO 5 % y se almacenaron en nitrógeno líquido hasta su uso.

Se extrajeron ácidos nucleicos de 10⁵ PBMC usando el método de Boom. Se usaron ácidos nucleicos equivalentes de 1000 PBMC como entrada para el NASBA doble en tiempo real de un tubo que mide tanto el ARN mitocondrial como el ADN cromosómico como se ha descrito en el Ejemplo 21. El resultado de este ensayo se expresa como el contenido de ARN mitocondrial por célula (es decir, PBMC) en la muestra del paciente. Los resultados se resumen en la Tabla 4.

El contenido de ARN mitocondrial de las PBMC de los pacientes 1 y 2 no parece variar significativamente en el tiempo de este estudio y con las terapias (fármacos y dosis) aplicadas. El presente estudio se expandirá para abarcar más individuos y diferentes terapias para conseguir una mejor evaluación de los cambios en el ARN mitocondrial provocado por terapias que abarcan análogos de nucleósidos.

Tabla 1. Secuencias de cebadores y sondas usados en los ejemplos.

Nombre	Secuencia ¹
MtD p1	5' AATTCTAATACGACTCACTATAGGGAGAAGAGCCGTTGAGTTGTGGTA 3'
MtD p2	5'TCTCCATCTATTGATGAGGGTCTTA 3'
MtD mb	5'GCATGCCCTCCTAGCCTTACTACTAATGCATGC
MtD p1_2	AAT AAT TCT ACG ACT CAC TAT AGG GAA GAA CCG GGC TCT GCC ATC TTA A
MtD p2_2	GTA ATC CAG GTC GGT TTC TA
MtD mb_2	GGA CCC CCC CCC ACA ACC CAA CAG GAA GGT CC
SnrpD p1	5' AATTCTAATACGACTCACTATAGGGAGAGGCCCGGCATGTGGTGCATAA 3'
SnrpD p2	5'TTCCTTACATCTCTCACCCGCTA 3'
SnrpD mb	5'GCATGCTGTAACCACGCACTCTCCTCGCATGC 3'
SnrpD2 p2	5'TGCGCCTCTTTCTGGGTGTT 3'
MtR p1	5' AATTCTAATACGACTCACTATAGGG AGGAGAAGATGGTTAGGTCTAC 3'
MtR p2	5'CGATATGGCGTTCCCCCGCATAAA 3'
MtR mb	5'GCTCCG AAGCTTCTGACTCTTACCTCCC CGGAGC 3'
MtR p1_2	AAT AAT TCT ACG ACT CAC TAT AGG AGG AGA GAG CTG CAC CTA GGT GT
MtR p1_3	AAT AAT TCT ACG ACT CAC TAT AGG GAG AAG GGT AGA CTG TTC AAC CTG TT
MtR p2_2	GGT GCC CCC GAT ATG GCG TTC C
MtR p2_3	GTA ATA ATC TTC TTC ATA GTA A
SnrpR p1	5'AATTCTAATACGACTCACTATAGGG AGAGGCCCGGCATGTGGTGCATAA 3'
SnrpR p2	5'CAGTATGCCAAGACCGACTCAGA 3'
SnrpR mb	5'CGTACGAGAAGAGGAAGCCCAAGAGCCACGTACG 3'
SnrpR p1_2	AAT AAT TCT ACG ACT CAC TAT AGG T A GAA GAA GAT GAC AAA GGC CTG GCC
SnrpR p1_3	AAT AAT TCT ACG ACT CAC TAT AGG T A GAA AAA GGC CTG GCC CCT CAT CTT
SnrpR p2_2	TCC ATG GCA GAG GTT CCC A
SnrpR p2_3	CAC TAT TAT TTA CAA CAA CC
SnrpR p2_4	TCA ATG AGA AGA AGA TCA A
SnrpR mb_2	CGA TCG AGT CCC TGT ACG CCA TCT TC CGA TCG
Rubisco-DNA p1	5' AATTCTAATACGACTCACTATAGGGGGATAATTTTCATTACCTTCACGAC 3'
Rubisco-DNA p2	5'GGAGTCCTGAACTAGCCGCAG 3'

Nombre	Secuencia ¹
Rubisco-DNA MB	5' GCATGCG GTAGATAAACTAGATAGCTAGGCATGC 3'
Rubisco-RNA p1	5' <i>AATTCTAATACGACTCACTATAGGG</i> GAGTTGTTGTTATTGTAAGTC 3'
Rubisco-RNA p2	5' CAAGTCTTATGAATTCCTATAG 3'
Rubisco-RNA p1-MB	5' GCTAG CACACAGGGTGTACCCATTAT GCTAGC 3'
OryzaDNA p1	5' <i>AATTCTAATACGACTCACTATAGGGG</i> GATCTTAATTACATGCCGTTCA 3'
OryzaDNA p2	5' AAAGGTGCCGGTTCTCACTA 3'
OryzaDNA mb	5' GCTAGCCTCTGCAAGCTTCATCAGTAATAGGCTAGC 3'
OryzaRNA p1	5' <i>AATTCTAATACGACTCACTATAGGGG</i> GCTAATGCCCTTTTCTTTTCTTCCTC 3'
OryzaRNA p2	5' CATATTGGCT TTCGAAGATT 3'
OryzaRNA mb	5' GCTAGCCTTCAGCCATTATTCAAGAT GGTGGCTAGC 3'
tRNA-L-D p1	5' <i>AATTCTAATACGACTCACTATAGGGG</i> GTTCTAGTTCGAGAACCGCTTG 3'
tRNA-L-D p2	5' GCGAAATCGGTAGACGCTACG 3'
tRNA-L-D MB	5' GCTAGCCAACCTTCCAAATTCAGAGAAGCTAGC 3'
petB RNA p1	5' AATTCTAATACGACTCACTATAGGGAAACCGG T AGCAACTTGTACTAG 3'
petB RNA p2	5' GGTTTCGGTATCTCTGGAATATGAG 3'
petB RNA MB	5' GCTAGCGAGGAACGTCTTGAGATTCAGCTAGC 3'
SnrnpD mb_2	CGCATGC TGTAAACACGCACTCTCCTC GCATGCG
MTD mb_3	CGTACG TGATATCATCTCAACTTAGTAT CGTACG

1. La parte de promotor T7 de las secuencias de cebador p1 se muestra en *cursiva*, las secuencias de tallo de las sondas de baliza molecular se muestran en **negrita**. Las secuencias de baliza molecular están marcadas en el extremo 3' con DABCYL (el interruptor) y en el extremo 5' con 6-FAM (el marcador fluorescente).

Tabla 2. Contenido de ADN mitocondrial en PBMC de pacientes que se someten a diferentes regímenes de terapia durante 48 semanas de seguimiento.

	Semana	Mediana	Intervalo entre cuartiles
AZT	0	196	111-252
	4	157	103-191
	24	182	123-224
	48	155	110-224
AZT/ddl	0	174	150-243
	4	126	89-235
	24	93	42-200
	48	112	66-170
AZT/ddC	0	132	83-200
	4	48	36-76
	24	68	29-107
	48	74	51-83

5 Tabla 3. Análisis de cambios significativos en el contenido de ADN mitocondrial de PBMC de pacientes que se someten a diferentes regímenes de terapia

Fármacos antivirales	Semana	% de reducción	p-valor
AZT	4	11%	0,22
	24	1%	0,80
	48	5%	0,55
AZT + ddl	4	13%	0,04
	24	24%	0,09
	48	16%	0,02
AZT + ddC	4	22%	0,002
	24	22%	0,06
	48	25%	0,04

Tabla 4. Contenido de ARN mitocondrial en PBMC de pacientes que se someten a diferentes regímenes de terapia durante 48 semanas de seguimiento.

Semana	Paciente 1	Paciente 2
0	632	680
4	1482	605
24	516	1106
48	448	no válido

Tabla 5. Toxicidades mitocondriales de análogos de nucleósidos y nucleótidos inhibidores de RT de VIH-1. De: A. Carr, DA Cooper. Lancet 2000; 356; 1423-1430

Órgano afectado	Características clínicas	Características de laboratorio	Tasa (%)	Fármaco (o fármacos)
Músculo	Fatiga, mialgia, debilidad próxima, debilitamiento	Creatina quinasa ↑	17	AZT
Corazón	Cardiomiopatía dilatada		Raro	AZT
Nervio	Dolor distal, entumecimiento, parestesia, reflejos/energía reducidos		10-30	ddC = d4T> ddl> 3TC
Hígado	Hepatomegalia, náuseas, líquido ascítico, edema, disnea, encefalopatía	Acidosis láctica ↑ Lactato en suero ↑ Enzimas del hígado ↑ Hueco aniónico ↓ Bicarbonato ↑	<1	Todos, excepto, 3TC, ABC
Páncreas	Dolor abdominal	Amilasa	<1-6	ddl> 3TC/ddC
Grasa	Atrofia periférica, lipodistrofia		50	d4T> otros

Breve descripción de los dibujos

- 10 Figura 1. Ejemplos de curvas patrón para secuencias diana de ADN y ARN
- Figura 2. Relación de ADN mitocondrial y ADN cromosómico en células de fibroblastos cultivadas en presencia de DDC.
- 15 Figura 3. Relación de ARN mitocondrial y ARN codificado por cromosomas en células de fibroblastos cultivadas en presencia de DDC.
- Figura 4. Relación de ARN mitocondrial y ADN cromosómico en células de fibroblastos cultivadas en presencia de DDC.
- 20 Figura 5. Relación de ARN mitocondrial y ADN mitocondrial en células de fibroblastos cultivadas en presencia de DDC.
- Figura 6. Relación de ARN codificado por cromosomas y ADN cromosómico en células de fibroblastos cultivadas en presencia de DDC.
- 25 Figura 7. Relación de ADN mitocondrial y ADN cromosómico en células de fibroblastos cultivadas en ausencia de DDC después de cultivarse con DDC durante 4 semanas.
- Figura 8. Relación de ARN mitocondrial y ARN codificado por cromosomas en células de fibroblastos cultivadas en ausencia de DDC después de cultivarse con DDC durante 4 semanas.
- 30 Figura 9. Relación de ADN mitocondrial y ADN cromosómico en PBMC cultivadas en presencia de DDC durante 5 días.
- Figura 10. Relación de ARN mitocondrial y ARN codificado por cromosomas en PBMC cultivadas en presencia de DDC durante 5 días.
- 35 Figura 11. Comparación de reacciones de NASBA de ADN de SNRNP con y sin pretratamiento con enzima de restricción Msp I.
- 40 Figura 12. Fluorescencia en el tiempo de las reacciones de 1.000 moléculas de plásmido que contiene ADN de SNRNP mezclado con 4×10^5 (A), 2×10^5 (B), 105 (C), 5×10^4 (D), $2,5 \times 10^4$ (E) o 10^4 (F) moléculas de plásmido que contiene ADN mitocondrial.

La curva (G) de la relación de la cantidad de moléculas de ADN mitocondrial amplificado y ADN nuclear de Snrp representada frente a la relación de la pendiente de la fluorescencia correspondiente en el tiempo.

5 Figura 13. Fluorescencia en el tiempo de las reacciones de 1.000 moléculas de plásmido que contiene ADN de Snrp mezclado con 4×10^5 (A), 2×10^5 (B), 10^5 (C) o 5×10^4 (D) moléculas de plásmido que contienen ADN mitocondrial. La curva patrón (E) de la relación de la cantidad de moléculas de ADN mitocondrial plasmídico amplificado y ADN nuclear de Snrp plasmídico representada frente a la relación de la pendiente de la fluorescencia correspondiente en el tiempo como deriva de las Figuras A-D; los círculos cerrados indican puntos de datos. Las diluciones 1:10 (F, H) y 1:100 (G, I) de PBMC en ausencia (F, G) y presencia de ddC $5 \mu\text{M}$ (H, I). En la Figura E, los cuadrados representan las muestras de PBMC cultivadas en ausencia de ddC y los rombos representan las muestras de PBMC cultivadas en presencia de ddC $5 \mu\text{M}$.

15 Figura 14. Copias de ADN mitocondrial por copia de ADN cromosómico en 4 muestras de PBMC de sangre de un paciente infectado con VIH-1 que murió de acidosis láctica. Para una explicación adicional de los puntos temporales véase el texto.

20 Figura 15A. Número de células positivas para CD4 y carga de ARN de VIH-1 de un individuo infectado por VIH-1. Las barras marcadas con ddC y AZT por debajo del eje X indican el periodo de tiempo de tratamiento con estos fármacos. Las 4 flechas por debajo del eje X indican los puntos temporales en los que se analizaron muestras de PBMC con respecto al contenido de ADN mitocondrial y relación de lactato-piruvato. Aproximadamente un mes después del punto temporal 4 el paciente murió de acidosis láctica.

25 Figura 15B. El panel de la izquierda muestra la relación de lactato-piruvato de las muestras de PBMC número 1 a 4. No pudo medirse ningún aumento en la relación de lactato-piruvato en estas PBMC. El panel derecho muestra el contenido de ADN mitocondrial de las PBMC en las muestras 1 a 4. En este experimento puede observarse una clara reducción del contenido de ADN mitocondrial.

30 Figura 16. Fluorescencia en el tiempo de señal fluorescente de ROX (ADN cromosómico, líneas grises) y FAM (ADN mitocondrial, líneas negras) usando diferentes relaciones de ADN mitocondrial y ADN cromosómico como entrada. En el panel inferior se muestra la relación lineal entre la proporción de señal y la proporción de ADN.

Figura 17. Relación de lactato-piruvato como se mide en fibroblastos cultivados en presencia de ddC durante las primeras 4 semanas, después de lo cual el cultivo se continuó tanto en presencia como en ausencia de ddC.

35 Figura 18. Fluorescencia en el tiempo de la señal fluorescente de ROX (ADN cromosómico, líneas grises) y FAM (ADN mitocondrial, líneas negras) de fibroblastos cultivados en presencia de ddC. Paneles desde arriba a la izquierda hasta arriba a la derecha: cultivo en presencia de ddC con respecto a, respectivamente, 1, 2, 3 y 4 semanas. Dos paneles inferiores izquierdos: cultivo continuado en presencia de ddC hasta respectivamente la semana 7 y la semana 10. Dos paneles inferiores derechos: cultivo continuado en ausencia de ddC hasta respectivamente la semana 7 y la semana 10.

45 Figura 19. Las barras representan el porcentaje de mitocondrias en PBMC durante el cultivo en ausencia (barras punteadas) y presencia (barras rayadas) de ddC. La cantidad de ADN mitocondrial en los controles (DMSO) se establece en 100 % en cada punto temporal dado.

Figura 20. Reducción del contenido de ADN mitocondrial en 3 grupos de pacientes tratados con AZT, AZT + ddl y AZT + ddC, respectivamente. Los p-valores encima de las barras indican cambios significativos en el contenido de ADN mitocondrial en comparación con el punto temporal cero, el inicio de la terapia.

50 Figura 21. El contenido de ADN mitocondrial de 3 pacientes individuales durante el tratamiento con AZT, AZT + ddl y AZT + ddC, respectivamente.

55 Figura 22. Fluorescencia en el tiempo de señal fluorescente de ROX (ADN cromosómico, líneas grises) y FAM (ARN mitocondrial, líneas negras) usando diferentes relaciones de ARN mitocondrial y ADN cromosómico como entrada. En el panel inferior se muestra la relación lineal entre la proporción de señal y la proporción de ARN y ADN.

60 Figura 23. Las barras representan la cantidad de ARN mitocondrial en fibroblastos cultivados en presencia de DDC durante las primeras 8 semanas, después de lo cual el cultivo se continuó tanto con como sin ddC hasta la semana 16.

Figura 24. Estudio de ATHENA de pacientes que cambian de tratamiento anti retroviral debido a efectos secundarios adversos.

65 Figura 25. Representación esquemática de la amplificación por NASBA-ADN.

Figura 26. Mapa genético del ADN mitocondrial con dos regiones indicadas donde se localiza parte de los cebadores de amplificación como se muestra en la Tabla 1. Se localizan otros cebadores de amplificación mostrados en la Tabla 1 en otras regiones del genoma mitocondrial y no se indican en esta figura.

5 **Referencias:**

1. Saiki RK, Gelfand DH, Stoffel S, Scharf SJ, Higuchi R, Horn GT, Mullis KB, Erlich HA: Primer-directed enzymatic amplification of DNA with a thermostable DNA polymerase. *Science* 239: 487-491, 1988
- 10 2. Van Gemen B, van Beuningen R, Nabbe A, Van Strijp D, Jurriaans S, Lens P, Kievits T: A one-tube quantitative HIV-1 RNA NASBA nucleic acid amplification assay using electrochemiluminescent (ECL) labelled probes. *J.Virol. Methods* 49: 157-167, 1994
- 15 3. Heid CA, Stevens J, Livak KJ, Williams PM: Real time quantitative PCR. *Genome Res.* 6: 986-994, 1996
4. Tyagi S, Kramer FR: Molecular beacons: probes that fluoresce upon hybridization. *Nat.Biotechnol.* 14: 303-308, 1996
- 20 5. Leone G, van Schijndel H, Van Gemen B, Kramer FR, Schoen CD: Molecular beacon probes combined with amplification by NASBA enable homogeneous, real-time detection of RNA. *Nucleic Acids Res.* 26: 2150-2155, 1998
- 25 6. Piatak M, Luk KC, Williams B, Lifson JD: Quantitative competitive polymerase chain reaction for accurate quantitation of HIV DNA and RNA species. *Biotechniques* 14: 70-81, 1993
7. De Baar, MP, van Dooren, MW, de Rooij, E, Bakker, M, Van Gemen, B, Goudsmit, J, y de Ronde, A. Single rapid real-time monitored isothermal RNA amplification assay for quantification of HIV-1 isolates from group M, N, and O. *J. Clin. Microbiol.* 39(4): 1378-1384, 2001
- 30 8. Boom R, Sol CJ, Salimans MM, Jansen CL, Wertheim-van Dillen PM, van der NJ: Rapid and simple method for purification of nucleic acids. *J.Clin.Microbiol.* 28: 495-503, 1990

REIVINDICACIONES

1. Un método para determinar la actividad terapéutica y/o posibles efectos secundarios de un medicamento para el tratamiento del mal funcionamiento de un organismo celular, donde se ha proporcionado a dicho organismo dicho medicamento y donde dichos efectos secundarios esencialmente no se manifiestan en el momento en que se realiza dicho método, que comprende determinar la relación relativa de un ácido nucleico de orgánulo celular endosimbionte y/o producto génico del mismo en células mononucleares de sangre periférica obtenidas de dicho organismo en relación con la cantidad de un ácido nucleico nuclear y/o producto génico del mismo presente en dichas células mononucleares de sangre periférica, donde dicho ácido nucleico celular endosimbionte y dicho ácido nucleico nuclear se amplifican en el mismo ensayo utilizando una mezcla de reacción.
2. Un método para determinar la actividad terapéutica y/o posibles efectos secundarios de un compuesto candidato para el tratamiento del mal funcionamiento de un organismo celular, donde se ha proporcionado a dicho organismo no humano dicho compuesto y donde dichos efectos secundarios no se manifiestan esencialmente en el momento en que se realiza dicho procedimiento, que comprende determinar la relación relativa de un ácido nucleico de orgánulo celular endosimbionte y/o producto génico del mismo en células mononucleares de sangre periférica obtenidas de dicho organismo no humano en relación con la cantidad de un ácido nucleico nuclear y/o producto génico del mismo presente en dichas células mononucleares de sangre periférica, donde dicho ácido nucleico celular endosimbionte y dicho ácido nucleico nuclear se amplifican en el mismo ensayo utilizando una mezcla de reacción.
3. Un método de acuerdo con la reivindicación 1, donde se ha proporcionado a dicho organismo dicho medicamento durante al menos 3 meses.
4. Un método de acuerdo con la reivindicación 1 o 3, donde se ha proporcionado a dicho organismo un medicamento usado para el tratamiento de una enfermedad crónica.
5. Un método de acuerdo con una cualquiera de las reivindicaciones 1-4, donde dicha actividad terapéutica comprende una actividad terapéutica contra una enfermedad relacionada con VIH y/o una enfermedad relacionada con un tumor.
6. Un método de acuerdo con una cualquiera de las reivindicaciones 1-5, donde dicho compuesto o medicamento comprende un análogo de nucleósido y/o nucleótido.
7. Un método de acuerdo con la reivindicación 6, donde dicho análogo de nucleósido y/o nucleótido comprende fludarabina, mercaptopurina, tioguanina, citarabina, fluorouracilo y/o gemcitabina.
8. Un método de acuerdo con una cualquiera de las reivindicaciones 1-7, donde dicho compuesto o medicamento comprende AZT, ddI, ddC, d4T, 3TC y/o tenofovir.
9. Un método de acuerdo con la reivindicación 1-8, donde dicha relación relativa se determina directamente dividiendo una cantidad de ácido nucleico por otra.
10. Un método de acuerdo con una cualquiera de las reivindicaciones 1-9, donde dicha relación relativa se determina por comparación con una curva de referencia.

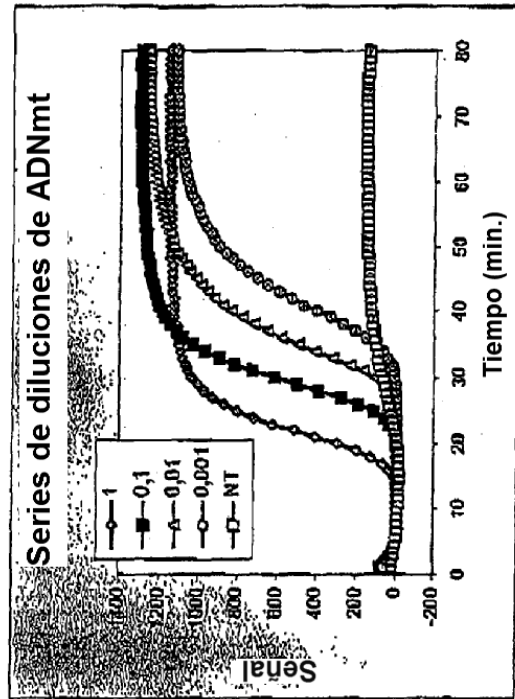
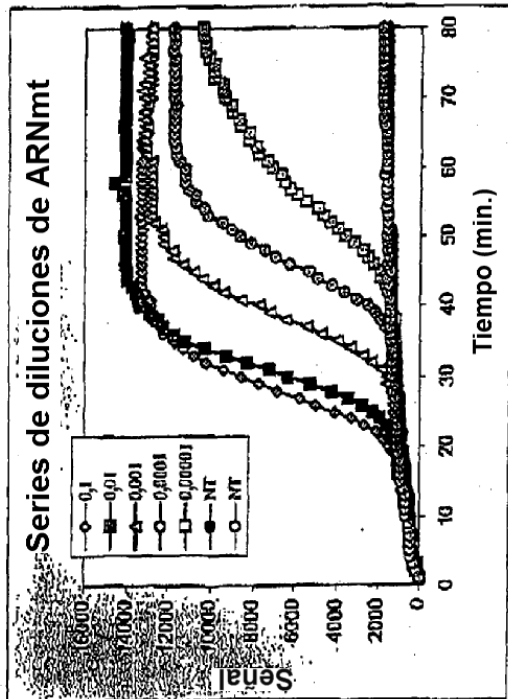
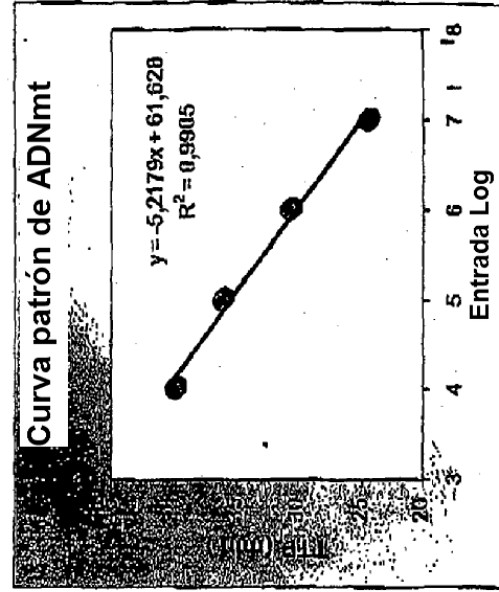
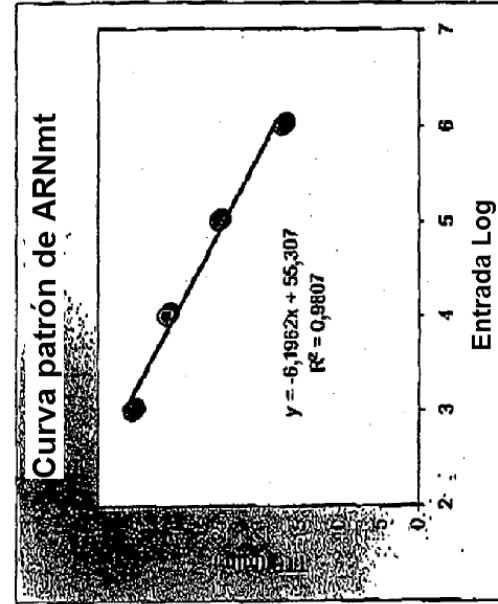


Figura 1

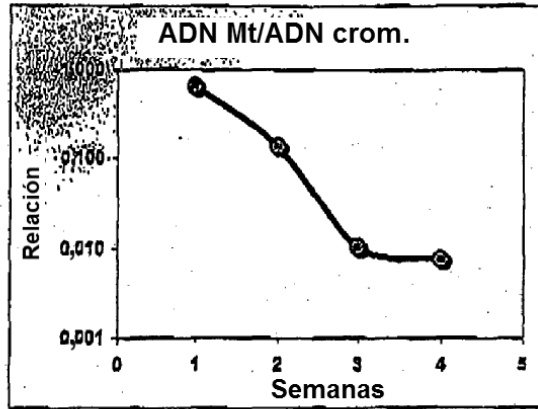


Figura 2

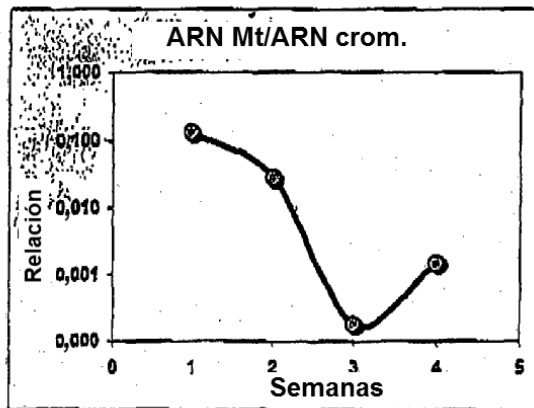


Figura 3

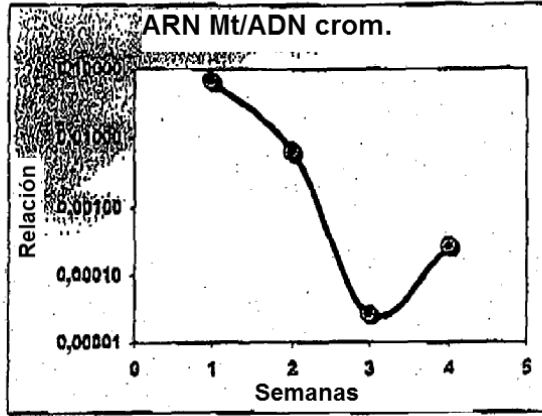


Figura 4

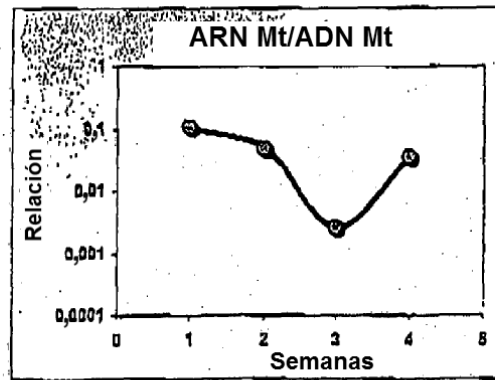


Figura 5

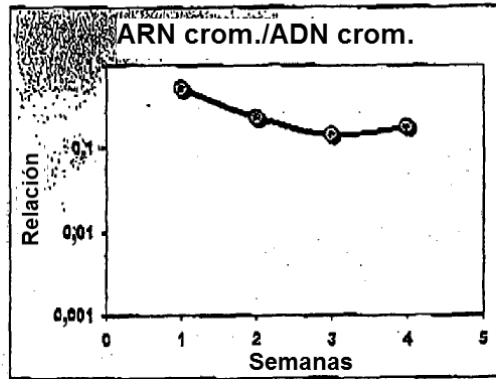


Figura 6

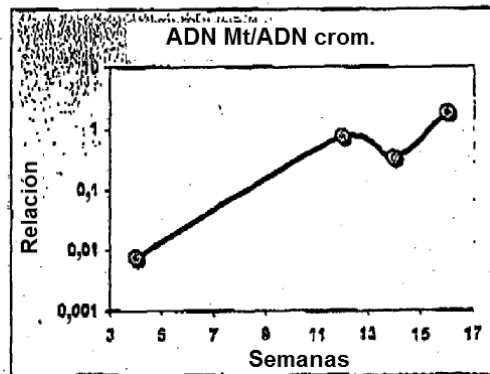


Figura 7

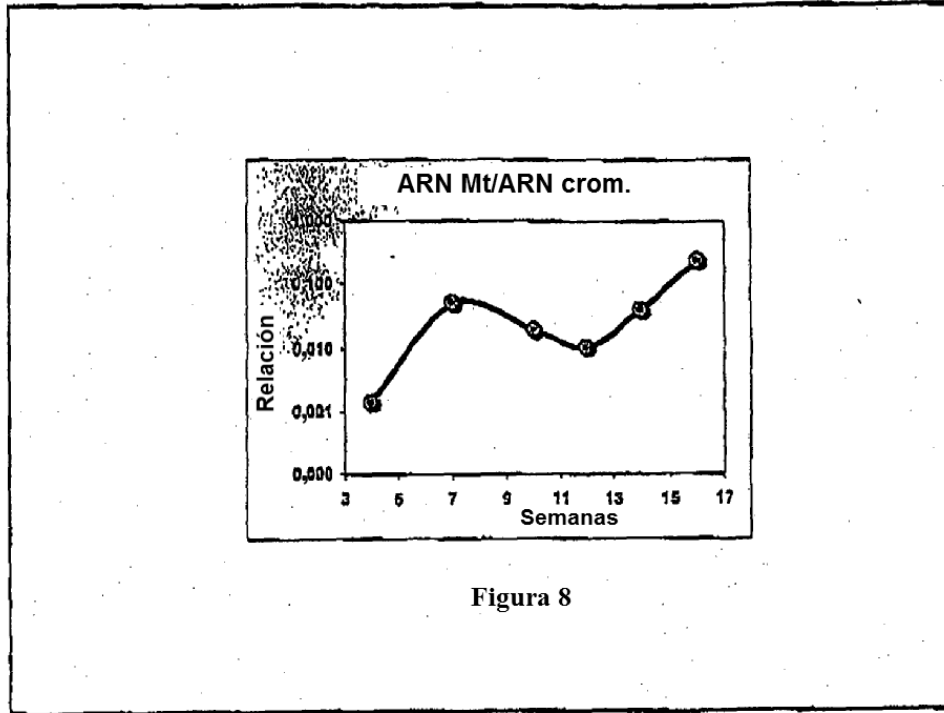


Figura 8

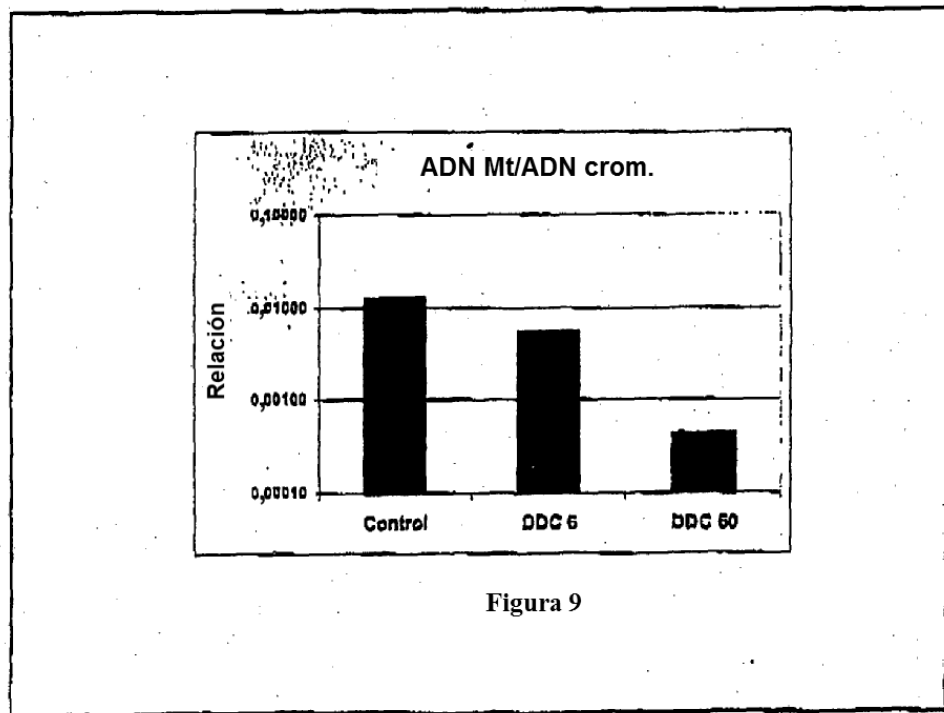
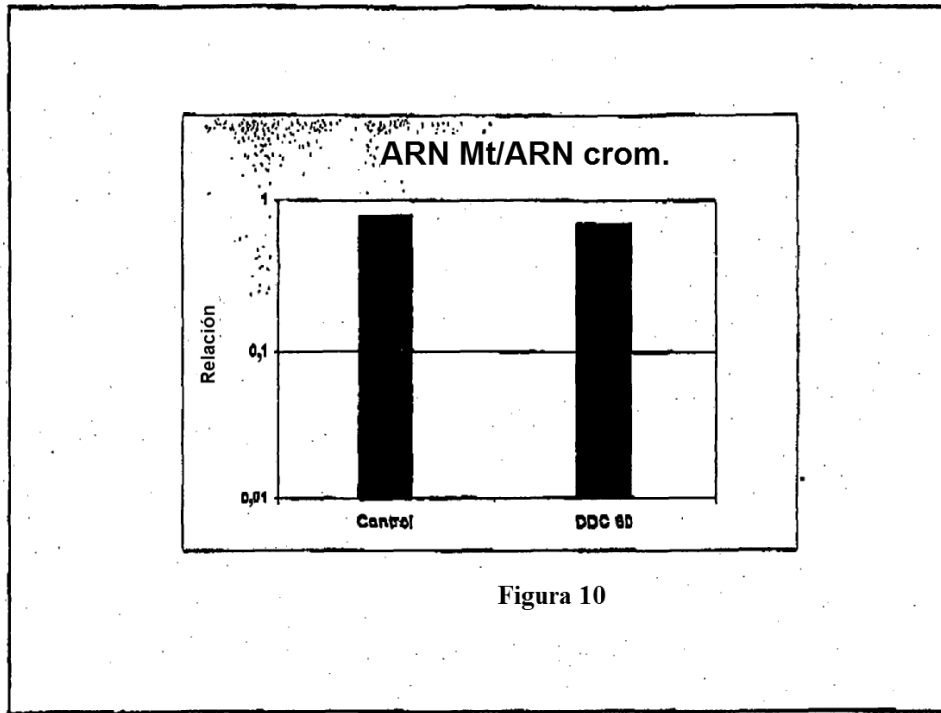


Figura 9



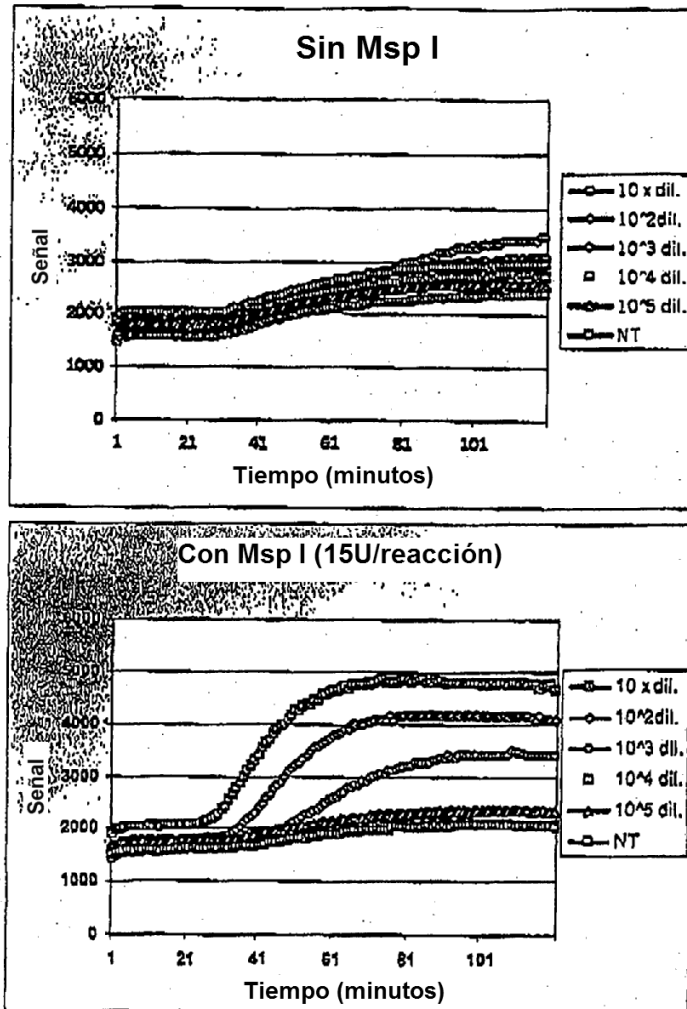


Figura 11

Figura 12

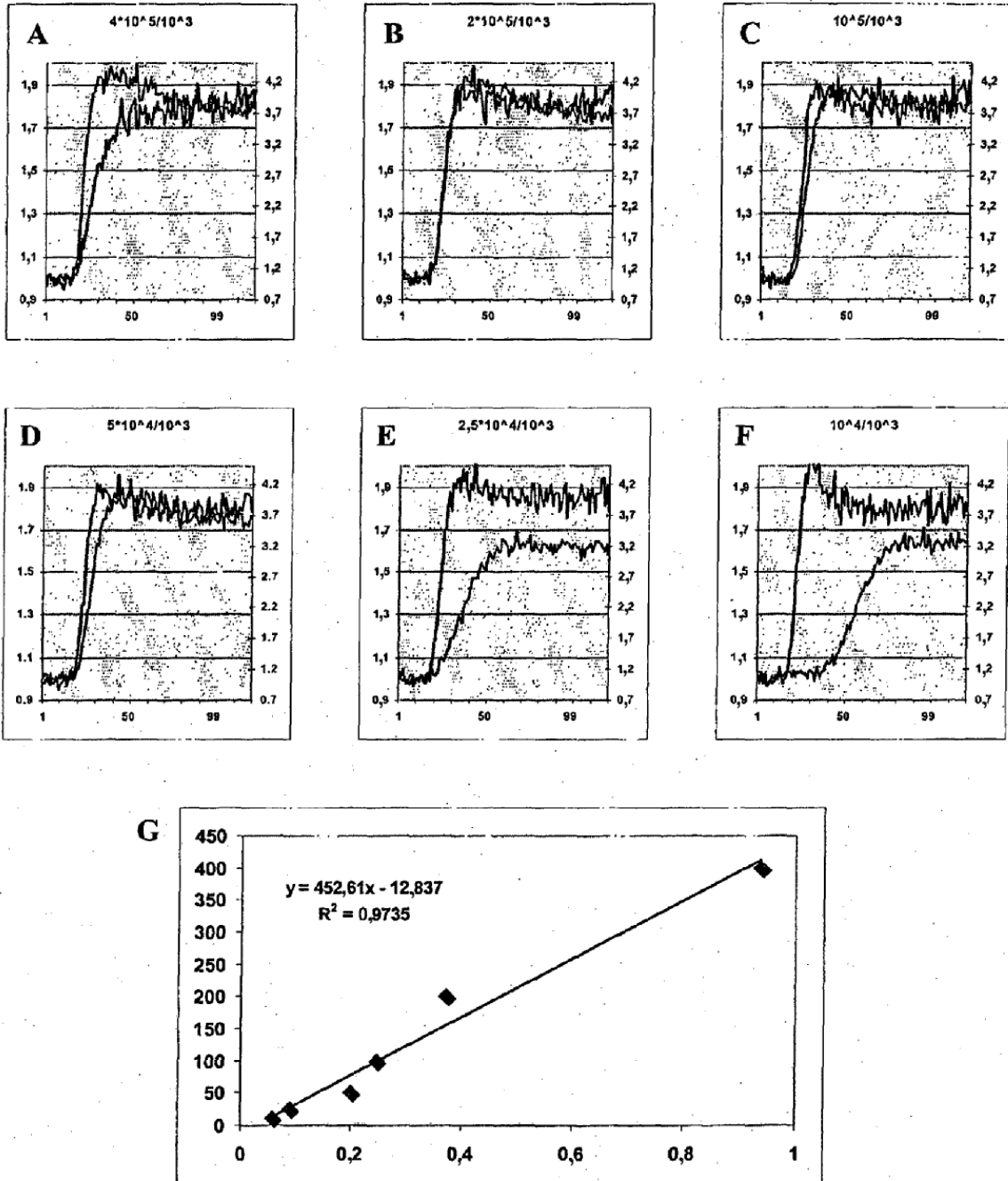


Figura 13

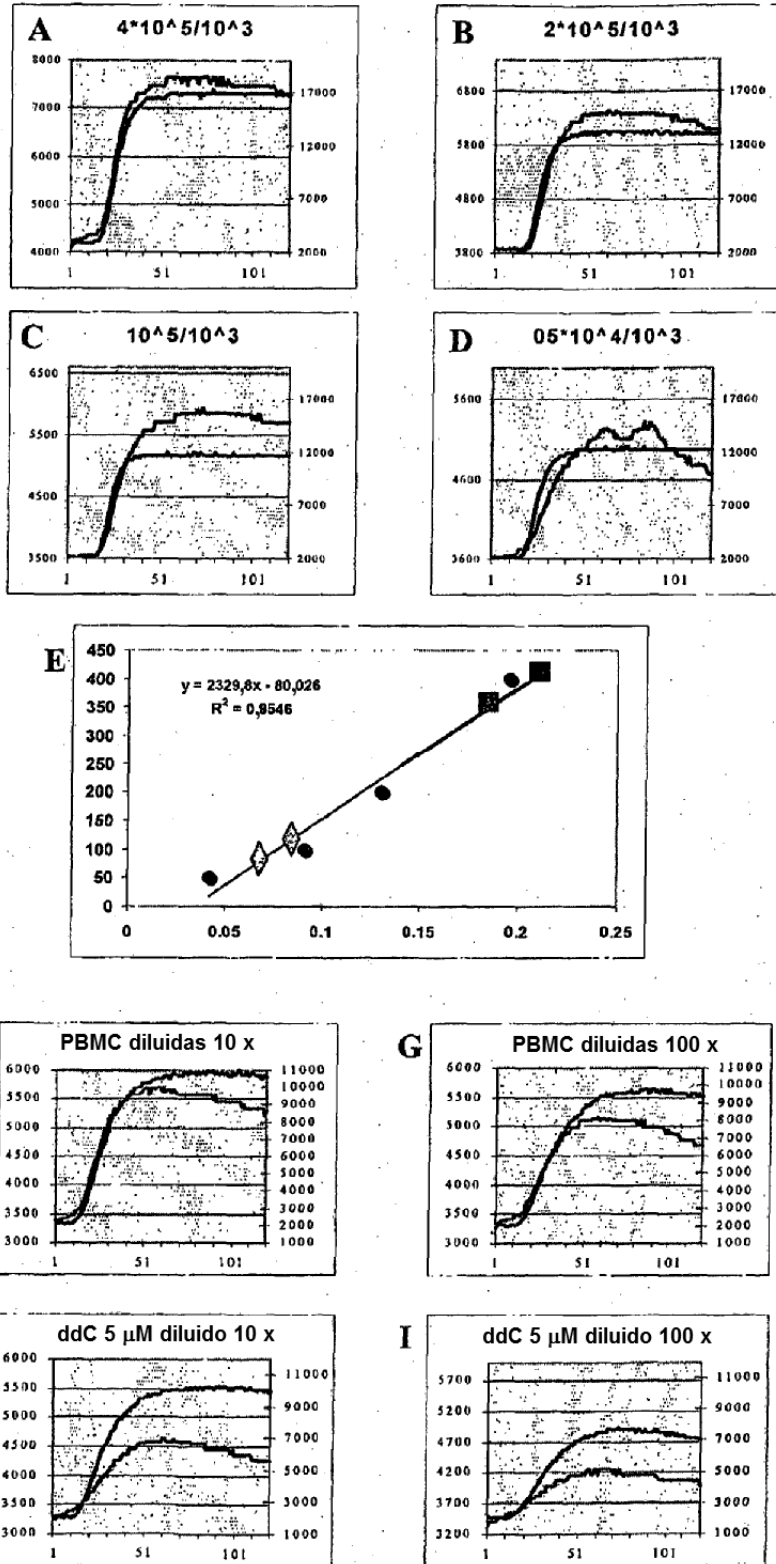
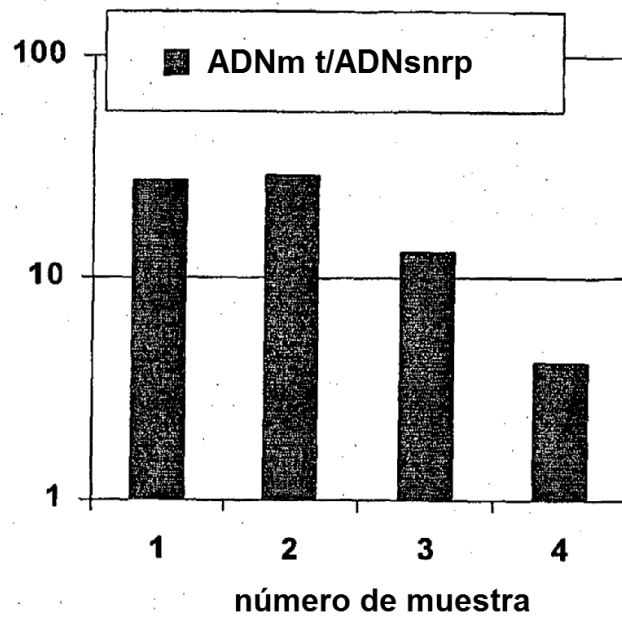


Figura 14



Paciente de acidosis láctica (H0224)

M10620 (H 0224)

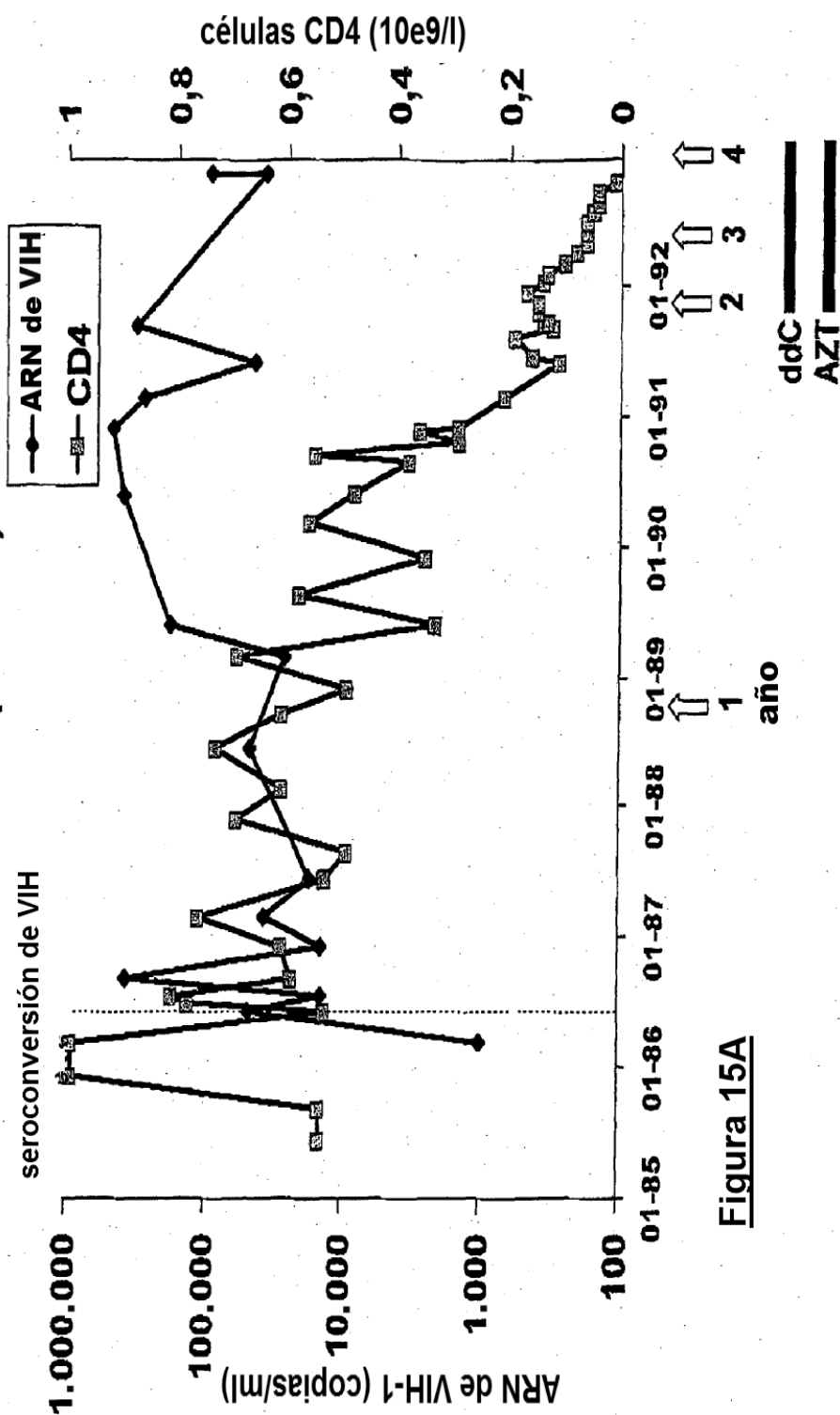


Figura 15A

Paciente de acidosis láctica (H0224)

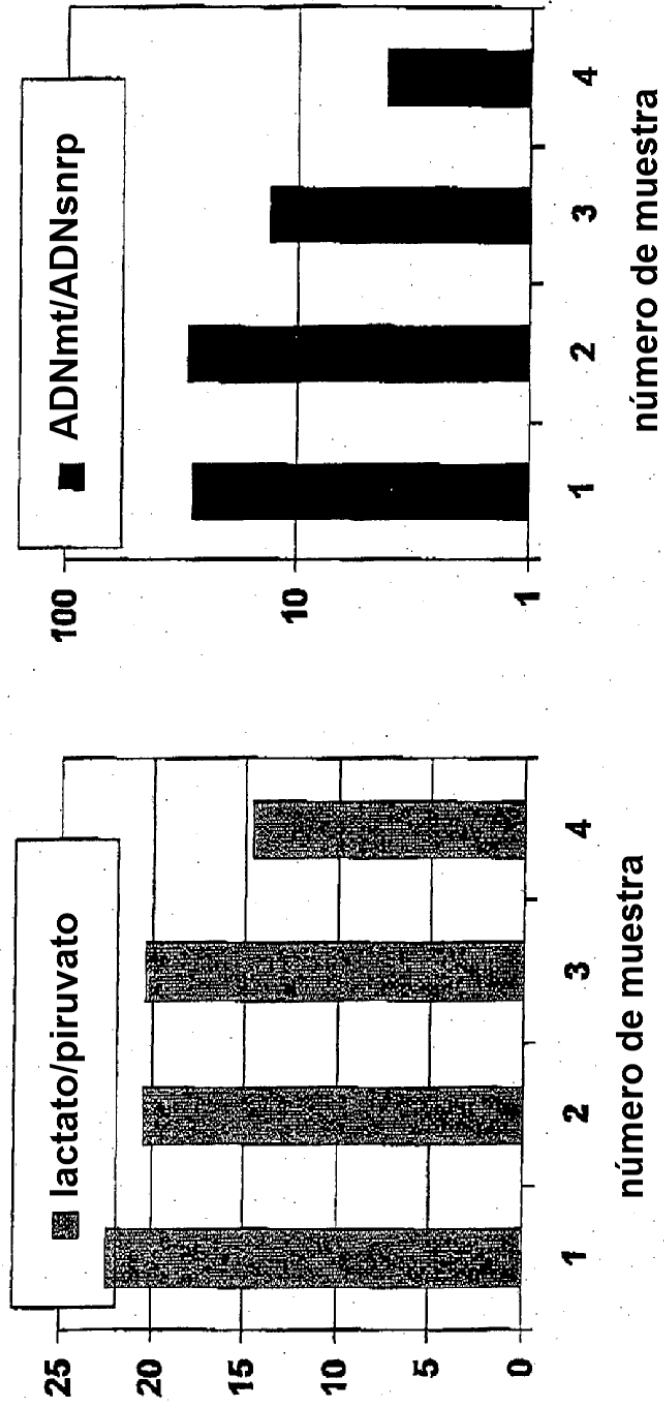


Figura 15B

Figura 16

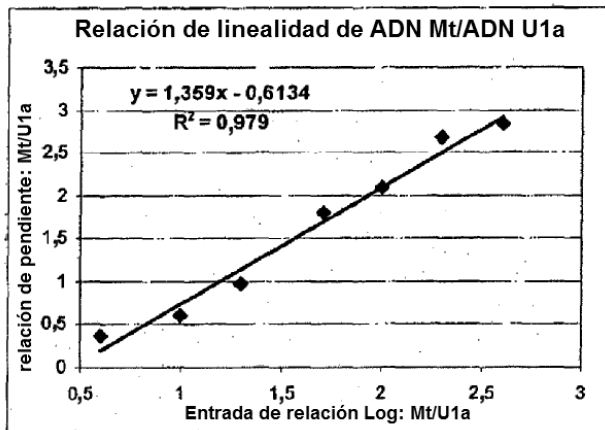
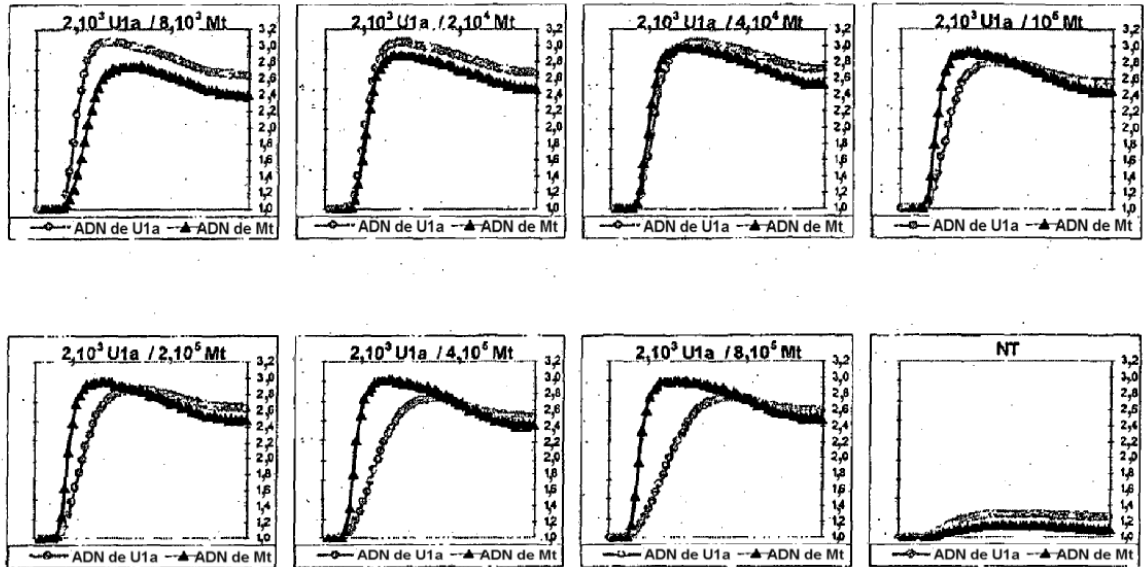


Figura 17

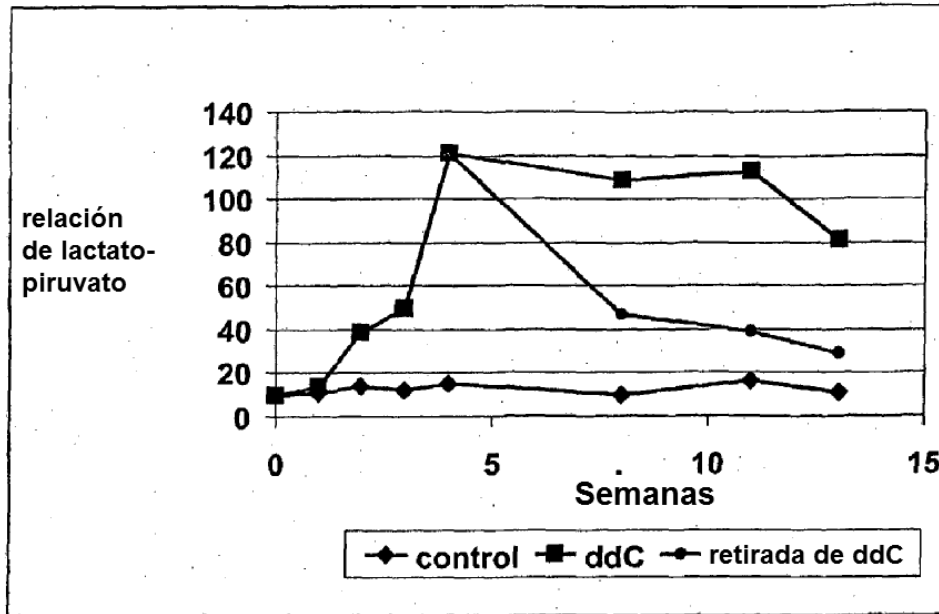


Figura 18

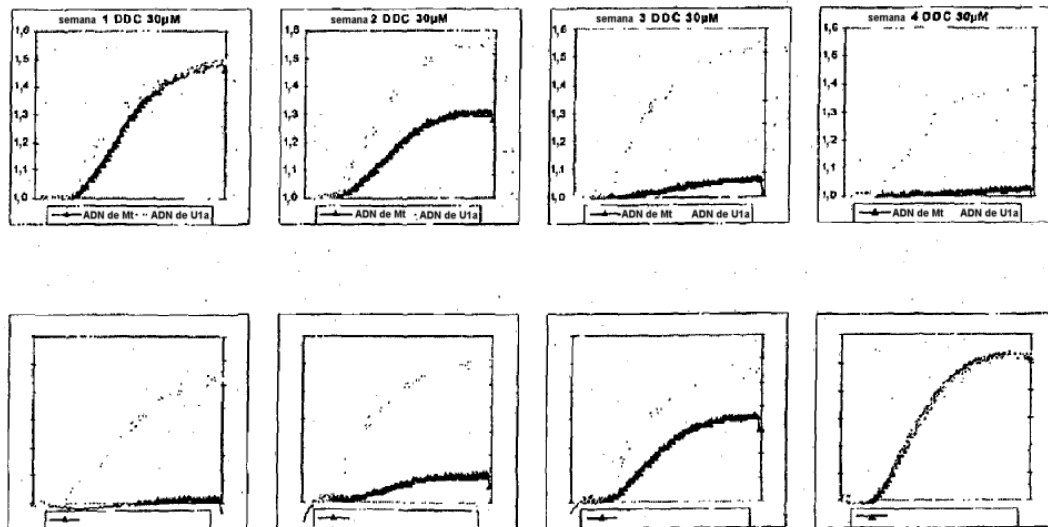
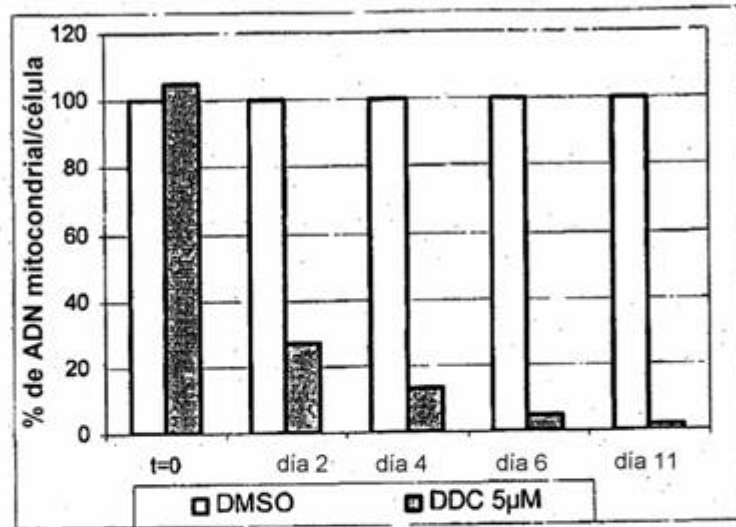


Figura 19



Reducción significativa de ADNmt en PBMC

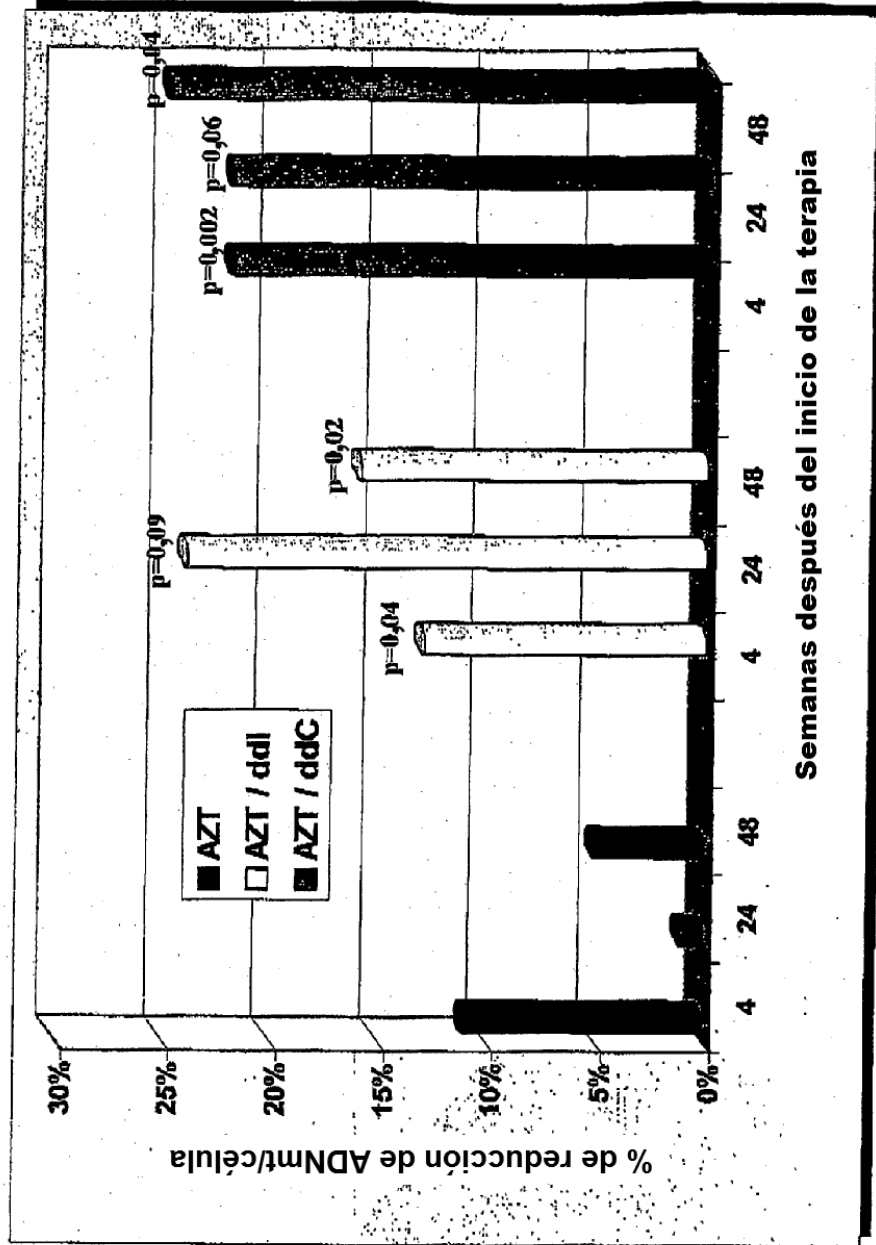


Figura 20

Copias de ADNmt/célula para tres pacientes individuales

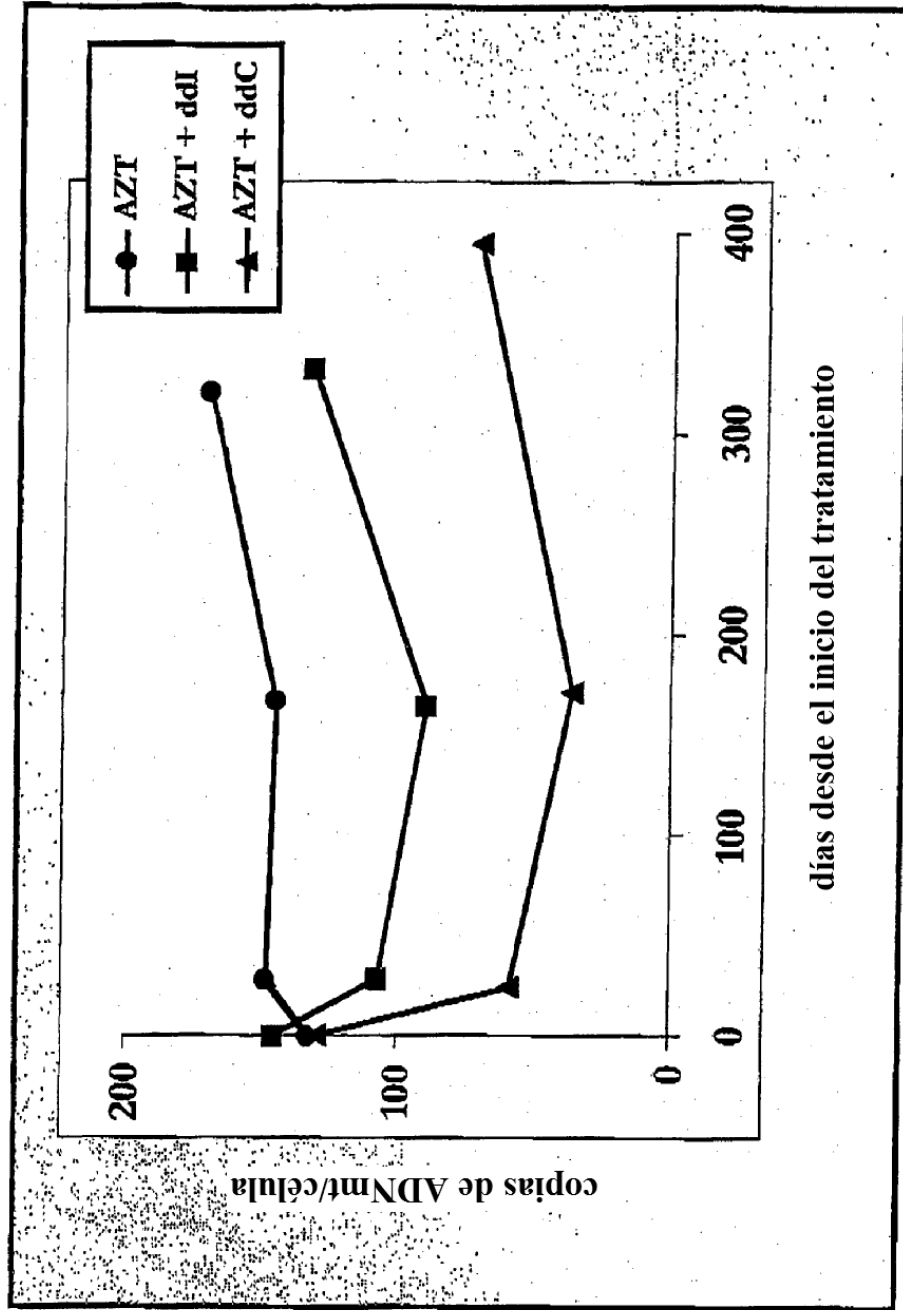
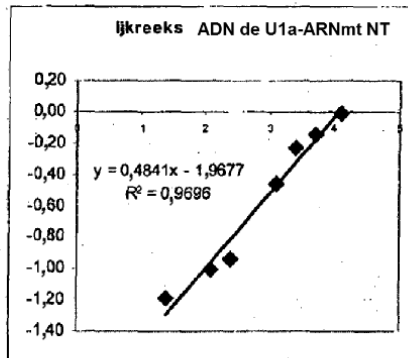
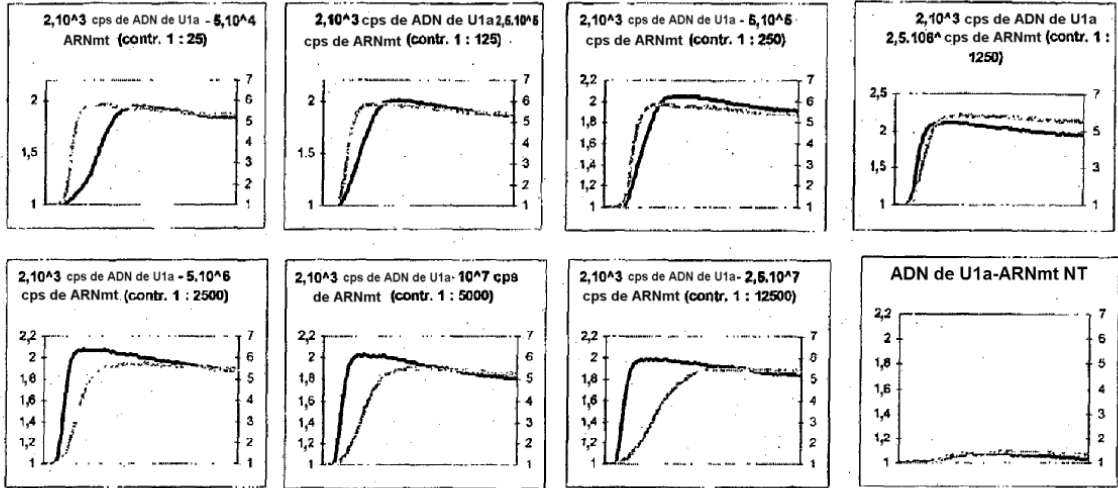
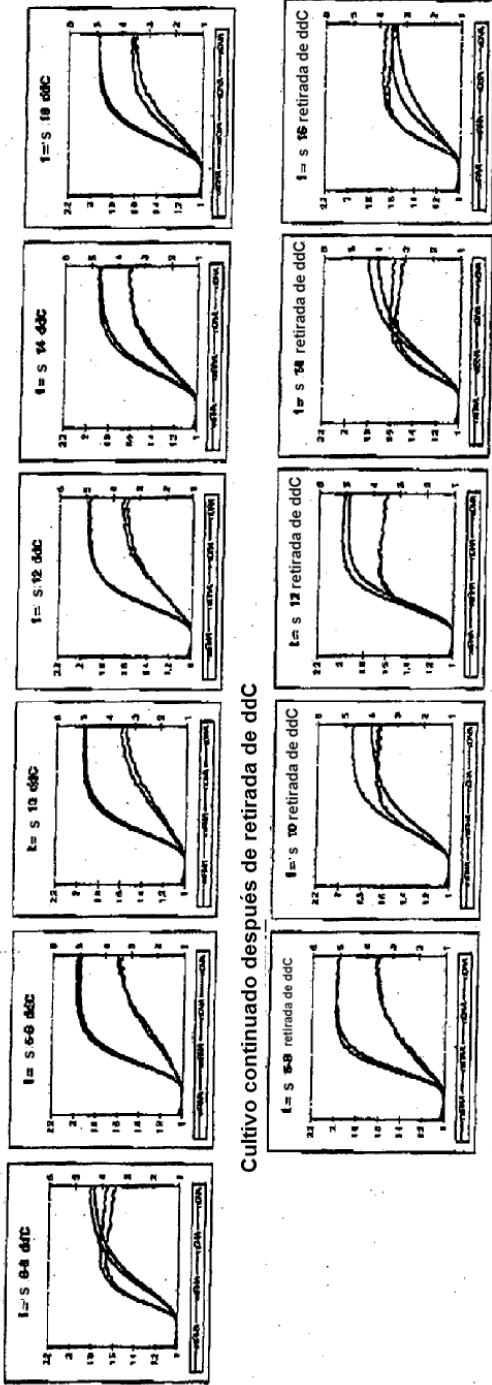


Figura 22



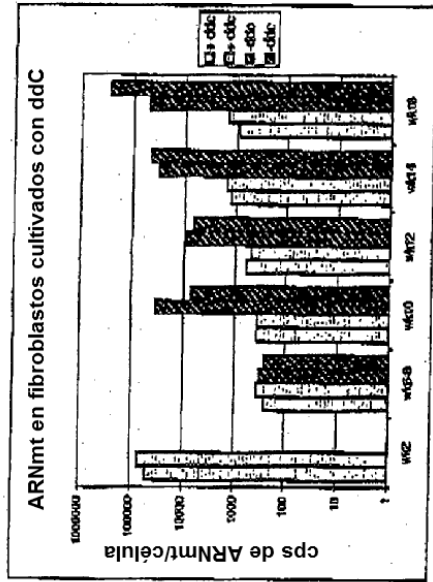
doble de ARNmt - ADNn

fibroblastos cultivados con ddc



Cultivo continuado después de retirada de ddc

Figura 23



Efectos adversos de la terapia anti-retroviral

Porcentaje de pacientes que cambian de ART debido a los efectos adversos
(resultados del estudio de ATHENA en los Países Bajos)

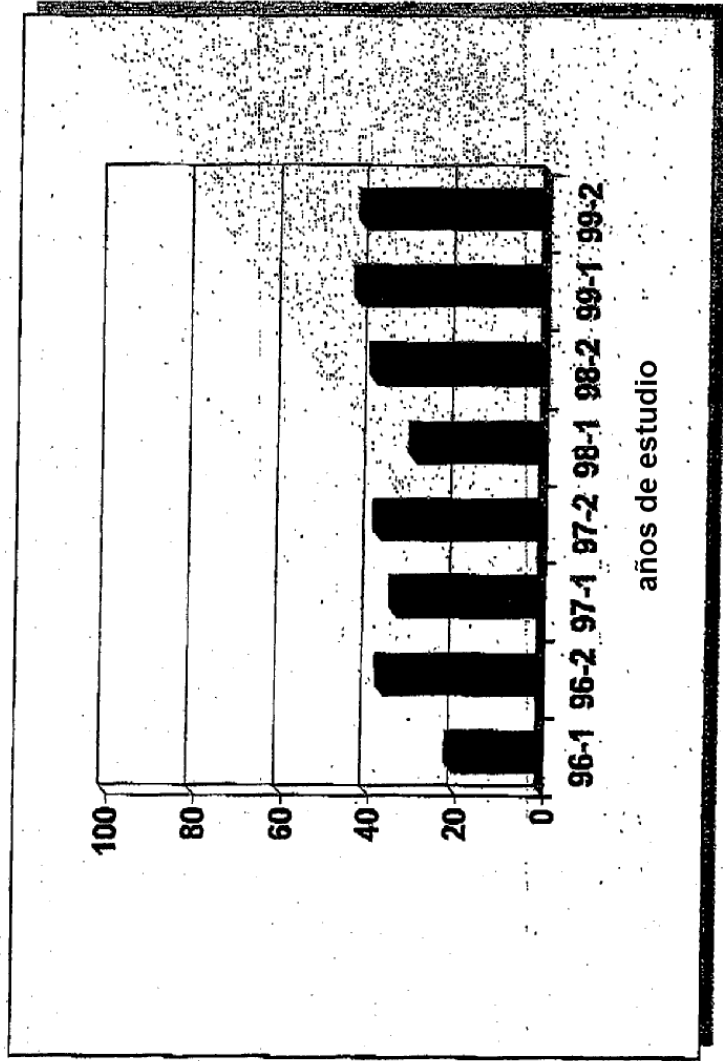


Figura 24

Amplificación de NASBA-ADN

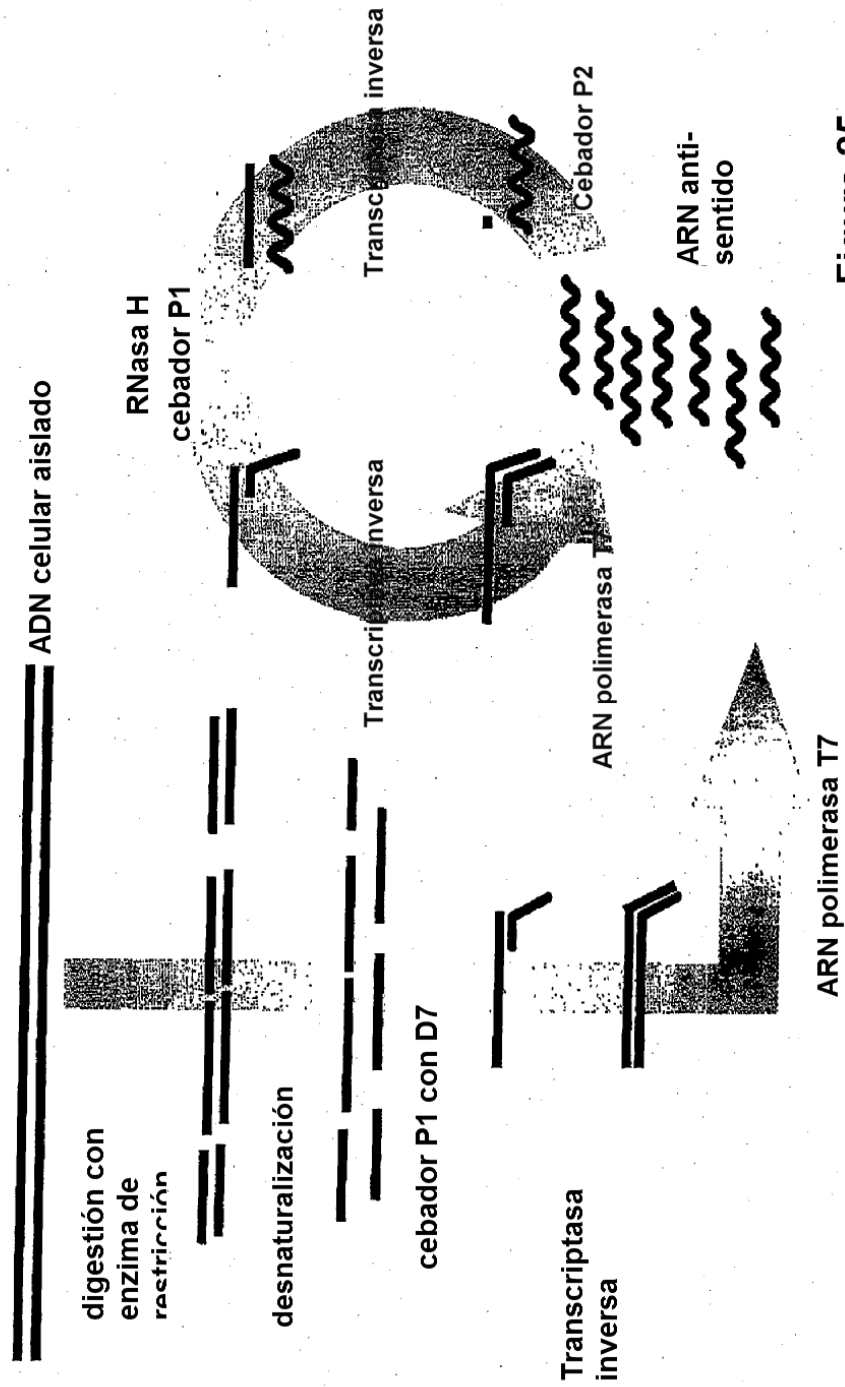


Figura 25

Mitocondria

localización de cebadores para NASBA

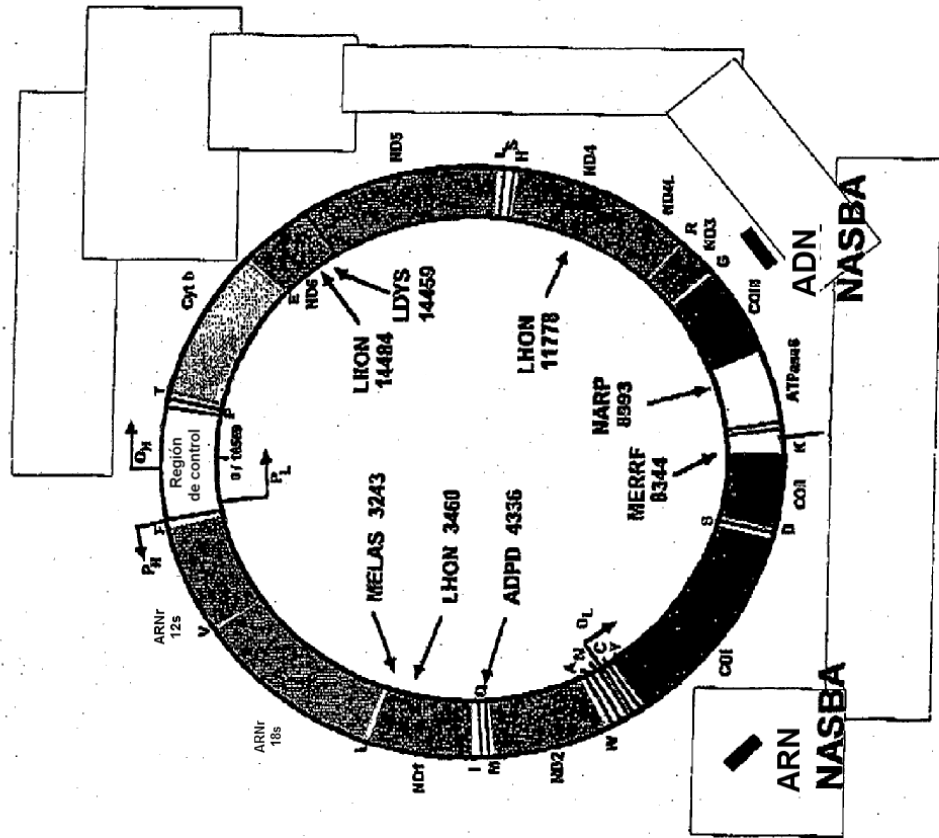


Figura 26