

19



OFICINA ESPAÑOLA DE  
PATENTES Y MARCAS

ESPAÑA



11 Número de publicación: **2 532 153**

51 Int. Cl.:

**C12Q 1/68** (2006.01)

12

TRADUCCIÓN DE PATENTE EUROPEA

T3

96 Fecha de presentación y número de la solicitud europea: **17.07.2009 E 09790587 (1)**

97 Fecha y número de publicación de la concesión europea: **25.02.2015 EP 2315850**

54 Título: **Métodos para la detección de secuencias de ácidos nucleicos "ultracortos" basados en PCR**

30 Prioridad:

**18.07.2008 US 135364 P**

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

**24.03.2015**

73 Titular/es:

**TROVAGENE, INC. (100.0%)  
11055 Flintkote Avenue  
San Diego, CA 92121, US**

72 Inventor/es:

**SHEKHTMAN, EUGENE, M.;  
MELKONYAN, HOVSEP, S. y  
UMANSKY, SAMUIL, R.**

74 Agente/Representante:

**UNGRÍA LÓPEZ, Javier**

**ES 2 532 153 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

Métodos para la detección de secuencias de ácidos nucleicos "ultracortos" basados en PCR

5 **Campo de la invención**

La presente invención proporciona métodos altamente sensibles usados para el diagnóstico y control de diversas enfermedades y trastornos detectando y analizando ácidos nucleicos "ultracortos" (20-50 pares de bases) obtenidos de fluidos corporales.

10

**Antecedentes de la invención**

La muerte celular es un acontecimiento esencial en el desarrollo y funcionamiento de organismos multicelulares. En organismos adultos, la muerte celular desempeña una función complementaria a la mitosis en la regulación de poblaciones celulares. La patogénesis de numerosas enfermedades implica insuficiencia de homeostasis tisular que se supone que está relacionada con daños citotóxicos o pérdida de control normal de muerte celular.

15

Existen dos tipos principales de muerte celular, la necrosis y la apoptosis, marcados por diferentes características moleculares y morfológicas (Kerr *et al.*, Br. J. Cancer. 26: 239-257, 1972; Umansky, J. Theor. Biol. 97: 591-602, 1982; Umansky y Tomei, Adv Pharmacol. 41: 383-407, 1997; Ameisen, Cell Death Differ. 11: 4-10, 2004; Lockshin y Zakeri, Int J Biochem Cell Biol. 36: 2405-19, 2004; y Kroemer, *et al.*, Cell Death and Differentiation 12: 1463-1467, 2005). La necrosis se considera que es una disfunción metabólica catastrófica producida directamente por lesión molecular y/o estructural grave y conduce a inflamación y lesión secundaria a células circundantes. La apoptosis, también denominada muerte celular programada, es un fenómeno biológico muchos más frecuente que la necrosis y puede inducirse por señales específicas tales como hormonas, citocinas, por ausencia de señales específicas, tales como factores de crecimiento o de adhesión, o por lesión molecular que no causa pérdida catastrófica de integridad. La apoptosis es un resultado de una respuesta celular activa que implica el inicio de una cascada ordenada y específica de sucesos moleculares. La apoptosis conduce a la aparición de condensación y marginación distintiva de la cromatina, a la fragmentación nuclear, a la contracción celular y al ampollamiento de las membranas. La fragmentación internucleosomal enzimática de ADN nuclear es un atributo de la apoptosis, aunque algunas células mueren por apoptosis sin escisión de ADN internucleosomal (Umansky *et al.*, Biochim Biophys Acta. 655: 9-17, 1981; Arends *et al.*, Am J Pathol. 136: 593-608, 1990; y Zimmermann *et al.*, Pharmacol Ther. 92: 57-70, 2001). También se han descrito otras formas más raras de muerte celular, caracterizadas por su morfología específica, por ejemplo, la denominada muerte celular autofágica.

20

25

30

35

Se sabe bien que la apoptosis, o muerte celular programada, que es una forma principal de muerte celular en organismos multicelulares, viene acompañada por fragmentación internucleosomal de ADN nuclear. Este ADN se origina en todas las células que experimentan apoptosis y por tanto en todos los tejidos del organismo. Muchos laboratorios han demostrado que, en seres humanos, una parte de este ADN aparece en sangre (Lo *et al.*, Ann NY Acad Sci. 945: 1-7, 2001; Lichtenstein *et al.*, Ann NY Acad Sci. 945: 239-249, 2001; Taback y Hoon, Curr Opin Mol Ther. 6: 273-278, 2004; y Bischoff *et al.*, Hum Reprod Update. 8: 493-500, 2002). También se ha observado que este ADN fragmentado atraviesa la barrera renal (Transrenal DNA or Tr-DNA) y puede detectarse en la orina (Botezatu *et al.*, Clin Chem. 46: 1078-1084, 2000; Su *et al.*, J Mol Diagn. 6: 101-107, 2004; y Su *et al.*, Ann NY Acad Sci. 1022: 81-89, 2004).

40

45

Como herramientas de diagnóstico se ha usado ADN tanto plasmático acelular como ADN Transrenal (ADN-Tr) cuando el marcador diagnóstico está en presencia de secuencias conocidas, específicas, diferentes de ADN genómico masivo. Por ejemplo, la detección de ADN específico de tumor que resulta de mutaciones características puede usarse para diagnóstico tumoral, la detección de secuencias específicas del cromosoma Y masculino en orina o sangre de una gestante puede usarse para determinar el género masculino del feto y la detección de mutaciones características de enfermedad hereditaria puede proporcionar una herramienta para ensayos genéticos prenatales (Chan y Lo, Semin Cancer Biol. 12: 489-496, 2002; Goessl, Expert Rev Mol Diagn. 3: 431-442, 2003; Su *et al.*, J Mol Diagn. 6: 101-107, 2004; Wataganara y Bianchi, Ann NY Acad Sci. 1022: 90-99, 2004; Botezatu *et al.*, Clin Chem. 46: 1078-1084, 2000; y Ding *et al.*, Proc Natl Acad Sci USA. 101: 10762-10767, 2004).

50

55

El destino del ARN de células muertas, en particular los mecanismos de su degradación, se investiga mucho menos. Sin embargo, se sabe que el ARN fetal puede detectarse en plasma de gestantes y que el ARN con mutaciones específicas de tumores puede detectarse en plasma de pacientes con diferentes tipos de cáncer (Tsui *et al.*, Ann NY Acad Sci. 2006; 1075: 96-102; Lo y Chiu, Nat Rev Genet. 8: 71-77, 2007; y Tsang y Lo, Pathology 39: 197-207, 2007).

60

El documento WO2008/045505 describe composiciones, métodos y kits para aislar ácidos nucleicos de fluidos corporales usando medios de intercambio aniónico.

65

Estos biomarcadores de ácido nucleico específicos a menudo son muy cortos y su concentración en fluidos corporales es normalmente baja, especialmente si se aborda un ensayo en una fase temprana de la gestación o de

una enfermedad. Por tanto, se requieren nuevos métodos para detectar estos biomarcadores sensibles. La presente invención aborda esta necesidad en la técnica.

### Sumario de la invención

5 La presente invención proporciona un método de detección de ácidos nucleicos que no son de hospedador que se originan en zonas distintas al tracto urinario en un paciente, que incluye la obtención de una muestra de orina del paciente; aislar sustancialmente dichos ácidos nucleicos en dicha muestra, sin excluir ácidos nucleicos de 10 a 150 pares de bases; y analizar la muestra de orina para detectar una o más secuencias específicas de ácidos nucleicos que no son del paciente que son diferentes de las secuencias de ácidos nucleicos del paciente y que han atravesado la barrera renal comprendiendo el análisis la etapa de detectar dicha una o más secuencias específicas en los ácidos nucleicos de 20-50 nucleótidos de longitud de la muestra de orina.

15 La presente invención también proporciona un método de detección de ácidos nucleicos de un patógeno, donde los ácidos nucleicos se originan en zonas distintas al tracto urinario en un paciente, que incluye la obtención de una muestra de orina del paciente; y analizar la muestra de orina para detectar una o más secuencias específicas de ácidos nucleicos patógenos que son diferentes de las secuencias de ácidos nucleicos del paciente y son de ácidos nucleicos patógenos que tienen 20-50 nucleótidos de longitud y que han atravesado la barrera renal donde el análisis incluye la etapa de detectar la una o más secuencias específicas del patógeno.

20 La presente invención también proporciona un método de detección de cáncer en un paciente que incluye obtener una muestra de orina del paciente; aislar sustancialmente dichos ácidos nucleicos en dicha muestra, sin excluir ácidos nucleicos de 10 a 150 pares de bases; y analizar la muestra de orina para detectar uno o más ácidos nucleicos específicos de 20-50 nucleótidos de longitud, que son indicativos de cáncer, y que han atravesado la barrera renal, donde el análisis incluye la etapa de detectar el uno o más ácidos nucleicos específicos indicativo de cáncer.

30 La presente invención también proporciona un método de detección de una enfermedad o trastorno genético en un feto, que incluye obtener una muestra de orina de una gestante; aislar sustancialmente dichos ácidos nucleicos en dicha muestra, sin excluir ácidos nucleicos de 10 a 150 pares de bases; y analizar la muestra de orina para detectar uno o más ácidos nucleicos fetales específicos de 20-50 nucleótidos de longitud, que han atravesado las barreras placentaria y renal, donde el análisis incluye la etapa de detectar el uno o más ácidos nucleicos fetales específicos indicativo de una enfermedad genética.

35 La presente invención también proporciona un método de control de células, tejidos u órganos trasplantados en zonas distintas al tracto urinario en un paciente, que incluye la obtención de una muestra de orina del paciente; aislar sustancialmente dichos ácidos nucleicos en dicha muestra, sin excluir ácidos nucleicos de 10 a 150 pares de bases y analizar la muestra de orina para detectar una o más secuencias específicas de ácidos nucleicos que no son del paciente de 20-50 nucleótidos de longitud de las células, tejidos u órganos trasplantados que son diferentes de las secuencias de ácidos nucleicos del paciente y que han atravesado la barrera renal para controlar las células, tejidos u órganos trasplantados en zonas distintas al del tracto urinario en el paciente. La etapa de analizar puede adicionalmente incluir analizar cuantitativamente la muestra de orina para detectar una o más secuencias específicas de los ácidos nucleicos acelulares, transrenales de células muertas en las células, tejidos u órganos trasplantados, que son diferentes de las secuencias de ácidos nucleicos del paciente donde el análisis comprende la etapa de detectar dicha una o más secuencias específicas de ácidos nucleicos de las células, tejidos u órganos trasplantados en los ácidos nucleicos que tienen una longitud de 20-50 nucleótidos de las muestras de orina y que han atravesado la barrera renal para controlar el rechazo o aceptación de las células, tejidos u órganos trasplantados.

50 Los ácidos nucleicos pueden ser ADN o ARN. El patógeno puede ser un virus, una bacteria, un hongo, un micoplasma o un protozoo.

La etapa de analizar la muestra de orina incluye la reacción en cadena de la polimerasa, la reacción en cadena de la polimerasa anidada, la reacción en cadena de la ligasa o una amplificación por desplazamiento de cadena, usando cebadores específicos con fluoróforos marcados internamente para detección por FRET.

60 La etapa de analizar la muestra de orina puede incluir una reacción en cadena de la polimerasa que usa pares de cebadores suficientemente complementarios para hibridarse con una secuencia diana de los ácidos nucleicos de interés. Preferentemente, las secuencias de unión a la diana para dichos pares de cebadores están solapadas o inmediatamente adyacentes entre sí.

65 La degradación de ácido nucleico en la muestra de orina puede reducirse. La reducción de la degradación de ácido nucleico puede incluir la inhibición de la actividad nucleasa aumentando el pH, aumentando la concentración salina, termo inactivando, o tratando dicha muestra de orina con un compuesto seleccionado del grupo que consiste en: ácido etilendiaminotetraacético, clorhidrato de guanidina, isotiocianato de guanidina, N-lauroilsarcosina o dodecilsulfato sódico. Preferentemente, la muestra de orina ha permanecido en la vejiga urinaria menos de 12 horas.

La etapa de analizar la muestra de orina incluye aislar sustancialmente los ácidos nucleicos de interés en dicha muestra de orina. Preferentemente, el aislamiento puede ser por precipitación o usando un material adsorbente sólido. Preferentemente, el aislamiento es por adsorción de los ácidos nucleicos en una resina. En algunas realizaciones, los métodos comprenden adicionalmente filtrar la muestra de orina para eliminar las sustancias contaminantes. Preferentemente, el filtrado elimina los ácidos nucleicos que comprenden más de aproximadamente 1000 nucleótidos o más de aproximadamente 300 nucleótidos.

En algunas realizaciones, el análisis comprende cuantificar dichos ácidos nucleicos de interés.

A menos que se defina de otra manera, todos los términos técnicos y científicos usados en el presente documento tienen el mismo significado que el comúnmente entendido por un experto habitual en la técnica a la cual pertenece esta invención. Aunque en la práctica o ensayo de la presente invención pueden usarse métodos y materiales similares o equivalentes a los descritos en el presente documento, más adelante se describen métodos y materiales adecuados. En caso de conflicto, se controlara la presente memoria descriptiva, incluyendo sus definiciones. Además, los materiales, métodos y ejemplos son solo ilustrativos y no pretenden ser limitantes.

Otras características y ventajas de la invención se pondrán de manifiesto a partir de la siguiente descripción detallada y sus reivindicaciones.

## 20 Breve descripción de los dibujos

La Figura 1 es una representación esquemática que muestra la dependencia de la sensibilidad de la PCR sobre el tamaño del amplicón.

La Figura 2 es una representación esquemática que muestra una PCR basada en FRET con cebadores marcados con fluoróforos cerca del extremo 3'.

La Figura 3 es un gráfico que muestra la dependencia de la señal de fluorescencia sobre la distancia entre los fluoróforos donador y aceptor.

La Figura 4, Panel A, es un gráfico que muestra la detección de secuencias específicas del VEB por PCR en tiempo real basada en FRET. El Panel B muestra una curva de calibración.

La Figura 5 es un gráfico que muestra la amplificación de una diana SRY de 36 pb en un ensayo de PCR en tiempo real basado en FRET con cebador marcado.

La Figura 6 es un gráfico que muestra la detección del género fetal por ensayo de PCR en tiempo real basado en FRET con cebador marcado, de ADN extraído de la orina de una gestante.

La Figura 7 es una representación esquemática que muestra la PCR basada en FRET con cebadores que tienen colas y marcados con fluoróforos cerca del extremo 5'.

La Figura 8 es una representación esquemática que muestra una versión de un ensayo de PCR en tiempo real en un solo tubo en dos fases.

La Figura 9, Panel A, es un gráfico que muestra la detección de secuencias IS6110 de *M. tuberculosis* (diana de 39 pb) por el ensayo de PCR en tiempo real en un solo tubo en dos fases de la Figura 8. El Panel B muestra la detección de ADN-Tr de *M. tuberculosis* en las muestras de orina de pacientes con tuberculosis pulmonar y controles no infectados.

La Figura 10 es una representación esquemática que muestra una segunda versión de un ensayo de PCR en tiempo real en un solo tubo en dos fases.

La Figura 11 es un gráfico que muestra la amplificación de patrones SRY (diana de 25 pb) mediante el ensayo de PCR en tiempo real en un solo tubo en dos fases de la Figura 10.

La Figura 12 es un gráfico que muestra la detección del género fetal de ADN extraído de orina de una gestante por el ensayo de PCR en tiempo real en un solo tubo en dos fases de la Figura 10.

La Figura 13 es un gráfico que muestra una comparación de detección de secuencias TSPY específicas del cromosoma Y (diana de 43 pb) en ADN urinario purificado por métodos de Q-Sepharose y sílice por el ensayo de PCR en tiempo real en un solo tubo en dos fases de la Figura 8.

La Figura 14 es una fotografía de un gel de sílice que muestra la separación de ácidos nucleicos urinarios de alto/medio y bajo peso molecular en base a su retención diferencial por sílice en presencia de etanol.

La Figura 15 es una fotografía de un gel de sílice que muestra la abundancia comparativa de moldes específicos de MTB en ácidos nucleicos fraccionados purificados de la orina de un paciente con tuberculosis pulmonar activa.

## Descripción detallada de la invención

La presente invención proporciona diversos métodos que proporcionan un aumento significativo en la sensibilidad para el análisis de ácidos nucleicos acelulares, ultracortos (20-50 pares de bases) obtenidos de un fluido corporal.

Actualmente, los métodos más sensibles para la detección de secuencias de ADN o ARN específicas se basan en PCR o en otras técnicas de amplificación. El análisis de ADN acelular aislado de plasma, orina y heces, por métodos convencionales basados en sílice, demuestran que los fragmentos de ADN originados de células fetales o tumorales muertas, son relativamente pequeños, de alrededor de 150 nucleótidos (Chan *et al.*, Cancer Res. 63: 2028-2032, 2003; Botezatu *et al.*, Clin Chem. 46:1078-1084, 2000; Su *et al.*, J Mol Diagn. 6: 101-107,2004; y Diehl *et al.*,

Gastroenterology 135: 489-98, 2008). Sin embargo, no siempre se reconoce que la fragmentación de ADN apoptótico sea al azar, y que por consiguiente, una secuencia diana de interés se localice en fragmentos de ADN que se han escindido de diversas maneras. De hecho, en cualquier población de fragmentos de ADN determinada producidos por escisión al azar, la probabilidad de que cualquier secuencia diana determinada sobreviva intacta para estar disponible para su uso como un molde de PCR es inversamente proporcional a la longitud de dicha secuencia diana, como se ilustra en la Figura 1. Diferentes líneas en la Figura 1 representan fragmentos de ADN cortos (los fragmentos de 157 pares de bases se proporcionan como un ejemplo) generados por escisión al azar de *K-RAS* en la zona del codón 12. La línea continua en negrita representa el único fragmento que se amplifica por cebadores diseñados para el amplicón de 157 pb. Las líneas continuas finas representan un subconjunto de fragmentos de ADN amplificados por los pares de cebadores que dirigen el amplicón de 87 pb. Las líneas discontinuas son fragmentos de ADN que no están amplificados por ningún conjunto de cebadores. Por ejemplo, Su *et al.*, utilizan dos conjuntos de cebadores diseñados para la detección de *K-RAS* mutante (Su, *et al.*, Ann. Nueva York Acad. Sci. 1022: 81-89, 2004).

Las dianas más largas están fuera de fase determinadas por los cebadores respectivos. Por tanto, la ventaja de un tamaño de diana más corto es muy significativa, especialmente cuando los tamaños de las dianas se aproximan al promedio de la longitud del fragmento. El ADN aislado de orina con un método basado en sílice convencional consta de dos fracciones, ADN de alto peso molecular, que se origina de células desprendidas y una fracción de ADN-Tr de bajo peso molecular (150-250 pares de bases) (Botezatu *et al.*, Clin Chem. 46: 1078-1084, 2000; y Su *et al.*, J Mol Diagn. 6: 101-107, 2004).

Además, la aplicación de técnicas recientemente desarrolladas para aislar ácidos nucleicos acelulares de fluidos corporales para el aislamiento de ácidos nucleicos transrenales ha revelado en la orina, la presencia de fragmentos de ADN y ARN que son mucho más cortos de 150 pares de bases (Publicación de Solicitud de Patente de Estados Unidos N° 20080139801). Si estos fragmentos también representan ácidos nucleicos transrenales, la amplificación de dianas con PCR "ultracortas" u otras técnicas, capaces de detectar secuencias de ácidos nucleicos muy cortas con suficiente especificidad, pueden aumentar significativamente la sensibilidad de los ensayos basándose en análisis de ácidos nucleicos acelulares en orina y en otros fluidos corporales.

Otra razón para intentar conseguir dianas "ultracortas" es la posible presencia de roturas (cortes) monocatenarias en fragmentos de ADN acelulares. En la reacción de PCR, como moldes se usan fragmentos de ácido nucleico en su forma monocatenaria, reduciendo así adicionalmente su longitud eficaz si los fragmentos de ADN acelulares en plasma y ADN-Tr están cortados. Estas cuestiones requieren un diseño de ensayo PCR capaz de detectar secuencias diana excepcionalmente cortas. Todas las cuestiones comentadas anteriormente también pueden aplicarse a cualquier situación donde deban analizarse fragmentos de ADN cortos degradados al azar, por ejemplo, ADN de muestras tisulares incluidas en parafina, forenses o paleontológicas.

Para diseñar cebadores y sondas para la detección de dianas de ADN ultracortas por PCR convencional y en tiempo real se usaron diversas estrategias y se describen con detalle en el presente documento. Los datos obtenidos con conjuntos de cebadores/sondas, diseñados para la detección de dianas de ADN ultracortas (20-50 pares de bases), demuestran: (i) la presencia en la orina de fragmentos de ADN y ARN, que son mucho más cortos que los descritos anteriormente; (ii) la presencia de estos fragmentos de secuencias de ácidos nucleicos de bajo peso molecular que se originan en tejidos localizados fuera del sistema urinario, lo que significa que han atravesado la barrera renal - ADN transrenal (ADN-Tr); (iii) mucha mayor sensibilidad de los ensayos basados en ADN-Tr cuando se detectan dianas de ADN ultracortas en comparación con tamaños de dianas de PCR convencionales.

La detección y análisis de dianas de ADN ultracortas (20-50 pares de bases) en fluidos corporales pueden aumentar significativamente la sensibilidad de los ensayos basados en análisis de fragmentos de ADN-Tr y ADN acelular de otros fluidos corporales. El enfoque de PCR cuantitativa (PCRc) más comúnmente usado es el sistema PCR de TaqMan en Tiempo Real, que implica el uso de 3 componentes específicos de secuencias diana: 2 cebadores y 1 sonda TaqMan marcada. Este ensayo convencional idóneo para amplicones no más cortos de aproximadamente 50 bases, estando el tamaño mínimo limitado por la longitud de huella combinada de 3 componentes específicos de secuencia. Existen diversos enfoques de PCRc alternativos que eliminan la necesidad de una sonda TaqMan distinta usando diversas formas de cebadores marcados, lo que por tanto permite dianas correspondientemente más cortas. Sin embargo, la eliminación de 1 de los 3 componentes específicos de secuencia es probablemente reducir la especificidad del ensayo por la diana. La presente invención aborda la especificidad la diana frente a la longitud de la diana mínima desarrollando nuevos ensayos PCRc con cebador marcado y ensayos TaqMan modificados. Se proporcionan diversas estrategias nuevas para el diseño de cebadores y conjuntos de cebadores/sondas para la detección y el análisis cuantitativo de secuencias ultracortas por PCR en Tiempo Real. Usando estas técnicas, se ha demostrado que: (i) el análisis de dianas de ADN ultracortas aumenta significativamente la sensibilidad de los ensayos basados en ADN-Tr; (ii) los fragmentos de ADN cortos (30-150 pares de bases) contienen secuencias de ADN-Tr de ser humano y patógenos; (iii) los fragmentos de ADN-Tr más grandes también se detectan más eficazmente por cebadores para dianas de ADN ultracortos, más probablemente debido a la presencia de roturas monocatenarias en estos fragmentos de ADN.

La invención se refiere a un aumento significativo en la sensibilidad de los ensayos basados en análisis de ácidos nucleicos acelulares obtenidos de un fluido corporal seleccionado, pero sin limitación, del grupo que comprende sangre, plasma sanguíneo, suero, linfa, fluido intersticial, orina, saliva, sudor, líquido cefalorraquídeo y otros. Preferentemente, el fluido corporal se obtiene de manera no invasiva.

5 La presente invención puede usarse para muchas aplicaciones, incluyendo, pero sin limitación, analizar la presencia de ácidos nucleicos patógenos, detectar la presencia de ácidos nucleicos indicativos de cáncer, detectar la presencia de ácidos nucleicos indicativos de una enfermedad genética en un feto, analizar la presencia de ácidos nucleicos fetales, analizar la presencia de secuencias de ácidos nucleicos específicas de hospedador y específicas  
10 que no son de hospedador, para analizar la forma y el grado de metilación de un ácido nucleico diana, la detección de polimorfismos mononucleotídicos y análisis forenses.

La presente invención proporciona métodos de detección de ácidos nucleicos de un patógeno, donde dichos ácidos nucleicos se originan en zonas distintas a las del tracto urinario en un paciente, que comprende: (a) obtener una  
15 muestra de orina de dicho paciente; y (b) analizar dicha muestra de orina para detectar una o más secuencias específicas de ácidos nucleicos patógenos que son diferentes de las secuencias de ácidos nucleicos del paciente y son de ácidos nucleicos patógenos que tienen una longitud de 20-50 nucleótidos y que han atravesado la barrera renal, comprendiendo dicho análisis la etapa de detectar dicha una o más secuencias específicas del patógeno.

20 Un patógeno es un agente biológico que puede causar enfermedades a su hospedador. Un sinónimo de patógeno es "agente infeccioso". El término "patógeno" se usa más frecuentemente para agentes que alteran la fisiología normal de un organismo multicelular.

La infección es la invasión y multiplicación de microorganismos en tejidos corporales, que puede ser clínicamente no  
25 evidente o producir un daño celular local debido al metabolismo competitivo, toxinas, replicación intracelular o respuesta de anticuerpo a antígeno.

Los ácidos nucleicos patógenos pueden ser ADN o ARN. El patógeno se selecciona del grupo que consiste en un  
30 virus, una bacteria, un hongo, un micoplasma y un protozoo.

Los métodos de la invención pueden aplicarse a todos los agentes patógenos virales, incluyendo virus de ARN, ADN, episomales e integrativos. También puede aplicarse a virus recombinantes, tales como los adenovirus o  
35 lentivirus utilizados en terapia génica. Los ejemplos de virus infecciosos incluyen: Retroviridae (por ejemplo, virus de inmunodeficiencia humana, tales como el VIH-1, también denominado, HTLV-III, LAV o HTLV-III/LAV, o VIH-111; y otros aislados, tales como VIH-LP; Picornaviridae (por ejemplo, virus de la polio, virus de la hepatitis A; enterovirus, coxsackie virus humanos, rinovirus, ecovirus); Calciviridae (por ejemplo, cepas que causan gastroenteritis); Togaviridae (por ejemplo, virus de la encefalitis equina, virus de la rubéola); Flaviridae (por ejemplo, virus del dengue, virus de la encefalitis, virus de la fiebre amarilla); Coronaviridae (por ejemplo, coronavirus); Rhabdoviridae (por ejemplo, virus de la estomatitis vesicular, virus de la rabia); Fidoviridae (por ejemplo, virus del Ébola); Paramyxoviridae (por ejemplo, virus paragripal, virus de las paperas, virus del sarampión, virus sincitial respiratorio); Orthomyxoviridae (por ejemplo virus gripal); Buiigaviridae (por ejemplo virus de Hantaan, bungavirus, flebovirus y Nairovirus); Arenaviridae (virus de la fiebre hemorrágica); Reoviridae (por ejemplo reovirus, orbivirus y rotavirus); Birnaviridae; Hepadnaviridae (virus de la Hepatitis B); Parvoviridae (parvovirus); Papovaviridae (virus del papiloma, polioma virus); Adenoviridae (la mayoría de los adenovirus); Herperviridae (virus del herpes simple (VHS) 1 y 2, virus de la varicela zoster, citomegalovirus (CMV), herpes virus); Poxviridae (virus de la viruela, virus de la vacuna, poxvirus); e Iridoviridae (por ejemplo virus de la fiebre porcina africana); y virus no clasificados (por ejemplo, los agentes etiológicos de encefalopatías Espongiformes, el agente de la hepatitis delta (que se piensa que es un satélite defectuoso del virus de la hepatitis B), los agentes de la hepatitis no A, no B (clase 1 - internamente transmitidos; clase 2 - parenteralmente transmitidos (es decir Hepatitis C); virus Norwalk y relacionados y astrovirus).

Los métodos de la invención pueden aplicarse a todos los agentes bacterianos patógenos. Los ejemplos de bacterias infecciosas incluyen: *Helicobacter pyloris*, *Borrelia* (por ejemplo, *Borrelia afzelii*, *Borrelia anserine*, *Borrelia burgdorferi*, *Borrelia garinii*, *Borrelia hermsii*, *Borrelia recurrentis*, *Borrelia valaisiana*, y *Borrelia vincentii*); *Rickettsia* (por ejemplo *Rickettsia felis*, *Rickettsia prowazekii*, *Rickettsia rickettsii*, *Rickettsia typhi*, *Rickettsia conorii*, *Rickettsia africae* o *Rickettsia akari*); *Legionella pneumophila*, *Mycobacteria* sps (por ejemplo, *M. tuberculosis*, *M. avium*, *M. Intracellulare*, *M. kansasii* *M. gordonae*), *Staphylococcus aureus*, *Neisseria gonorrhoeae*, *Neisseria meningitidis*, *Listeriamonocytogenes*, *Streptococcus pyogenes* (Grupo A Streptococcus), *Streptococcus agalactiae* (Grupo B Streptococcus), *Streptococcus* (grupo viridans), *Streptococcus faecalis*, *Streptococcus bovis*, *Streptococcus* (especies anaerobias), *Streptococcus pneumoniae*, *Campylobacter* sp. patógena, *Enterococcus* sp., *Haemophilus influenzae*, *Bacillus anthracis*, *Corynebacterium diphtheriae*, *Corynebacterium* sp., *Erysipelothrix rhusiopathiae*, *Clostridium penfi ingers*, *Clostridium tetani*, *Enterobacter erogenes*, *Klebsiella pneumoniae*, *Pasturella multivida*, *Bacteroides* sp., *Fusobacterium nucleatum*, *Sreptobacillus moniliformis*, *Treponema pallidum*, *Treponema pertenue*, *Leptospira* y *Actinomyces israelii*.

65 Los ejemplos de hongos infecciosos incluyen: *Cryptococcus neoformans*, *Histoplasma capsulatum*, *Coccidioides immitis*, *Blastomyces dermatitidis*, *Chlamydia trachomatis*, *Candida albicans*. Otros organismos infecciosos (por

ejemplo protistas) incluyen: *Plasmodium falciparum* y *Toxoplasma gondii*.

En algunas realizaciones preferidas, el patógeno no viral puede ser *Helicobacter pylori*, *Bacillus anthracis*, especies de *Plasmodium* o especies de *Leishmania*.

5 La etapa de analizar la presencia de dicha secuencia de ácido nucleico patógeno de 20-50 nucleótidos de longitud se realiza usando reacción en cadena de la polimerasa, reacción en cadena de la polimerasa anidada, reacción en cadena de la ligasa y amplificación por desplazamiento de cadena.

10 La etapa de análisis también incluye detección fluorescente dependiente de FRET. Preferentemente, la etapa de realizar la reacción en cadena de la polimerasa puede comprender el uso de cebadores con sitios de unión que están inmediatamente adyacentes entre sí en la secuencia diana o ligeramente solapantes (que no tienen secuencias intermedias entre los sitios de unión al cebador).

15 La presente invención incluye adicionalmente métodos que tienen la etapa de reducir la degradación de ADN en dicha muestra de orina, que en una realización incluye el tratamiento con un compuesto seleccionado del grupo que comprende: ácido etilendiaminotetraacético, clorhidrato de guanidina, isotiocianato de guanidina, N-lauroilsarcosina y dodecilsulfato sódico. La degradación de ADN puede reducirse adicionalmente tomando una muestra de orina que haya permanecido en la vejiga urinaria menos de 12 horas.

20 En los métodos de la invención dicha secuencia de ácido nucleico está sustancialmente aislada antes de ensayar la orina para detectar la presencia de una secuencia de ácido nucleico patógeno, que ha atravesado la barrera renal. La secuencia de ácido nucleico puede aislarse sustancialmente por precipitación o por tratamiento con un material adsorbente sólido. En otra realización, la muestra de orina se filtra para eliminar las sustancias contaminantes y, en una realización específica, la filtración elimina ADN que comprende más de aproximadamente 1000 nucleótidos. Preferentemente, la filtración elimina ADN que comprende más de aproximadamente 300 nucleótidos.

25 En el presente documento también se describe un kit diagnóstico para detectar patógenos en la orina, que comprende: reactivos para facilitar el aislamiento de la orina de ADN de 20-50 nucleótidos de longitud; reactivos para facilitar la amplificación de ADN de 20-50 nucleótidos de longitud por la reacción en cadena de la polimerasa; una polimerasa de ADN termoestable; y un oligodesoxinucleótido específico para una secuencia de ácido nucleico patógeno.

30 La presente invención proporciona métodos de detección de cáncer en un paciente, que comprende: proporcionar una muestra de orina de un paciente; y analizar dicha muestra de orina para detectar una secuencia de ácido nucleico de 20-50 nucleótidos de longitud, indicativa de cáncer, que ha atravesado la barrera renal. En una realización, el análisis para detectar la presencia de dicha secuencia de ácido nucleico comprende amplificar dicha secuencia de ácido nucleico indicativa de cáncer. En otra realización específica, dicho análisis comprende cuantificar el número de copias de dicha secuencia de ácido nucleico. En una realización dicha secuencia de ácido nucleico contiene una anomalía indicativa de cáncer de colon. En otra realización, dicha secuencia de ácido nucleico contiene ADN K-ras mutante.

35 El cáncer incluye tumores sólidos, así como, tumores hematológicos y/o tumores malignos. Los diversos cánceres a tratar incluyen, pero sin limitación, cáncer de mama, cáncer de pulmón, cáncer colorrectal, cáncer pancreático, cáncer de ovario, cáncer de próstata, carcinoma renal, hepatoma, cáncer de cerebro, melanoma, mieloma múltiple, linfoma, linfoma Hodgkin, linfoma no Hodgkin, linfomas juveniles y linfomas de origen linfocítico y cutáneo, leucemia, leucemia juvenil, tricoleucemia, leucemia linfocítica aguda, leucemia mielocítica aguda, leucemia linfocítica crónica, leucemia mielocítica crónica, leucemia mielógena crónica y leucemia mastocítica, neoplasmas mieloides, neoplasmas mastocíticos, tumor hematológico y tumor linfocítico, incluyendo lesiones metastásicas en otros tejidos u órganos distantes del sitio tumoral primario. Los cánceres a tratar incluyen, pero sin limitación, sarcoma, carcinoma y adenocarcinoma.

40 La etapa de analizar la presencia de dicha secuencia de ácido nucleico de 20-50 nucleótidos de longitud se realiza usando reacción en cadena de la polimerasa, reacción en cadena de la polimerasa anidada, reacción en cadena de la ligasa o amplificación por desplazamiento de cadena. La etapa de análisis también incluye detección fluorescente dependiente de FRET. Preferentemente, la etapa de realizar la reacción en cadena de la polimerasa puede comprender el uso de cebadores con sitios de unión que están inmediatamente adyacentes entre sí en la secuencia diana o ligeramente solapantes (es decir sin secuencias intermedias entre los sitios de unión al cebador).

45 La presente invención incluye adicionalmente métodos que tienen la etapa de reducir la degradación de ADN en dicha muestra de orina, que, en una realización, incluye el tratamiento con un compuesto seleccionado del grupo que comprende: ácido etilendiaminotetraacético, clorhidrato de guanidina, isotiocianato de guanidina, N-lauroilsarcosina y dodecilsulfato sódico. La degradación de ADN puede reducirse adicionalmente tomando una muestra de orina que haya permanecido en la vejiga urinaria menos de 12 horas.

50

En los métodos de la invención, dicha secuencia de ácido nucleico está sustancialmente aislada antes de ensayar la orina para detectar la presencia de una secuencia de ácido nucleico, indicativa de cáncer, que ha atravesado la barrera renal. La secuencia de ácido nucleico puede aislarse sustancialmente por precipitación o por tratamiento con un material adsorbente sólido. En otra realización, la muestra de orina se filtra para eliminar las sustancias contaminantes, y, en una realización específica, la filtración elimina ADN que comprende más de aproximadamente 1000 nucleótidos. Preferentemente, la filtración elimina ADN que comprende más de aproximadamente 300 nucleótidos.

En otra realización adicional, se incluye un método para controlar el tratamiento del cáncer en un paciente, que comprende: proporcionar una muestra de orina de un paciente; y analizar dicha muestra de orina para determinar la cantidad de una secuencia de ácido nucleico de 20-50 nucleótidos de longitud, indicativa de cáncer, que ha atravesado la barrera renal.

En el presente documento también se describe un kit diagnóstico para detectar una mutación genética indicativa de cáncer en el ADN de un paciente, que comprende; reactivos para facilitar el aislamiento de ADN de 20-50 nucleótidos de longitud de la orina; reactivos para facilitar la amplificación de ADN de 20-50 nucleótidos de longitud por la reacción en cadena de la polimerasa; una ADN polimerasa termoestable; y un oligodesoxinucleótido específico para una secuencia que solo aparece en una mutación genética característica de cáncer.

La presente invención proporciona métodos para analizar un fragmento de ADN fetal de 20-50 nucleótidos de longitud que ha atravesado la barrera placentaria y renal, que comprende; obtener, de una gestante, una muestra de orina, que se sospecha que contiene ácidos nucleicos transrenales poliméricos fetales; y ensayar la presencia de dicho ADN polimérico fetal de 20-50 nucleótidos de longitud en dicha muestra de orina.

En una realización de la presente invención, la presencia del ADN fetal exclusivo particular de 20-50 nucleótidos de longitud es indicativa de una enfermedad genética.

La secuencia de ADN fetal diana puede ser, por ejemplo, una secuencia que esté solo presente en el cromosoma Y. La etapa de ensayar la presencia de una secuencia de ADN fetal exclusiva de 20-50 nucleótidos de longitud se realiza usando reacción en cadena de la polimerasa, reacción en cadena de la polimerasa anidada, reacción en cadena de la ligasa o amplificación por desplazamiento de cadena. La etapa de análisis también incluye detección por fluorescencia dependiente de FRET. La etapa de realizar la reacción en cadena de la polimerasa puede comprender el uso de cebadores sustancialmente complementarios a una parte de la secuencia de ADN fetal exclusiva, y la secuencia de ADN fetal exclusiva puede ser una secuencia que esté presente en el genoma paterno y que no presente en el genoma materno. Preferentemente, la etapa de realizar la reacción en cadena de la polimerasa puede comprender el uso de cebadores con sitios de unión que están inmediatamente adyacentes entre sí en la secuencia diana o ligeramente solapantes (que no tienen secuencias intermedias entre los sitios de unión al cebador).

La presente invención incluye adicionalmente métodos que tienen la etapa de reducir la degradación de ADN en la muestra de orina. La reducción de la degradación de ADN puede ser por tratamiento con compuestos seleccionados del grupo que consiste en: ácido etilendiaminotetraacético, clorhidrato de guanidina, isotiocianato de Guanidina, N-lauroilsarcosina y dodecilsulfato sódico. La degradación de ADN puede reducirse adicionalmente tomando una muestra de orina que haya permanecido en la vejiga urinaria menos de 12 horas.

En los métodos de la invención, el ADN presente en la muestra de orina está sustancialmente aislado antes del ensayo para detectar la presencia de una secuencia de ADN fetal exclusiva en la muestra de orina. El aislamiento sustancial puede ser, pero sin limitación, por precipitación y adsorción en una resina.

En algunos casos, puede ser deseable filtrar la muestra de orina para eliminar los ácidos nucleicos contaminantes antes del ensayo. En una realización específica, la filtración elimina ADN que comprende más de aproximadamente 1000 nucleótidos. Preferentemente, la filtración elimina ADN que comprende más de aproximadamente 300 nucleótidos.

La presente invención incluye adicionalmente un método para determinar el sexo de un feto, que comprende: obtener de una gestante una muestra de orina, que se sospecha que contiene ADN masculino fetal de 20-50 nucleótidos de longitud; amplificar una parte del ADN masculino de 20-50 nucleótidos de longitud presente en la muestra de orina por reacción en cadena de la polimerasa, usando un cebador oligodesoxinucleotídico que tiene secuencias específicas para una parte del cromosoma Y, para producir ADN amplificado; y detectar la presencia del ADN amplificado.

En el presente documento también se describe un kit diagnóstico para detectar, en la orina materna, la presencia de ADN fetal masculino humano de 20-50 nucleótidos de longitud, que comprende: reactivos para facilitar el aislamiento de ADN de la orina; reactivos para facilitar la amplificación de ADN por la reacción en cadena de la polimerasa; una ADN polimerasa termoestable; y un oligodesoxinucleótido específico para una secuencia que solo se produce en el cromosoma Y.



La presente invención también incluye métodos para analizar en la orina una secuencia de ácido nucleico diana de 20-50 nucleótidos de longitud, que comprende: proporcionar una muestra de orina; y ensayar la muestra de orina para determinar la presencia de una secuencia de ácido nucleico diana de 20-50 nucleótidos de longitud que ha atravesado la barrera renal.

5 En una realización, la secuencia de ácido nucleico diana de 20-50 nucleótidos de longitud comprende una secuencia génica alterada, y esta secuencia génica alterada puede comprender una modificación que se produce específicamente en células tumorales. La secuencia de ácido nucleico diana de 20-50 nucleótidos de longitud puede ser un ácido nucleico de hospedador o un ácido nucleico que no es de hospedador.

10 Las secuencia de ácido nucleico diana puede ser un polimorfismo mononucleotídico (SNP), que es una variación de secuencia de ADN que se produce cuando un solo nucleótido en el genoma (u otra secuencia compartida) difiere entre miembros de una especie (o entre cromosomas emparejados en un individuo). La secuencia de ácido nucleico que comprende el SNP puede tener cualquier longitud. Preferentemente, la secuencia de ácido nucleico que comprende el SNP tiene menos de 50 nucleótidos. Más preferentemente, la secuencia de ácido nucleico que comprende el SNP tiene una longitud entre 20-50 nucleótidos. La secuencia de ácido nucleico que comprende el SNP puede ser un ácido nucleico de hospedador o un ácido nucleico que no es de hospedador.

20 La presente invención también incluye métodos para analizar una secuencia de ácido nucleico diana de 20-50 nucleótidos de longitud en cualquier fluido o tejido corporal para realizar análisis forenses, que comprende: proporcionar una muestra de fluido o tejido; y ensayar la muestra de fluido o tejido para detectar la presencia de una secuencia de ácido nucleico diana de 20-50 nucleótidos de longitud que ha atravesado la barrera renal. El método puede comprender adicionalmente el análisis cuantitativo de dicha secuencia de ácido nucleico diana. Preferentemente, el método puede comprender adicionalmente la secuenciación de dicha secuencia de ácido nucleico diana usando cualquier método conocido en la técnica.

30 La etapa de ensayar la presencia de una secuencia de ADN diana se selecciona del grupo que consiste en reacción en cadena de la polimerasa, reacción en cadena de la polimerasa anidada, reacción en cadena de la ligasa o amplificación por desplazamiento de cadena. La etapa de ensayar la presencia de una secuencia de ADN diana puede comprender técnicas para amplificar el ADN diana. La etapa de análisis también incluye detección fluorescente dependiente de FRET. Preferentemente, la etapa de realizar la reacción en cadena de la polimerasa puede comprender el uso de cebadores con sitios de unión que están inmediatamente adyacentes entre sí en la secuencia diana o ligeramente solapantes (que no tienen secuencias intermedias entre los sitios de unión al cebador).

35 La presente invención también incluye métodos que tienen la etapa de reducir la degradación de ADN en la muestra de orina antes de ensayar la muestra de orina para detectar la presencia de una secuencia de ADN diana que ha atravesado la barrera renal. La reducción de la degradación de ADN puede ser por tratamiento con compuestos seleccionados del grupo que consiste en: ácido etilendiaminotetraacético, clorhidrato de guanidina, isotiocianato de guanidina, N-lauroilsarcosina y dodecilsulfato sódico. La degradación de ADN puede reducirse adicionalmente tomando una muestra de orina que haya permanecido en la vejiga urinaria menos de 12 horas.

40 La presente invención incluye métodos en los que el ADN en la muestra de orina está sustancialmente aislado antes de ensayar la presencia de una secuencia de ADN diana que ha atravesado la barrera renal. El aislamiento sustancial puede ser, pero sin limitación, por precipitación y adsorción en una resina. En algunos casos, es deseable filtrar la muestra de orina para eliminar los ácidos nucleicos contaminantes antes de ensayar la presencia de una secuencia de ADN diana que ha atravesado la barrera renal. En una realización específica, la filtración elimina ADN que comprende más de aproximadamente 1000 nucleótidos. Preferentemente, la filtración elimina ADN que comprende más de aproximadamente 300 nucleótidos.

50 La presente invención también incluye métodos para analizar en la orina una secuencia de ácido nucleico diana, que comprende: proporcionar una muestra de orina de un paciente, que se sospecha que contiene ADN que ha atravesado la barrera renal;; amplificar una secuencia de ADN diana en el ADN que ha atravesado la barrera renal, que comprende el uso de un cebador sustancialmente complementario a una parte de la secuencia de ADN diana que no se produce en células del tracto urinario del paciente y preparar ADN diana amplificado; y detectar la presencia del ADN diana amplificado. La amplificación puede comprender realizar una reacción en cadena de la polimerasa. La secuencia de ADN diana puede comprender una secuencia génica alterada, tal como una modificación que se produce en células tumorales.

60 La presente invención proporciona métodos para controlar material trasplantado en un paciente, que comprende: proporcionar una muestra de orina que se sospecha que contiene ácido nucleico de material trasplantado; y analizar dicha muestra de orina para detectar una secuencia de ácido nucleico de 20-50 nucleótidos de longitud que ha atravesado la barrera renal y que no está presente en el paciente antes del trasplante. En una realización específica, la secuencia de ácido nucleico de 20-50 nucleótidos de longitud no está presente en las células del tracto urinario de dicho paciente.

- En una realización específica, el análisis comprende amplificar dicha secuencia de ácido nucleico de 20-50 nucleótidos de longitud con un cebador sustancialmente complementario a una parte de dicha secuencia de ácido nucleico que no se produce en células del tracto urinario del paciente, para preparar ADN diana amplificado, y detectar la presencia de dicho ADN diana amplificado. Más específicamente, la amplificación puede comprender
- 5 realizar una reacción en cadena de la polimerasa. La etapa de análisis también incluye detección fluorescente dependiente de FRET. Preferentemente, la etapa de realizar la reacción en cadena de la polimerasa puede comprender el uso de cebadores con sitios de unión que están inmediatamente adyacentes entre sí en la secuencia diana o ligeramente solapantes (que no tienen secuencias intermedias entre los sitios de unión al cebador).
- 10 En otra realización específica se incluye la etapa adicional de reducir la degradación de ADN en dicha muestra de orina, lo cual puede realizarse de cualquier manera conocida, aunque incluye, sin limitación, situaciones en las que la reducción de la degradación de ADN es por tratamiento con un compuesto seleccionado del grupo que consiste en: ácido etilendiaminotetraacético, clorhidrato de guanidina, isotiocianato de guanidina, N-lauroilsarcosina y dodecilsulfato sódico. La degradación de ADN puede reducirse adicionalmente tomando una muestra de orina que
- 15 haya permanecido en la vejiga urinaria menos de 12 horas.
- En los métodos de la invención, dicha secuencia de ácido nucleico está sustancialmente aislada. La secuencia de ácido nucleico puede estar sustancialmente aislada por precipitación y/o por adsorción sobre una resina. Adicionalmente, se puede filtrar la muestra de orina para eliminar las sustancias contaminantes. En una realización
- 20 específica, la filtración elimina ADN que comprende más de aproximadamente 1000 nucleótidos.
- En el presente documento también se desvela un kit diagnóstico para detectar en la orina de un paciente ADN de un material trasplantado, que comprende: reactivos para facilitar el aislamiento de la orina de ADN de 20-50 nucleótidos de longitud; reactivos para facilitar la amplificación de ADN de 20-50 nucleótidos de longitud mediante la reacción en
- 25 cadena de la polimerasa; ADN polimerasa termoestable; y un oligodesoxinucleótido específico para una secuencia que se produce en el material trasplantado, y que no se produce en el paciente antes del trasplante.
- La presente invención proporciona métodos para analizar la presencia de secuencias específicas fetales de ácido nucleico ultracorto o modificaciones de ácido nucleico ultracorto detectando secuencias específicas fetales de ácido
- 30 nucleico en fluidos corporales. Preferentemente, las secuencias de ácido nucleico han atravesado las barreras placentaria y renal y están presentes en la orina materna. Los métodos generalmente implican las etapas de obtener una muestra de orina de una gestante y someter el material a un método para detectar una secuencia específica fetal de ácido nucleico ultracorto o modificación de interés. En una realización, el método incluye adicionalmente purificar sustancialmente ácidos nucleicos presentes en la muestra de orina antes de detectar la secuencia
- 35 específica de ácido nucleico ultracorto o modificación de interés. Estos métodos tienen una variedad de aplicaciones diagnósticas, que incluyen la determinación del sexo del feto y la identificación de enfermedades genéticas fetales, tales como las heredadas del padre para diversos fines, incluyendo determinaciones de paternidad.
- La invención descrita en el presente documento puede usarse, por ejemplo, para diagnosticar cualquiera de más de
- 40 3000 enfermedades genéticas actualmente conocidas o a identificar (por ejemplo hemofilia, talasemia, distrofia muscular de Duchenne, enfermedad de Huntington, enfermedad de Alzheimer y fibrosis quística). Cualquier enfermedad genética para la que se conoce la mutación (o mutaciones) u otra modificación (o modificaciones) y la secuencia de nucleótidos circundante, puede identificarse mediante los métodos de la presente invención. Algunas enfermedades pueden estar relacionadas con variaciones conocidas en metilación de ácidos nucleicos, que también
- 45 pueden identificar los métodos de la presente invención.
- Además, cada vez hay más pruebas de que algunas secuencias de ADN pueden predisponer a un individuo a cualquiera de una serie de enfermedades tales como diabetes, arteriosclerosis, obesidad, diversas enfermedades autoinmunitarias y cáncer (por ejemplo, cáncer colorrectal, de mama, de ovario, de pulmón) o anomalías cromosómicas (prenatal o postnatalmente). El diagnóstico de una enfermedad genética, aneuploidía cromosómica o predisposición genética puede realizarse prenatalmente recogiendo de la gestante un fluido corporal apropiado, tal
- 50 como orina.
- Los análisis de ADN ultracorto obtenidos no invasivamente de un fluido corporal proporcionan un modo más fácil y seguro para realizar el ensayo prenatal. Preferentemente, el fluido corporal es orina. Un feto recibe la misma cantidad de información genética de ambos padres. La pérdida de una gran cantidad de células fetales durante el desarrollo es una parte principal del programa genético para las diferenciaciones embrionarias y la formación de un organismo normal. El ADN de estas células embrionarias muertas no solo se libera en la corriente sanguínea de la madre, sino que también atraviesa la barrera renal donde aparece en la orina materna. Las partes del cromosoma Y
- 60 específico del género masculino se han descubierto en la orina de gestantes con fetos de dicho género. La información genética fetal se encontró en la orina de la madre tan pronto como de la 7ª a la 8ª semana de gestación, es decir, al menos 6-8 semanas antes de poder obtenerse por amniocentesis o muestreo de vellosidades coriónicas. Véase, por ejemplo, la Patente de Estados Unidos N° RE39.920.
- 65 En una realización de esta invención, puede usarse un ensayo no invasivo sencillo para la determinación precoz del sexo fetal. Sin embargo, hay consecuencias más trascendentales de estos hallazgos con respecto al desarrollo de

modernas técnicas diagnósticas seguras. El descubrimiento de que el ADN ultracorto del embrión en desarrollo aparece en la orina materna presenta la oportunidad de desarrollar rápidamente productos para análisis de genes hereditarios del padre. Estos incluyen genes que contienen mutaciones relacionadas con enfermedades o que pueden causar problemas en diferentes trasfondos genéticos. Como ejemplo, si una gestante es Rh-(factor Rhesus negativo) y produce anticuerpos anti-RhD y el padre es Rh<sup>+</sup>, normalmente se recomienda la amniocentesis para un diagnóstico precoz de incompatibilidad de Rh, que a menudo producen anemia hemolítica letal en el bebé recién nacido. La detección de la secuencia específica del gen de RhD en la orina materna será una excelente alternativa a la amniocentesis, considerada cada vez más peligrosa por la mayoría de médicos de todo el mundo. Este ensayo también es menos costoso y más rentable, porque evita la necesidad de una etapa quirúrgica para obtener muestras para el análisis.

Con la llegada de iniciativas de amplio mapeo genético, tal como el Proyecto del Genoma Humano, hay una lista de dianas y aplicaciones que se amplía para el análisis genético de ADN ultracorto en orina. Muchas enfermedades heredadas por el feto serán fácilmente detectables por análisis de ADN en la orina materna. Estas incluyen el Síndrome de Marfan, la anemia falciforme, la enfermedad de Tay Sachs y un grupo de trastornos neurodegenerativos, que incluyen la enfermedad de Huntington, la ataxia espinocerebelar 1, la enfermedad de Machado-Joseph, la atrofia dentato-rubro-pálido-luisiana y otras que afectan al feto y al recién nacido. El análisis de ADN en la orina puede detectar la presencia del gen mutante heredado del padre. Además, si el genoma de la madre lleva una mutación, el ensayo puede ayudar a determinar si una versión normal del gen se ha heredado del padre.

Además de proporcionar respuestas a las cuestiones normalmente formuladas por los futuros padres, la determinación del sexo fetal también puede ser muy útil si hay riesgo de enfermedad hereditaria ligada al cromosoma X, por ejemplo Hemofilia o Distrofia Muscular de Duchenne. De nuevo, el ensayo prenatal para enfermedades hereditarias se realiza habitualmente con especímenes obtenidos por amniocentesis. Existen dos desventajas principales de esta tecnología: en primer lugar, la amniocentesis solo puede realizarse después de la decimocuarta semana de gestación. En segundo lugar, en algunos casos, el riesgo asociado con un trastorno hereditario es comparable con el riesgo asociado con el procedimiento quirúrgico de la amniocentesis. La tecnología basada en ADN presente en orina puede ofrecer la información evitando al mismo tiempo ambos problemas.

Los métodos de la presente invención proporcionan un aumento significativo en cuanto a sensibilidad para analizar ácidos nucleicos acelulares, fetales y ultracortos (20-50 pares de bases).

Otro factor importante que contribuye al éxito de cualquier nuevo ensayo diagnóstico es la necesidad de que los pacientes y los médicos expresen una preferencia para el nuevo ensayo. Con frecuencia, las pacientes rechazan el ensayo prenatal invasivo debido a los riesgos acompañantes para el feto y la madre. Si a partir de un ensayo de orina seguro y sencillo, puede obtenerse la misma información, es probable que el ensayo tenga una aceptación generalizada por el público y la comunidad médica.

La presente invención también proporciona métodos que permiten la detección de secuencias de ácido nucleico ultracorto específicas que se originan del ácido nucleico endógeno del propio paciente. Estas secuencias de ácido nucleico ultracorto se obtienen de modo no invasivo de un fluido corporal. Preferentemente, las secuencias de ácidos nucleico deben atravesar la barrera renal para aparecer en la orina. El método generalmente implica las etapas de obtener una muestra de orina de un paciente y someter el material a un método para detectar una secuencia de ácido nucleico diana. En una realización, el método incluye adicionalmente purificar sustancialmente los ácidos nucleicos presentes en la muestra de orina antes de detectar el ácido nucleico diana. Este método tiene una variedad de aplicaciones diagnósticas, incluyendo, pero sin limitación, diagnósticos de tumores y diagnósticos de enfermedades causadas por expansión clonal de células que contienen modificaciones de ADN acompañadas por muerte de al menos un subconjunto de las células portadoras de modificaciones de ADN.

El éxito del tratamiento tumoral normalmente depende del tipo de tumor y del método de tratamiento. Sin embargo, el factor más importante que determina el éxito de la terapia del cáncer es la detección del tumor en la fase más temprana posible del desarrollo. Cuanto más pronto se detecte un tumor mejor será el pronóstico. En muchas afecciones pre-neoplásicas, tales como predisposición hereditaria a un tipo de tumor específico o a una enfermedad que promueve la transformación neoplásica, (por ejemplo hepatitis y cirrosis crónica), se están aplicando actualmente esfuerzos significativos para la detección precoz del tumor aunque las técnicas existentes son normalmente invasivas y costosas. El arsenal de los oncólogos incluye ahora ensayos que no son solo invasivos, con frecuencia peligrosos, sino también menos fiables de lo esperado.

Desde el punto de vista del paciente, los ensayos invasivos son costosos y suficientemente desagradables para justificar la decisión de renunciar a ensayos necesarios, tales como recto colonoscopia para el diagnóstico de cáncer colorrectal. El problema del cumplimiento es de suma importancia cuando los pacientes en riesgo se animan a someterse a procedimientos que son claramente molestos y desagradables. La mejora drástica del cumplimiento de los pacientes de alto riesgo es una necesidad absoluta para el futuro. Por tanto, el desarrollo de nuevos métodos para la detección precoz de tumores es absolutamente necesario para un progreso sustancial en este campo de la medicina. También está claro que dichos métodos no deben basarse solo en técnicas más sensibles para la

detección de síntomas clínicos de crecimiento neoplásico, sino más bien en dar a conocer marcadores específicos de células tumorales.

5 Los métodos de la presente invención proporcionan un aumento significativo en sensibilidad para analizar ácidos nucleicos acelulares, ultracortos (20-50 pares de bases), que se originan del ácido nucleico endógeno del propio paciente o sujeto.

10 Los cambios celulares precoces que pueden usarse como un marcador de transformación neoplásica son cambios que causan la transformación, es decir, modificación de genética y epigenética de ADN. Los diversos cambios en las secuencias de ADN y/o en el estado de metilación de las islas CpG (especialmente de las localizadas en regiones promotoras de genes supresores de tumores) se usan actualmente como marcadores tumorales. A medida que se descubrieron más de dichos marcadores, se ha hecho evidente que algunos son característicos de fases tumorales precoces, o incluso de afecciones pre-neoplásicas. Otras modificaciones del ADN pueden indicar fases  
15 relativamente tardías de transformación neoplásica. También hay esperanzas de que algunos cambios en las secuencias de ADN y su patrón de metilación ayuden a predecir el potencial metastásico y la sensibilidad de las células tumorales contra diferentes agentes quimioterapéuticos. La muerte celular se produce en todas las fases del crecimiento tumoral y la detección de cambios específicos de tumores en el ADN de la orina puede ser un excelente marcador para el diagnóstico tumoral y para el control de la terapia antitumoral. Una mutación específica de tumor del gen K-ras puede detectarse en la orina de pacientes con tumores colorrectales que portan esta mutación.

20 Uno de los mayores desafíos clínicos para la quimioterapia tumoral es la sensibilidad variable de diferentes tumores a fármacos anti-tumorales y la ausencia de un ensayo sencillo para la evaluación rápida en una fase precoz de la terapia anti-tumoral. Normalmente, el oncólogo puede observar los resultados del tratamiento solo después de varios meses. Mientras tanto, el tumor puede seguir creciendo y posiblemente metastatizando si el régimen quimioterapéutico es ineficaz. Una realización de la presente invención, útil para el control inmediato de la eficacia de la terapia tumoral, es el análisis cuantitativo de mutaciones específicas de tumores en el ADN de la orina de los  
25 pacientes. Si el tratamiento es eficaz, entonces mueren más células tumorales, y aumentará la proporción de la secuencia mutante con respecto a cualquier secuencia de referencia normal contenida en la orina. Eventualmente, si la quimioterapia es eficaz, la secuencia específica de tumor mutante desaparecerá. Análisis periódicos de un ADN de la orina de un paciente puede usarse para controlar un posible recrecimiento tumoral. La indicación temprana de ineficacia quimioterapéutica permitiría tiempo para intentar otros tratamientos quimioterapéuticos y anti-tumorales. Este enfoque es similarmente eficaz para la evaluación de la eficacia de la radioterapia y otras terapias contra el cáncer y para controlar después el tratamiento quirúrgico de crecimientos cancerosos.

35 La presente invención también proporciona métodos que permiten la detección de secuencias de ácido nucleico ultracorto específicas que no se originan de las secuencias de ácido nucleico endógeno del paciente. Estas secuencias de ácido nucleico ultracorto se obtienen de manera no invasiva de un fluido corporal. Preferentemente, las secuencias de ácido nucleico deben atravesar la barrera renal para aparecer en la orina. Las etapas son las mismas que para la detección de ácidos nucleicos originados de hospedador, excepto que el método de detección  
40 se selecciona para secuencias de ácido nucleico que no son de hospedador. Este método tiene una diversidad de aplicaciones diagnósticas, incluyendo, pero sin limitación, el diagnóstico de infección por patógenos que contienen ácido nucleico que infectan zonas distintas a las del tracto urinario, y no liberan ácidos nucleicos directamente al tracto urinario.

45 Los métodos de la presente invención proporcionan un aumento significativo en sensibilidad para analizar ácidos nucleicos acelulares, ultracortos (20-50 pares de bases) que no se originan del ácido nucleico endógeno del propio paciente o sujeto.

50 En una realización, la presente invención tiene importantes aplicaciones en la ciencia de trasplante de órganos y tejidos. El trasplante de diferentes órganos, tejidos y células u otro material que contiene ácidos nucleicos (denominado "material trasplantado") se usa ahora ampliamente en la práctica clínica. El problema más importante con el que tiene que enfrentarse el paciente trasplantado y el sistema de administración sanitario es el requisito para controlar cuidadosamente la respuesta inmunitaria normal del receptor que conduce al rechazo y fracaso del trasplante. A pesar de la intensa terapia diseñada para suprimir la respuesta inmunitaria del receptor, los episodios  
55 de rechazo a menudo se producen durante el periodo posterior al trasplante y su detección precoz puede ser muy útil, si no crítica, para un control clínico eficaz.

60 Cada persona tiene un patrón de genes codificados por ADN exclusivo y único. Dado que el ADN del donante es genéticamente diferente del ADN del receptor, la presente invención puede usarse para "controlar material trasplantado" que se define como detectar y/o medir el rechazo o la aceptación de órganos, tejidos y células trasplantados por el receptor. Esto reducirá e incluso eliminará en algunos casos la necesidad de tomar biopsias de tejido de pacientes ya debilitados. Se ha descrito un ensayo para determinar la presencia de secuencias de ADN específicas del cromosoma Y en la orina de mujeres receptoras que han recibido transfusiones sanguíneas con  
65 sangre de varones. Véase, por ejemplo, la Patente de Estados Unidos N° RE39.920. Estos experimentos demostraron que, debido a la muerte de leucocitos del donante varón, las secuencias específicas del cromosoma Y aparecían en la orina de la mujer receptora. Estas células sanguíneas mueren de la misma manera que las células

de un órgano trasplantado que ha sido atacado por el sistema inmunitario del receptor. Los métodos de la presente invención pueden usarse para rastrear el progreso de receptores de trasplantes de células, tejidos u órganos.

5 Los cambios en la metilación de ADN de regiones genómicas específicas afectan a la estructura de la cromatina y a la transcripción de ADN, y por consiguiente, se están investigando para determinar su implicación en diversos procesos patológicos. Como tal, el análisis de metilación del ADN transrenal ultracorto es una herramienta diagnóstica útil.

10 Las mutaciones y cambios en el estado de metilación del ADN que se producen durante la progresión tumoral pueden usarse como marcadores tumorales (Esteller et al., *Cancer Res* 59:67-70,1999; Wong et al., *Cancer Res* 59: 71-3, 1999). Diversos cambios en las secuencias de ADN y/o en el estado de metilación de islas CpG (especialmente las localizadas en regiones promotoras de genes supresores tumorales) se usan actualmente como marcadores tumorales (Baylin et al, *Adv Canc Res.* 72: 141-96,1998). También hay esperanzas de que algunos cambios en las secuencias de ADN y su patrón de metilación ayuden a predecir el potencial metastásico y la sensibilidad de las células tumorales contra diferentes agentes quimioterapéuticos, la metilación en islas CpG de algunos genes, por ejemplo, el gen de MYF-3, puede relacionarse con diferentes fases de carcinogénesis. La hipermetilación de este gen en comparación con mucosa normal se observó en el 88 % de adenomas y en el 99 % de carcinomas (Shannon et al, *Int J Cancer* 84: 109-13,1999).

20 Para el CHC no hay marcadores fiables basados en mutaciones de ADN. Sin embargo, en este caso hay un grupo de marcadores en desarrollo que se basan en la metilación de islas CpG en una región promotora génica, por ejemplo, el promotor p16 o GSTP1. La metilación de p16 se encontró en más del 70 % de los tejidos de CHC y entre los casos de CHC con metilación aberrante también se detectaron cambios similares en aproximadamente el 80 % de las muestras de plasma (Wong et al, *Cancer Res.* 59: 71-3,1999; Matsuda et al, *Gastroenterología* 116: 394-400, 1999). La hipermetilación somática de islas CpG en GSTP1 se observó en ADN de más del 80 % de casos de CHC (Tchou et al, *Int J Oncol* 16: 663-76, 2000).

30 La metilación de islas CpG en promotores de genes supresores tumorales conduce a su inactivación y está implicada en afecciones pre-neoplásicas y carcinogénesis, y, como tal, puede usarse para el diagnóstico de aquellos procesos patológicos. La metilación de genes receptores de estrógeno se ha relacionado con enfermedad cardíaca (Fricker J., *Mol. Med. Today*, 5, 505-506,1999). El síndrome del cromosoma X frágil no solo está asociado con la expansión del número de repeticiones en tándem del trinucleótido CGG en la región 5' no traducida del gen FMR1 sino también con la hipermetilación en las repeticiones CGG y las islas CpG adyacentes (Panagopoulos et al., *Hum. Mutat.*, 14,71-79,1999). El análisis del estado de metilación en las islas CpG del gen del polipéptido N asociado a la ribonucleoproteína nuclear pequeña (SNRPN) usando cultivos celulares de líquido amniótico o muestras de vellosidades coriónicas cultivadas se ha recomendado para el diagnóstico prenatal del síndrome de Prader-Willi y Angelman (Kubota et al., *J. Med. Genet.*, 33,1011-1014,1996). La hipermetilación de ADN de la región promotora del gen de la E-cadherina es característica de hepatitis crónica y cirrosis hepática (Kanai et al., *Cancer Lett.*, 148, 73-80, 2000). Por supuesto, muchas más modificaciones en el estado de metilación del ADN estarán asociadas con diversas enfermedades en el futuro. La detección de estas modificaciones en el ADN transrenal será un marcador útil en el ensayo prenatal así como para el diagnóstico de procesos patológicos en organismos adultos.

45 También se sabe que el envejecimiento viene acompañado por cambios específicos en el estado de metilación del genoma, la hipermetilación de algunas islas CpG y la desmetilación en regiones codificantes del genoma (Toyota and Issa, *Seminars in Cancer Biol.*, 9, 349-357, 1998). La detección de estos cambios en el ADN trans-renal, que contiene fragmentos de ADN de diversos tipos de células, puede usarse como un marcador de procesos de envejecimiento normal y patológico.

50 En diversas referencias, incluyendo, pero sin limitación, *Molecular Cloning: A Laboratory Manual*, 2ª ed., Vol. 1-3, eds. Sambrook et al. Cold Spring Harbor Laboratory Press (1989); y *Current Protocols in Molecular Biology*, eds. Ausubel et al., Greene Publishing y Wiley-Interscience: Nueva York (1987) y actualizaciones periódicas, se describen técnicas de manipulación de ácido nucleico útiles para la práctica de la presente invención. Descripciones específicas, aunque sin pretender limitar el alcance de la presente invención, proporcionan una orientación en la práctica de determinados aspectos de la presente invención.

55 El ADN se somete a degradación por DNAsas presentes en fluidos corporales, tales como orina. La presente invención incluye diversos métodos para prevenir o reducir la degradación de ADN al mismo tiempo en la orina de tal manera que secuencias suficientemente grandes estén disponibles para la detección por métodos de detección de ADN conocidos tales como los descritos a continuación. En una realización, las muestras de orina se toman cuando la orina ha permanecido en la vejiga urinaria menos de 12 horas, en una realización específica la orina permanece en la vejiga urinaria durante menos de 5 horas, más preferentemente durante menos de 2 horas. La recogida y análisis de una muestra de orina antes de haber permanecido en la vejiga urinaria durante un largo período de tiempo reduce la exposición del ADN a cualquier DNasa presente en la orina.

65 En otra realización de la presente invención, después de su recogida, la muestra de orina se trata usando uno o más métodos de inhibición de la actividad DNasa. Los métodos para inhibir la actividad DNasa incluyen, pero sin

limitación, el uso de ácido etilendiaminetetraacético (EDTA), clorhidrato de guanidina, GITC (isotiocianato de guanidina), N-lauroilsarcosina, dodecilsulfato sódico (SDS), concentración salina elevada y termoinactivación de DNasa.

5 Incluso en otra realización, después de la recogida, la muestra de orina se trata con un adsorbente que atrapa el ADN, después de lo cual el adsorbente se retira de la muestra, se lava y se trata para liberar el ADN atrapado para la detección y análisis. Este método no sólo aísla el ADN de la muestra de orina, sino que, cuando se usa con algunos adsorbentes, incluyendo, pero sin limitación membranas de Hybond N (Amersham Pharmacia Biotech Ltd., Piscataway, NJ) protege al ADN de la degradación por actividad DNasa.

10 En algunos casos, la cantidad de ADN en una muestra de orina es limitada. Por lo tanto, para determinadas aplicaciones, la presente invención incluye realizaciones en las que la sensibilidad de detección aumenta mediante cualquier método (o métodos) conocido en la técnica incluyendo, sin limitación, uno o más de los siguientes métodos.

15 Cuando el ADN está presente en cantidades minoritarias en la orina, pueden recogerse muestras de orina más grandes y después de eso concentrarse mediante cualquier medio que no afecte a la detección del ADN presente en la muestra. Algunos ejemplos incluyen, sin limitar el alcance de la invención, la reducción de líquidos presentes en la muestra mediante concentración con butanol o concentración usando Sephadex G-25 (Pharmacia Biotech, Inc., Piscataway NJ).

20 La PCR anidada puede usarse para mejorar la sensibilidad por diversos órdenes de magnitud. Debido a la vulnerabilidad de la PCR anidada contra resultados imprecisos debido a la contaminación del ADN, en una realización de la presente invención, se toman precauciones para impedir la contaminación del ADN de la muestra. Por ejemplo, sin limitar la presente invención, se pueden tratar reactivos de la PCR con una o más endonucleasas de restricción que escinden dentro de la secuencia diana, antes de añadirlos a la muestra de ADN de ensayo.

25 En los métodos de la invención, los ácidos nucleicos se purifican o aíslan sustancialmente de una muestra antes de la detección. Las moléculas de ácido nucleico pueden aislarse de la orina usando cualquiera de los diversos procedimientos que son muy conocidos en la técnica. Se acepta cualquier método de aislamiento que facilite la detección de ácido nucleico diana. Por ejemplo, el ADN puede aislarse por precipitación, como describen Ishizawa et al., Nucleic Acids Res. 19, 5972 (1991). Cuando una muestra de gran volumen contiene una baja concentración de ADN, como con la orina, se incluye un método de aislamiento de ADN preferido. En este método, se trata una muestra con un adsorbente que actúa concentrando el ADN. Por ejemplo, una muestra puede tratarse con un material sólido que adsorberá el ADN, tal como, sin limitación, DEAE Sephadex A-25 (Pharmacia Biotech, Inc., Piscataway NJ), un filtro de ADN y/o leche de vidrio. La muestra de ADN se eluye del adsorbente después lavar las otras composiciones.

30 Considerando la sensibilidad de diversas técnicas de análisis de ácido nucleico, tales como la PCR, la presente invención también incluye métodos para reducir la presencia de ácidos nucleicos contaminantes en la muestra de orina. La contaminación de muestras de orina con secuencias de ácido nucleico que no han atravesado la barrera renal puede introducirse por células que se desprenden del revestimiento del tracto urinario, por relaciones sexuales, o durante el procesamiento de la muestra de orina antes de la detección de la secuencia de ADN de interés. Sin pretender limitar la presente invención a ningún mecanismo, se cree que el ADN que atraviesa la barrera renal y aparece en la orina tiene probablemente, por término medio, una longitud más corta que el ADN introducido a partir de fuentes contaminantes debido la fragmentación que se produce en las células apoptóticas y en las células necróticas en el organismo, combinado con la acción de la DNasa en la sangre y orina.

35 La filtración puede usarse para reducir el nivel de ADN contaminante en una muestra de orina antes de la detección, seleccionando secuencias más cortas de ADN. En una realización de la presente invención los ácidos nucleicos contienen más de aproximadamente 1000 pares de bases, o 1000 nucleótidos cuando está desnaturizado, que se eliminan de la muestra antes de la detección. En una realización específica de la presente invención, las muestras de orina se filtran antes de la amplificación por PCR para eliminar sustancialmente todo el ADN que comprende más de 300 pares de bases, o 300 nucleótidos cuando está desnaturizado. Sin limitar la invención a un mecanismo específico, se propone que dicha filtración elimine el ADN contaminante de células que se desprenden de la pared de la uretra/vejiga urinaria o que se introducen en la uretra durante las relaciones sexuales. La mayoría del ADN procedente de dichas fuentes contaminantes comprende probablemente más de 300 nucleótidos dado que el ADN no es en su mayor parte producto de fragmentación de ácidos nucleicos como resultado de muerte celular apoptótica.

40 Las moléculas de ácido nucleico también pueden aislarse por electroforesis en gel, mediante la cual, los fragmentos de ácido nucleico se separan de acuerdo con el peso molecular. La técnica de polimorfismos de longitud de fragmentos de restricción (PLFR), aplica los métodos de separación por electroforesis, seguido de detección de ácido nucleico que permite realizar la comparación por peso molecular de fragmentos de dos o más alelos de una secuencia génica específica.

65

Los métodos de purificación anteriormente mencionados pretenden describir, pero no limitar, los métodos idóneos para su uso en la invención. Los métodos de aislamiento de ácidos nucleicos se incluyen en la destreza de un experto en la materia y no se describen con detalle en el presente documento.

5 La expresión "ensayar la presencia de una secuencia de ácido nucleico" se refiere al uso de cualquier método para determinar si una secuencia de ácido nucleico está o no presente en una muestra. Los métodos incluyen, pero sin limitación, técnicas de hibridación, amplificación y detección de ácidos nucleicos. Un experto en la técnica tiene acceso a una multitud de estos métodos, incluyendo, pero sin limitación, los expuestos en Current Protocols in Molecular Biology, eds. Ausubel et al., Greene Publishing y Wiley-Interscience: Nueva York (1987) y actualizaciones  
10 periódicas. Se contempla que dos o más métodos puedan usarse en combinación para confirmar los resultados o mejorar la sensibilidad del ensayo. Un ejemplo de analizar por la combinación de métodos para determinar si una secuencia de ácido nucleico está o no presente, es la técnica de polimorfismos de longitud de fragmentos de restricción basada en PCR ("PCR-PLFR"), donde las secuencias de ácido nucleico se amplifican, se tratan con enzimas de restricción y se separan por electroforesis, lo que permite la detección de ácidos nucleicos que  
15 contienen pequeñas modificaciones, tales como modificaciones puntuales.

Los términos "detectar" y "analizar" en relación a una secuencia de ácido nucleico, se refieren al uso de cualquier método de observación, determinación o cuantificación de señales que indican la presencia de la secuencia de ácido nucleico diana en una muestra o la cantidad absoluta o relativa de esa secuencia de ácido nucleico diana en una  
20 muestra. Los métodos pueden combinarse con métodos de marcaje de ácido nucleico para proporcionar una señal, por ejemplo, mediante: fluorescencia, radioactividad, colorimetría, gravimetría, difracción o adsorción de rayos X, magnetismo, actividad enzimática y similar. Después, la señal puede detectarse y/o cuantificarse, mediante métodos apropiados para el tipo de señal, para determinar la presencia o ausencia, de la secuencia de ADN específica de interés.

25 "Cuantificar", en relación a una secuencia de ácido nucleico, se refiere al uso de cualquier método para estudiar la cantidad de una secuencia de ácido nucleico particular, incluyendo, sin limitación, métodos para determinar el número de copias de una secuencia de ácido nucleico o para determinar el cambio en la cantidad de copias de la secuencia de ácido nucleico a lo largo del tiempo, o determinar la concentración relativa de una secuencia cuando se compara con otra secuencia.  
30

Para ayudar en la detección y análisis, las secuencias de ADN específicas pueden "amplificarse" de diversas maneras, incluyendo, pero sin limitación, reacción de ciclado de sondas (Bekkaoui, F. et al, BioTechniques 20,240-248 (1996), reacción en cadena a la polimerasa (PCR), PCR anidada, PCR-SSCP (polimorfismo conformacional monocatenario), reacción en cadena de la ligasa (LCR) (F. Barany Proc. Natl. Acad. Sci USA 88: 189-93 (1991)),  
35 clonación, amplificación por desplazamiento de cadena (ADC) (GK Terrance Walker et al., Nucleic Acids Res. 22: 2670-77 (1994), y variaciones tales como amplificación específica de alelos (AEA).

Una alternativa a la amplificación de una secuencia de ADN específica que puede usarse para indicar la presencia de esa secuencia en métodos de la presente invención se basa en la hibridación de una estructura de escisión de ácido nucleico con la secuencia específica, seguido por escisión de la estructura de escisión de una manera específica de sitio. Este método se denomina en el presente documento "detección del producto por escisión". Este método se describe con detalle en las Patentes de Estados Unidos Nos 5.541.331 y 5.614.402, y en las publicaciones PCT Nos WO 97/27214 y WO 94/29482. Permite la detección de pequeñas cantidades de secuencias de ácido nucleico específicas sin amplificar la secuencia de ADN de interés.  
45

Los métodos de la presente invención proporcionan un aumento significativo en cuanto a sensibilidad para el análisis de ácidos nucleicos acelulares, ultracortos (20-50 pares de bases).

50 Un método de detección y análisis de dianas específicas de ADN ultracorto utiliza cebadores específicos que internamente están marcados con fluoróforos. En un ejemplo, se diseñaron pares de cebadores específicamente para la diana de ADN ultracorto de interés de tal manera que los sitios de unión al cebador carecían de cualquier secuencia intermedia en el producto PCR bicatenario. Es decir, las secuencias diana cebadoras se encuentran inmediatamente adyacentes entre sí o se solapan. Cada uno de los cebadores en el par de cebadores está internamente marcado con un fluoróforo cerca del extremo 3'. Los fluoróforos apropiados se seleccionan de los conocidos en la técnica. En algunas realizaciones, los fluoróforos son 6-carboxifluoresceína y carboxi-X-rodamina. Preferentemente, las bases más cercanas al extremo 3' no se marcan para garantizar el inicio libre de la reacción de polimerización de ADN. Los fluoróforos están separados de tal manera que en los dos cebadores hay 6-11 bases entre los fluoróforos. Preferentemente, la separación entre fluoróforos es de 6-10 bases. Después de la unión de los  
55 cebadores marcados, y de la inclusión de los materiales apropiados necesarios para la amplificación por PCR, una reacción de PCR amplifica la secuencia diana generando productos oligo nucleotídicos bicatenarios, trans-marcados con los dos fluoróforos en estrecha proximidad. El producto marcado amplificado se detecta después por fluorescencia dependiente de transferencia de energía de resonancia de Förster (FRET, siglas en inglés). En algunas realizaciones, los productos inespecíficos se diferencian de los productos específicos midiendo la temperatura de fusión (disociación). El Ejemplo 1 y la Figura 2 describen estos cebadores y la posterior reacción de amplificación.  
60  
65

Otro método de detección y análisis de dianas específicas de ADN ultracorto utiliza cebadores específicos que comprenden colas oligonucleotídicas en los extremos 5' de sus secuencias de unión a diana. Estas colas oligonucleotídicas están marcadas en sus extremos 5' con fluoróforos apropiados. Las colas oligonucleotídicas no tienen homología con ninguna otra secuencia en la reacción, salvo que se diseñen secuencias cortas adyacentes a los fluoróforos para ser complementarias a secuencias en la cola oligonucleotídica del par de cebadores opuesto, de tal manera que, si las dos colas oligonucleotídicas se ponen en estrecha proximidad, se unirán entre sí. Cada cebador en el par de cebadores contiene una base de replicación bloqueante para separar la región de unión a diana de la cola oligonucleotídica que comprende el fluoróforo. Esto garantiza que las colas no se repliquen durante la PCR y que sigan siendo monocatenarias. Puede utilizarse cualquier base de replicación bloqueante conocida en la técnica, tal como, iso-dC. Después de la unión de los cebadores marcados, y de la inclusión de los materiales apropiados necesarios para la amplificación por PCR, una reacción de PCR amplifica la secuencia diana generando productos oligonucleotídicos bicatenarios. Las secuencias complementarias de las colas oligonucleotídicas se hibridan, acercando estrechamente los pares de fluoróforos. El producto marcado amplificado se detecta después por fluorescencia dependiente de FRET. La fluorescencia se mide a una temperatura a la cual los extremos adhesivos solo se hibridan si son parte de la misma molécula bicatenaria del producto de la PCR. El Ejemplo 2 y la Figura 7 describen estos cebadores y la posterior reacción de amplificación.

Otro método de detección y análisis de dianas específicas de ADN ultracorto utiliza tres componentes específicos de secuencia, incluyendo una sonda TaqMan. Este método permite amplicones muy cortos mediante un solapamiento parcial de la secuencia de reconocimiento diana de la sonda TaqMan con el cebador en sentido (misma cadena) específico de diana. Este método utiliza un esquema de PCR<sub>c</sub>, de un solo tubo, en dos fases. En la fase 1, el ADN diana es el que se amplifica usando los cebadores C1 y C2, que mapean muy próximos entre sí en la secuencia diana, permitiendo de este modo moldes muy cortos. El cebador C1 lleva una secuencia de extensión en el extremo 5' no relacionada con la diana, que se incorpora en los productos intermedios PI1/PI2 de la PCR, junto con la secuencia molde. El producto intermedio PI2 resultante de la PCR es lo suficientemente largo como para servir como molde en la fase 2, donde intervienen los cebadores C3 y C2 y una sonda So TaqMan, que se marca con un fluoróforo y un inactivador.

La mecánica de la fase 2 es muy parecida a la de un ensayo PCR<sub>c</sub> TaqMan convencional. Durante esta fase, al igual que en un ensayo PCR<sub>c</sub> TaqMan convencional, la cantidad de producto final de la PCR se controla midiendo el aumento de fluorescencia de la mezcla PCR. Los tres componentes específicos de diana en el ensayo son los cebadores C3 y C2 y la sonda (So) TaqMan. La determinación de las temperaturas de hibridación ( $T_h$ ) de los oligonucleótidos participantes, sus concentraciones, temperaturas de extensión y el número de ciclos en cada fase es una parte importante del desarrollo del ensayo. El ensayo resultante demuestra ser excepcionalmente sensible, altamente específico de secuencia e idóneo para la detección de fragmentos diana tan cortos como de 20 a 50 bases (dianas "ultracortas").

Cuando se selecciona entre posibles dianas, se otorga preferencia a las localizadas en las regiones de la secuencia genómica de  $T_f$  relativamente alta, lo que permite el diseño de cebadores y sondas correspondientemente cortos. La  $T_f$  del complejo sonda So/producto PCR se seleccionó que fuese de 68 °C a 70 °C. La  $T_f$  de las secuencias de reconocimiento diana de los cebadores C2 y C3 se seleccionó para que fuese de 8 °C a 10 °C por debajo de la de la sonda So, como normalmente sería en un ensayo TaqMan convencional. La  $T_f$  de la secuencia de reconocimiento diana del cebador C1 se seleccionó para que fuese de 8 °C a 10 °C por debajo de la de los cebadores C2 y C3 para permitir el control de la duración de cada fase modificando la temperatura de la fase de hibridación/extensión. Este requisito de baja  $T_f$  también permite una secuencia de reconocimiento diana muy corta en el cebador C1, reduciendo de esta manera la longitud global necesaria mínima del molde. Este método se muestra esquemáticamente en la Figura 8 y se describe en el Ejemplo 3.

En el ejemplo preferido del método descrito anteriormente, el cebador C1 se modifica adicionalmente de tal manera que esté en una configuración plegada de tallo-bucle y mantenga esta estructura a la temperatura de la fase de hibridación/extensión de la etapa 2. Esto consigue una mejor linealidad del ensayo e impide que el cebador C1 compita por el molde con la sonda So en la fase 2. Además, la región bucle-tallo comprende adicionalmente una base de replicación bloqueante conocida en la técnica. La inclusión de una base de replicación bloqueante impide que la región bucle-tallo se copie en el producto PCR. En un ejemplo, la base de replicación bloqueante es iso-DC. Este método se muestra esquemáticamente en la Figura 10 y se describe en el Ejemplo 4.

Sin limitar la presente invención a ningún método específico de detección, análisis o cuantificación de regiones metiladas del ADN, las siguientes técnicas son útiles para evaluar la metilación del ADN. Los métodos para el mapeo y cuantificación de las regiones metiladas del ADN, en general, y para el análisis de ADN transrenal, en particular, pueden agruparse en dos clases: métodos que permiten evaluar el estado de metilación global de islas CpG y métodos para analizar la metilación específica de secuencias.

Los métodos del primer grupo se basan en un enfoque de hibridación de Southern, basado en la utilización de propiedades de nucleasas de restricción sensibles a metilación. Hatada et al., describen un método de barrido genómico para organismos superiores usando sitios de restricción como puntos de referencia (Proc Natl Acad Sci USA 88 (21): 9523-7,1991). Issa et al., muestran que la metilación de las islas CpG del receptor estrogénico se



relacionan con el envejecimiento y la neoplasia en colon humano (Nat Genet (4): 536-40, 1994). Pogribny y Yi, describen un nuevo método sensible para la detección rápida de patrones de metilación anómalos en ADN global con y dentro de islas CpG (Biochem Biophys Res Commun 262 (3): 624-8,1999).

- 5 En este grupo también puede incluirse la tecnología basada en micromatrices de ADN recientemente diseñada. Huang et al., describen perfiles de metilación de islas CpG en células de cáncer de mama humano (Genet (3): 459-70,1999).

10 Los métodos en el segundo grupo se basan en el registro de las diferencias de secuencia entre alelos metilados y no metilados resultantes del tratamiento de ADN con bisulfito. El registro normalmente se realiza por amplificación PCR usando cebadores específicos para ADN metilado y no metilado. Herman et al, describen una PCR específica de metilación: a novel PCR assay for methylation status of CpG islands (Proc Natl Acad Sci USA 93(18):9821-6, 1996). Dependiendo del entorno experimental se han desarrollado diversos enfoques basados en esta estrategia.

- 15 También hay diversas opciones para la cuantificación de islas CpG metiladas en pequeñas cantidades de ADN (Xiong y Laird, Nucleic Acids Res 25(12):2532-4,1997, describen COBRA: un ensayo de metilación de ADN sensible y cuantitativo y Olek et al., Nucleic Acids Res 24(24):5064-6,1996, describen un método modificado y mejorado de análisis de metilación de citosina basado en bisulfito) y ADN parcialmente degradado procedente de secciones de patología microdisecionada (Gonzalzo y Jones, Nucleic Acids Res 25 (12): 2529-31, 1997, describen la rápida cuantificación de diferencias de metilación en sitios específicos usando extensión con cebador mononucleotídico sensible a metilación (Ms-SNuPE, por las siglas *Methylation Sensitive Single Nucleotide Primer Extension*)). Adicionalmente, hay un SSCP (polimorfismo conformacional monocatenario) sensible a metilación que se desarrolló para el análisis de sitios de metilación múltiples en islas CpG (Kinoshita et al, Anal Biochem 278 (2):. 165-9, 2000, describen métodos para explorar regiones hipermetiladas por polimorfismo conformacional monocatenario sensible a metilación) y una PCR en tiempo real específica de metilación extremadamente sensible (Eads et al., Nucleic Acids Res 28 (8): E32, 2000, describen MethyLight: un ensayo de alto rendimiento para medir la metilación del ADN).

30 La reacción en cadena de la polimerasa mediada por ligamiento (LMPCR, siglas en inglés) se ha usado para la detección de aductos de ADN en posiciones de nucleótidos individuales en genes de mamífero. Enzimas específicas de aductos, tales como la endonucleasa V de T4, enzimas reparadoras de escisión de bases, como la nucleasa UVTABC, y escisión química, pueden usarse para convertir los aductos en roturas de cadena de ADN. Las posiciones de estas roturas se detectan después por LMPCR. Yoon y Lee, Mol Cells 10(1):71-5,2000, describen el mapeo de aductos de ADN-altromicina B a resolución nucleotídica en el ADN genómico humano por PCR mediada por ligamiento. Pfeifer, et al, Proc Natl Acad Sci USA 88 (4): 1374-8,1991, describen el mapeo *in vivo* de un aducto de ADN a resolución nucleotídica: detección de fotoproductos de pirimidina (6-4) pirimidona por reacción en cadena de la polimerasa mediada por ligamiento. Pfeifer y Tang, Toxicol Lett 102-130: 447-51, 1998, describen enfoques basados en PCR para el análisis de aductos.

40 Usando este enfoque, se mapeó la distribución de aductos de benzo[a]pireno diol epóxido (formados por benzo[a]pireno, el carcinógeno principal del humo de tabaco) en el gen P53 a resolución nucleotídica. La formación del aducto se observó en las posiciones nucleotídicas que parecían ser puntos calientes mutacionales en cánceres de pulmón humano. Denissenko et al., Science 274 (5286): 430-2, 1996, describen la formación preferencial de aductos de benzo[a]pireno en puntos calientes mutacionales de cáncer de pulmón en P53. Se observó una tendencia similar en el caso de cáncer de piel. Tommasi et al, Cancer Res 57 (21): 4727-30, 1997, muestran que la luz solar induce la producción de dímeros de pirimidina preferentemente en bases de 5-metilcitosina. Por tanto, la distribución de aductos de ADN en el gen p53 causada por carcinógenos ambientales se corresponde con puntos calientes mutacionales de determinados cánceres.

50 Estos datos indican que la cuantificación tanto de aductos de ADN como su mapeo nucleotídico específico de genes en ADN transrenal puede usarse para la evaluación de efectos genotóxicos de factores ambientales, nutricionales y otros carcinógenos, así como para la predicción de la predisposición resultante a un tipo de cáncer específico.

Para facilitar el entendimiento de la invención, a continuación se definen diversos términos.

55 El término "gen" se refiere a una secuencia de ADN que comprende secuencias de control y codificantes necesarias para la transcripción de una secuencia de ARN. El término "genoma" se refiere al complemento génico completo de un organismo, contenido en un conjunto de cromosomas en eucariotas.

60 La expresión "ultracorta" se refiere a una secuencia de ADN o ARN menor de 50 nucleótidos. Preferentemente, menor de 45 nucleótidos, menor de 40 nucleótidos, menor de 35 nucleótidos, menor de 30 nucleótidos, menor de 25 nucleótidos, menor de 20 nucleótidos, menor de 15 nucleótidos, menor 10 nucleótidos, menor de 5 nucleótidos. Más preferentemente, la secuencia de ADN o ARN tiene entre 20 y 50 nucleótidos.

65 Un gen o una secuencia génica "de tipo silvestre" es aquel gen o aquella secuencia que se observa más frecuentemente en una población y por tanto se denomina arbitrariamente como la forma "normal" o "de tipo silvestre" del gen. En cambio, los términos "modificado(a)", "mutante", "anomalía" o "alterado(a)" se refieren a un

gen, a una secuencia o a un producto génico que presenta modificaciones en su secuencia y/o propiedades funcionales (es decir, características alteradas) cuando se compara con el gen, la secuencia y/o el producto génico de tipo silvestre. Por ejemplo, una secuencia alterada detectada en la orina de un paciente puede presentar una modificación que se produce en las secuencias de ADN de células tumorales y no se produce en las células normales del paciente (es decir, no cancerosas). Se observa que los mutantes de origen natural pueden aislarse; se identifican debido a que tienen características alteradas cuando se comparan con el gen o producto génico de tipo silvestre. Sin limitar la invención a la detección de cualquier tipo específico de anomalía, las mutaciones pueden adoptar diversas formas, incluyendo mutaciones por adición, adición-delección, delección, por desplazamiento de fase, por sentido erróneo, puntuales, por desplazamiento de fase de lectura, inversas, transicionales y de transversión, así como alteraciones de microsatélites.

Una " anomalía genética asociada con enfermedad" se refiere a un gen, a una secuencia o a un producto génico que presenta modificaciones en la secuencia cuando se compara con el gen de tipo silvestre y que es indicativa de la propensión a desarrollar o a la existencia de una enfermedad en el portador de esa anomalía. Una anomalía genética asociada con enfermedad abarca, sin limitación, anomalías hereditarias, así como nuevas mutaciones.

La expresión "secuencia exclusiva de ADN fetal " se define como una secuencia de ácido nucleico que está presente en el genoma del feto, pero no en el genoma materno.

Los términos "oligonucleótido" y "polinucleótido" y ácido nucleico "polimérico" son intercambiables y se definen como una molécula que comprende dos o más desoxirribonucleótidos o ribonucleótidos, preferentemente más de tres, y normalmente más de diez. El tamaño exacto dependerá de muchos factores, que a su vez dependerán de la función o uso final del oligonucleótido. El oligonucleótido puede generarse de cualquier manera, incluyendo síntesis química, replicación, transcripción inversa de ADN, o una combinación de las mismas.

Dado que para constituir oligonucleótidos, se hace reaccionar a los mononucleótidos de tal manera que el fosfato 5' de un anillo de pentosa mononucleotídico se una al oxígeno 3' de su vecino en una dirección mediante un enlace fosfodiéster, un extremo de un oligonucleótido se denomina "extremo 5'" si su fosfato 5' no está unido al oxígeno 3' de un anillo de pentosa mononucleotídico y lo mismo para el "extremo 3'" si su oxígeno 3' no está unido a un fosfato 5' de un anillo de pentosa mononucleotídico subsiguiente. Como se usa en el presente documento, una secuencia de ácido nucleico, incluso si es interna con respecto a un oligonucleótido más grande, también puede decirse que tiene extremos 5' y 3'.

Cuando dos oligonucleótidos diferentes, no solapantes, se hibridan con regiones diferentes de la misma secuencia de ácido nucleico complementaria lineal, y el extremo 3' de un oligonucleótido apunta hacia el extremo 5' del otro, el primero puede denominarse oligonucleótido "cadena arriba" y el último oligonucleótido "cadena abajo".

El término "cebador" se refiere a un oligonucleótido que puede actuar como un punto de inicio de síntesis cuando se coloca en condiciones en las que se inicia la extensión del cebador. Un "cebador" oligonucleótido puede producirse de manera natural, como en una digestión purificada por restricción, o puede producirse de manera sintética.

Un cebador se selecciona para ser "sustancialmente" complementario a una cadena de secuencia específica del molde. Un cebador debe ser suficientemente complementario como para hibridarse con una cadena molde para que se produzca la elongación del cebador. Una secuencia cebadora no necesita reflejar la secuencia exacta del molde. Por ejemplo, un fragmento nucleotídico no complementario puede unirse al extremo 5' del cebador, siendo el resto de la secuencia cebadora sustancialmente complementaria a la cadena. Las bases no complementarias o secuencias más largas pueden intercalarse en el cebador, siempre que la secuencia cebadora tenga suficiente complementariedad con la secuencia del molde para hibridarse y por lo tanto formar un complejo cebador molde para la síntesis del producto de extensión del cebador.

Un ácido nucleico "diana" es una secuencia de ácido nucleico a evaluar por hibridación, amplificación o por cualquier otro medio de análisis de una secuencia de ácido nucleico, incluyendo una combinación de métodos de análisis.

Los métodos de "hibridación" implican el apareamiento de una secuencia complementaria con el ácido nucleico diana (la secuencia a analizar). La capacidad de dos polímeros de ácido nucleico que contienen secuencias complementarias para encontrarse entre sí y emparejarse a través de la interacción de emparejamiento de bases es un fenómeno muy reconocido. Se han seguido las observaciones iniciales del proceso de "hibridación" de Marmur y Lane, Proc. Natl. Acad. Sci. USA 46: 453 (1960) y de Doty et al., Proc. Natl. Acad. Sci. USA 46: 461 (1960) por el perfeccionamiento de este proceso en una herramienta esencial de biología moderna. La hibridación incluye, pero sin limitación, técnicas de hibridación por ranura, mancha y transferencia.

Es importante, para algunas aplicaciones diagnósticas, determinar si la hibridación representa complementariedad completa o parcial. Por ejemplo, cuando se desea detectar simplemente la presencia o ausencia de ADN patógeno (tal como de un virus, bacteria, hongo, micoplasma, protozoo) solo es importante que el método de hibridación garantice la hibridación cuando la secuencia en cuestión esté presente; pueden seleccionarse condiciones en las que se hibriden sondas tanto parcialmente complementarias como sondas totalmente complementarias. Otras

aplicaciones diagnósticas, sin embargo, podrían requerir que el método de hibridación diferencie entre complementariedad parcial y completa. Puede ser interesante detectar polimorfismos genéticos.

5 Los métodos que permiten el mismo nivel de hibridación en el caso de complementariedad tanto completa como  
parcial son generalmente inadecuados para dichas aplicaciones; la sonda se hibridará tanto con la secuencia diana  
variante como normal. La presente invención contempla que para algunos propósitos diagnósticos, la hibridación se  
combine con otras técnicas (tales como análisis con enzimas de restricción). La hibridación, independientemente del  
método usado, requiere algún grado de complementariedad entre la secuencia a analizar (la secuencia diana) y el  
10 fragmento de ADN usado para realizar el ensayo (la sonda). (Por supuesto, puede obtenerse la unión sin ninguna  
complementariedad pero esta unión es no específica y ha de evitarse).

15 El complemento de una secuencia de ácido nucleico como se usa en el presente documento se refiere a un  
oligonucleótido que, cuando se alinea con la secuencia de ácido nucleico de tal manera que el extremo 5' de una  
secuencia se empareja con el extremo 3' de la otra, esté en "asociación antiparalela". Pueden incluirse bases  
específicas no normalmente encontradas en ácidos nucleicos naturales en los ácidos nucleicos de la presente  
invención e incluyen, por ejemplo, inosina y 7-desazaguanina. La complementariedad no tiene por qué ser perfecta;  
los dúplex estables pueden contener pares de bases desaparejados o bases no emparejadas. Los expertos en la  
técnica de tecnología de ácidos nucleicos pueden determinar empíricamente la estabilidad de los dúplex  
considerando diversas variables que incluyen, por ejemplo, la longitud del oligonucleótido, la composición de bases y  
20 secuencias del oligonucleótido, la fuerza iónica y la frecuencia de pares de bases desaparejados.

Como se usa en el presente documento, el término "Tf" se usa en referencia a la "temperatura de fusión". La  
temperatura de fusión es la temperatura a la cual una población de moléculas de ácido nucleico bicatenario  
comienza a medio disociarse en cadenas sencillas. La ecuación para calcular la Tf de los ácidos nucleicos es bien  
25 conocida en la técnica. Como indican referencias convencionales, una estimación simple del valor de la Tf puede  
calcularse mediante la ecuación:  $T_f = 81,5 + 0,41 (\% G + C)$ , cuando un ácido nucleico está en solución acuosa a  
NaCl 1 M (véase, por ejemplo, Anderson y Young, Quantitative Filter Hybridisation, in Nucleic Acid Hybridisation  
(1985). Otras referencias incluyen cálculos más sofisticados que tienen en cuenta características estructurales así  
como de secuencia para el cálculo de la Tf.

30 El término "sonda" como se usa en el presente documento, se refiere a un oligonucleótido (es decir, una secuencia  
de nucleótidos), bien de origen natural como en una digestión purificada por restricción o bien producida  
sintéticamente, que forma una estructura dúplex u otro complejo con una secuencia en otro ácido nucleico, debido a  
la complementariedad u otro medio de interacción atrayente reproducible, de al menos una secuencia en la sonda  
35 con una secuencia en el otro ácido nucleico. Las sondas son útiles en la detección, identificación y aislamiento de  
secuencias génicas particulares. Se contempla que cualquier sonda usada en la presente invención se marcará con  
cualquier "molécula indicadora", de tal manera que sea detectable en cualquier sistema de detección, incluyendo,  
pero sin limitación, sistemas enzimáticos (por ejemplo, ELISA, así como ensayos histoquímicos basados en  
enzimas), fluorescentes, radiactivos y luminiscentes. También se contempla que el oligonucleótido de interés (es  
40 decir, a detectar) se marcará con una molécula indicadora. También se contempla que tanto la sonda como el  
oligonucleótido de interés se marcarán. No se pretende que la presente invención se limite a ningún sistema de  
detección o marcador particular.

45 El término "marcador" como se usa en el presente documento, se refiere a cualquier átomo o molécula que pueda  
usarse para proporcionar una señal detectable (preferentemente cuantificable), y que pueda unirse al ácido nucleico  
o proteína. Los marcadores proporcionan señales detectables mediante diversos métodos, incluyendo, pero sin  
limitación, fluorescencia, radiactividad, colorimetría, gravimetría, difracción por rayos X o absorción, magnetismo, y  
actividad enzimática.

50 La expresión "sustancialmente monocatenaria" cuando se usa en referencia a una diana de ácido nucleico, significa  
que la molécula diana existe principalmente como una sola cadena de ácido nucleico a diferencia de una diana  
bicatenaria que existe como dos cadenas de ácido nucleico que se mantienen unidas entre sí por interacciones de  
pares de bases intercatenarios.

55 La expresión "variación de secuencia" como se usa en el presente documento, se refiere a diferencias en la  
secuencia de ácido nucleico entre dos moldes de ácido nucleico. Por ejemplo, un gen estructural de tipo silvestre y  
una forma mutante de este gen estructural de tipo silvestre puede variar en secuencia por la presencia de  
sustituciones y/o deleciones o inserciones de una sola base de uno o más nucleótidos. Estas dos formas del gen  
estructural se dice que varían en secuencia entre sí. Puede existir una segunda forma mutante del gen estructural.  
60 Esta segunda forma mutante se dice que varía en secuencia a partir de tanto el gen de tipo silvestre como de la  
primera forma mutante del gen.

Las expresiones "firma de estructura de sonda", "firma de hibridación" y "perfil de hibridación" se usan  
indistintamente en el presente documento para indicar el nivel medido de formación de complejo entre un ácido  
65 nucleico diana y una sonda o conjuntos de sondas, siendo dichos niveles medidos característicos del ácido nucleico  
diana cuando se comparan con niveles de formación de complejos que implican dianas o sondas de referencia.

La expresión "emparejamiento de cebadores oligonucleotídicos o complementarios a una secuencia génica" se refiere a cebadores oligonucleotídicos capaces de facilitar la síntesis dependiente de molde de ácidos nucleicos mono o bicatenarios. El emparejamiento de cebadores oligonucleotídicos o complementariedad con una secuencia génica pueden usarse en las PCR, RT-PCR y similar.

5 La expresión "secuencia de ácido nucleico", como se usa en el presente documento, se refiere a un oligonucleótido, nucleótido o polinucleótido, y a fragmentos o a partes de los mismos, y a ADN o ARN de origen genómico o sintético que puede ser mono o bicatenario, y representa la cadena en sentido o antisentido.

10 Una "delección" se define como un cambio en cualquier secuencia de nucleótidos o de aminoácidos donde falta uno o más nucleótidos o restos de aminoácidos, respectivamente.

Una "inserción" o "adición" es ese cambio en una secuencia de nucleótidos o de aminoácidos que ha resultado de la adición de uno o más nucleótidos o restos de aminoácidos, respectivamente, en comparación con secuencias de origen natural.

15 Una "sustitución" se produce por el reemplazo de uno o más nucleótidos o aminoácidos por diferentes nucleótidos o aminoácidos, respectivamente.

20 Una "modificación" en una secuencia de ácido nucleico se refiere a cualquier cambio en una secuencia de ácido nucleico, incluyendo, pero sin limitación, una delección, una adición, una adición-delección, una sustitución, una inserción, una inversión, una transversión, una mutación puntual, una alteración de microsatélite, metilación o formación de aducto nucleotídico.

25 Como se usa en el presente documento, las expresiones "purificada", "descontaminada" y "esterilizada" se refieren a la eliminación de una o más sustancias contaminantes de una muestra.

Como se usa en el presente documento, las expresiones "sustancialmente purificadas" y "sustancialmente aisladas" se refieren a secuencias de ácido nucleico que se han extraído, aislado o separado de su medio natural, y preferentemente carecen del 60 %, más preferentemente del 75 %, y aún más preferentemente del 90 % de otros componentes con los que se asocian en la naturaleza. Por lo tanto un "polinucleótido aislado" es un polinucleótido sustancialmente purificado. Se contempla que para poner en práctica los métodos de la presente invención, los polinucleótidos pueden estar, pero no necesariamente, sustancialmente purificados. En la técnica se conocen diversos métodos para la detección de secuencias de ácido nucleico en forma no purificada.

30 La "amplificación" se define como la producción de copias adicionales de una secuencia de ácido nucleico y se realiza generalmente usando reacción en cadena de la polimerasa u otras tecnologías bien conocidas en la materia (por ejemplo, Dieffenbach y Dveksler, PCR Primer, a Laboratory Manual, Cold Spring Harbor Press, Plainview, Nueva York [1995]). Como se usa en el presente documento, la expresión "reacción en cadena de la polimerasa" ("PCR") se refiere al método de KB Mullis (Patentes de Estados Unidos Nos 4.683.195 y 4.683.202, incorporadas en el presente documento por referencia), que describen un método para aumentar la concentración de un segmento de una secuencia diana en una mezcla de ADN genómico sin clonación o purificación. Este proceso para amplificar la secuencia diana consiste en la introducción de un gran exceso de dos cebadores oligonucleotídicos a la mezcla de ADN que contiene la secuencia diana deseada, seguido por una secuencia exacta de ciclado térmico en presencia de una ADN polimerasa. Los dos cebadores se complementan con sus respectivas cadenas de la secuencia diana bicatenaria. Para efectuar la amplificación, la mezcla se desnaturaliza y los cebadores se emparejan después con sus secuencias complementarias en la molécula diana. Después del emparejamiento, los cebadores se extienden con una polimerasa para formar un nuevo par de cadenas complementarias. Las etapas de desnaturalización, emparejamiento de cebadores y extensión con polimerasa pueden repetirse muchas veces (es decir, la desnaturalización, el emparejamiento y la extensión constituyen un "ciclo"; puede haber numerosos "ciclos") para obtener una alta concentración de un segmento amplificado de la secuencia diana deseada. La longitud del segmento amplificado de la secuencia diana deseada se determina mediante las posiciones relativas de los cebadores uno con respecto a otro, y por lo tanto, esta longitud es un parámetro controlable. En virtud del aspecto repetitivo del proceso, el método se denomina "reacción en cadena de la polimerasa" (en lo sucesivo en el presente documento "PCR"). Dado que los segmentos amplificados deseados de la secuencia diana se convierten en las secuencias predominantes (en cuanto a concentración) en la mezcla, se dice que están "amplificados por PCR".

35 Como se usa en el presente documento, el término "polimerasa" se refiere a cualquier enzima adecuada para su uso en la amplificación de ácidos nucleicos de interés. Se pretende que el término incluya dichas ADN polimerasas y ADN polimerasa de Taq obtenida de *Thermus aquaticus*, aunque en esta definición también se incluyen otras polimerasas, tanto termoestables como termolábiles.

40 Con la PCR, es posible amplificar una sola copia de una secuencia diana específica en ADN genómico a un nivel que pueda detectarse por diversas metodologías diferentes (por ejemplo, tinción, hibridación con una sonda marcada; incorporación de cebadores marcados con biotina, seguido de detección de conjugado avidina-enzima; incorporación de trifosfatos desoxinucleotídicos marcados con <sup>32</sup>P, tales como dCTP o dATP, en el segmento

amplificado). Además de ADN genómico, puede amplificarse cualquier secuencia oligonucleotídica con el conjunto apropiado de moléculas cebadoras. En particular, los segmentos amplificados creados por el propio proceso de la PCR, son de por sí mismos, moldes eficaces para posteriores amplificaciones por PCR. Las secuencias diana amplificadas pueden usarse para obtener segmentos de ADN (por ejemplo genes) para su inserción en vectores recombinantes.

Como se usa en el presente documento, las expresiones "producto de PCR" y "producto de amplificación" se refieren a la mezcla de compuestos resultante después de completar dos o más ciclos de etapas de desnaturalización, emparejamiento y extensión de la PCR. Estos términos incluyen el caso en el que ha habido una amplificación de uno o más segmentos de una o más secuencias diana.

Como se usa en el presente documento, las expresiones "endonucleasas de restricción" y "enzimas de restricción" se refieren a enzimas bacterianas, cada una de las cuales cortan ADN bicatenario en o cerca de una secuencia de nucleótidos específica.

Como se usa en el presente documento, las expresiones "complementario" o "complementariedad" se usan en referencia a polinucleótidos (es decir, una secuencia de nucleótidos) relacionada por las normas de emparejamiento de bases. Por ejemplo, la secuencia "A-G-T", es complementaria a la secuencia "T-C-A". La complementariedad puede ser "parcial", donde solo algunas de las bases de ácidos nucleicos se emparejan de acuerdo con las normas de emparejamiento de bases. O puede haber una complementariedad "completa" o "total" entre los ácidos nucleicos. El grado de complementariedad entre cadenas de ácidos nucleicos tiene efectos significativos sobre la eficacia y fuerza de hibridación entre cadenas de ácidos nucleicos. Esto es de particular importancia en las reacciones de amplificación, así como en los métodos de detección que dependen de la unión entre ácidos nucleicos.

El término "homología" se refiere a un grado de complementariedad. Puede haber una homología parcial o una homología completa (es decir, identidad). Una secuencia parcialmente complementaria es una que inhibe al menos parcialmente una secuencia completamente complementaria de la hibridación con un ácido nucleico diana al cual se hace referencia usando el término funcional "sustancialmente homólogo". La inhibición de la hibridación de la secuencia completamente complementaria con la secuencia diana puede examinarse usando un ensayo de hibridación (transferencia de Southern o Northern, hibridación en solución y similar) en condiciones de baja rigurosidad. Una secuencia o sonda sustancialmente homóloga competirá por e inhibirá la unión (es decir, la hibridación) de un homólogo completamente con una diana en condiciones de baja rigurosidad. Esto no quiere decir que las condiciones de baja rigurosidad sean tales que se permita la unión no específica; las condiciones de baja rigurosidad requieren que la unión de dos secuencias entre sí sea una interacción específica (es decir, selectiva). La ausencia de unión no específica puede ensayarse mediante el uso de una segunda diana que carece incluso de un grado de complementariedad parcial (por ejemplo, identidad menor de aproximadamente 30 %); en ausencia de unión no específica la sonda no se hibridará con la segunda diana no complementaria.

Para comprender las condiciones de baja o alta rigurosidad pueden emplearse numerosas condiciones equivalentes; se consideran factores tales como la longitud y la naturaleza (composición de ADN, ARN, bases) de la sonda y naturaleza de la diana (composición de ADN, ARN, bases, presente en solución o inmovilizado, etc.) y la concentración de las sales y otros componentes (por ejemplo, la presencia o ausencia de formamida, sulfato de dextrano, polietilenglicol) y la solución de hibridación puede variar para generar condiciones de hibridación de baja o alta rigurosidad diferentes, pero equivalentes, de las condiciones indicadas anteriormente. El término "hibridación" como se usa en el presente documento incluye "cualquier proceso mediante el cual una cadena de ácido nucleico se une con una cadena complementaria a través del emparejamiento de bases (Coombs, Dictionary of Biotechnology, Stockton Press, Nueva York N.Y. [1994]).

La "rigurosidad" generalmente se produce en un intervalo de  $T_f$  de aproximadamente  $5^\circ\text{C}$  ( $5^\circ\text{C}$  por debajo de la  $T_f$  de la sonda) a aproximadamente  $20^\circ\text{C}$  a  $25^\circ\text{C}$  por debajo de la  $T_f$ . Como comprenderán los expertos en la técnica, puede usarse una hibridación rigurosa para identificar o detectar secuencias polinucleotídicas idénticas o para identificar o detectar secuencias polinucleotídicas similares o relacionadas.

Como se usa en el presente documento, la expresión "complejo de hibridación" se refiere a un complejo formado entre dos secuencias de ácido nucleico en virtud de la formación de enlaces hidrógeno entre bases de G y C complementarias, y entre bases de A y T complementarias; estos enlaces de hidrógeno pueden estabilizarse adicionalmente por interacciones de apilamiento de bases. Las dos secuencias de ácido nucleico complementarias se unen mediante enlaces hidrógeno en una configuración antiparalela. Puede formarse un complejo de hibridación en solución (por ejemplo análisis COt o ROt) o entre una secuencia de ácido nucleico presente en solución y otra secuencia de ácido nucleico inmovilizada en un soporte sólido (por ejemplo, una membrana de nylon o un filtro de nitrocelulosa como se emplea en la transferencia de Southern y Northern, transferencia puntual o un portaobjetos como se emplea en la hibridación *in situ*, incluyendo FISH [hibridación fluorescente *in situ*]).

Como se usa en el presente documento, el término "antisentido" se usa en referencia a secuencias de ARN que son complementarias a un ARN específico (por ejemplo, ARNm) o a una secuencia de ADN. El ARN antisentido puede producirse mediante cualquier método, incluyendo síntesis por corte y empalme de uno o más genes de interés en

una orientación inversa a un promotor viral que permite la síntesis de una cadena codificante. Una vez introducida en una célula, esta cadena transcrita se combina con el ARNm natural producido por la célula para formar dúplex. Estos dúplex bloquean después la transcripción posterior del ARNm o su traducción. De esta manera, pueden generarse fenotipos mutantes. La expresión "cadena antisentido" se usa en referencia a una cadena de ácido nucleico que es complementaria a la cadena en "sentido". El símbolo (-) (es decir, "negativo") se usa a veces en referencia a la cadena antisentido, usándose el símbolo (+) algunas veces en referencia a la cadena en sentido (es decir, "positiva").

El término "muestra" como se usa en el presente documento se usa en su más amplio sentido. Una muestra biológica que se sospecha que contiene ácido nucleico puede comprender, pero sin limitación, ADN genómico (en solución o unido a un soporte sólido, tal como para análisis de transferencia de Southern), ADNc (en solución o unido a un soporte sólido), y similar.

La expresión "tracto urinario" como se usa en el presente documento se refiere a los órganos y conductos que participan en la secreción y eliminación de la orina del organismo.

Las expresiones "ADN transrenal" y "ácido nucleico transrenal" como se usan en el presente documento se refieren a ácidos nucleicos que han atravesado la barrera renal. El ADN transrenal como se usa en el presente documento se diferencia del miARN. Específicamente, el ADN transrenal comprende caracteres aleatorios en los extremos 3' y 5', que no están presentes en el miARN.

La presente invención incluye una plataforma para la detección y análisis específico de genes de fragmentos de ADN transrenal "ultracortos" que portan diferentes lesiones nucleotídicas y aductos causados por diversos factores externos e internos modificadores de ADN. Sin limitar el alcance de la invención, pero con el interés de aclarar, algunos factores que generan modificaciones del ADN deben agruparse en tres clases: (i) físicos, incluyendo pero sin limitación, radiación gamma y UV, fluctuaciones de temperatura; (ii) químicos, incluyendo, pero sin limitación, contaminantes ambientales, genotoxinas de origen natural, carcinógenos, fármacos anticancerosos y (iii) metabolitos en reactivos, tales como formas activas de oxígeno, productos de peroxidación lipídica y agentes hidrolíticos.

A continuación la invención se describe adicionalmente a través de los siguientes ejemplos. Los ejemplos también ilustran metodología útil para poner en práctica la invención. Estos ejemplos no limitan la invención reivindicada.

## Ejemplos

### Ejemplo 1

El Ejemplo 1 muestra el diseño de cebadores con fluoróforos internamente localizados para la detección de dianas de ADN ultracorto por PCR usando fluorescencia dependiente de FRET.

La especificidad de un ensayo típico de PCR con cebador marcado está exclusivamente determinada por la especificidad de los dos cebadores, y por lo tanto dicho ensayo no puede diferenciar entre moldes que tienen los mismos sitios de unión a cebador pero diferentes secuencias intermedias. Para detectar fragmentos diana muy cortos y superar esta limitación, se desarrollaron nuevos ensayos con cebador marcado, específicos para dianas en las que los sitios de unión a cebador están inmediatamente adyacentes entre sí o incluso ligeramente solapantes, careciendo de este modo de cualquier secuencia intermedia. Dichos amplicones se caracterizan por el par de secuencias derivadas de cebadores dispuestas muy cerca entre sí en el producto de la PCR bicatenario. En el ensayo, la proximidad mutua de oligonucleótidos marcados con fluorescencia se detectó por transferencia de energía por resonancia de Förster (FRET) entre ellos. Para ensayar la eficacia de un ensayo FRET, se diseñó un sistema modélico que consistiría en dos cebadores internamente marcados con un par de fluoróforos FRET ampliamente usados, la 6-carboxifluoresceína (FAM) y la carboxi-X-rodamina (ROX).

Dirección	ID	Molde	SEC ID Nº:
Cebador directo:	ES0343-FL	5'-CGTCCGTGCTGTGCGACG-[FL-dT]-AG-3'	1
Cebador inverso	ES0344-RX	5'-CATACCAGCCATCAGAG-[ROX-dT]-GC-3'	2

Como se muestra en la Figura 2, cada fluoróforo se conjugó con una base de timina en la posición 3 a partir del extremo 3' de cada cebador. En la Figura 2, M indica un molde; C1 y C2 indica cebadores; D y A indican fluoróforos Donador y Aceptor, respectivamente. El marcaje de los cebadores en bases internas y el dejar al menos las 2 bases más próximas al extremo 3' sin marcar es necesario para garantizar el inicio libre de la reacción de polimerización de ADN (Ahmad and Ghasemi, Anal Bioanal Chem. 387: 2737-43,2007). Ese sistema modélico se utilizó para determinar la separación entre los fluoróforos que produce la mayor eficiencia FRET ensayándolo en diversos moldes oligonucleotídicos con un intervalo de separación entre los 2 sitios de unión al cebador.

MOLDE	SEPARACION ENTRE FLUORÓFOROS	SEC ID N°:
5' - CAGCACGTCCGTGCTGTGACGCTAGACATCAGC ACTCTGATGGCGTGGTATGACGAC - 3'	11	3 4
5' - CAGCACGTCCGTGCTGTGACGCTAGCATCAGC ACTCTGATGGCGTGGTATGACGAC - 3'	10	5 6
5' - CAGCACGTCCGTGCTGTGACGCTAGATCAGC ACTCTGATGGCGTGGTATGACGAC - 3'	9	7 8
5' - CAGCACGTCCGTGCTGTGACGCTAGATGC ACTCTGATGGCGTGGTATGACGAC - 3'	7	9 10
5' - CAGCACGTCCGTGCTGTGACGCTAGAGC ACTCTGATGGCGTGGTATGACGAC - 3'	6	11 12
5' - CAGCACGTCCGTGCTGTGACGCTAGGC ACTCTGATGGCGTGGTATGACGAC - 3'	5	13 14
5' - CAGCACGTCCGTGCTGTGACGCTAC ACTCTGATGGCGTGGTATGACGAC - 3'	4	15 16

La PCR genera un producto oligonucleotídico bicatenario trans-marcado con los 2 fluoróforos, la distancia espacial entre la cual se supone que se correlaciona directamente con la separación entre los sitios de unión al cebador en el molde proporcionado. Aunque la variación de señal para diferentes moldes no fue muy significativa, la Figura 3 muestra un pico en la eficiencia FRET en la separación de fluoróforo de 6 a 10 bases en el producto PCR. Basándose en los resultados de la Figura 3, el ensayo puede detectar fragmentos diana muy cortos, conteniendo estos los dos sitios de unión al cebador en proximidad inmediata entre sí. La longitud mínima de fragmentos diana detectable con este sistema se aproxima por la longitud combinada de los 2 sitios de unión al cebador, alcanzando aproximadamente de 20 a 50 bases.

Después, este método se ensayó con respecto a su capacidad para detectar la secuencia de la región BamHI-W del virus de Epstein-Barr (VEB). Se diseñó un par de cebadores y se marcaron internamente con FAM y ROX, y la amplificación por PCR de la diana en tiempo real se controló midiendo la señal de emisión de fluorescencia a 610 nm con una excitación a 492 nm.

Dirección	ID	Molde	SEC ID N°:
Cebador directo:	ES0430-FL	5'-ATCGCAGAGCCCAGGATG-[FL-dT]-CC-3'	17
Cebador inverso	ES0431-RX	5'-ACGAGCTCTAGGGTCCCTTC-[ROX-dT]-GG-3'	18
Diana de 39 pb		5'-CAGAGCCCAGGATGTCCCCAGAAGGGACCCTAG-3'	19

Para controlar el nivel de fluorescencia de fluoróforos individuales, también se midió la emisión de fluorescencia a 516 nm con una excitación de 492 nm (FAM), y una emisión a 610 nm con una excitación de 585 nm (ROX). En la reacción no se observó aumento simultáneo en el nivel de fluorescencia de los fluoróforos individuales, lo que indica que todo el aumento de la fluorescencia (492 nm ex / 610 nm em) era atribuible a la FRET entre los fluoróforos. La Figura 4 muestra que este método permite la detección de tan solo 10 copias de la secuencia del VEB diana en una reacción de 25 µl. Específicamente, la Figura 4, Panel A muestra la amplificación de patrones del VEB en el ensayo de PCR en tiempo real basado en FRET con cebador marcado y la Figura 4, Panel B muestra la curva de calibración.

En otro ejemplo de la aplicación de PCR en tiempo real basada en FRET con cebador marcado, se diseñó un par de cebadores marcados con fluoróforo para la detección de una secuencia específica del cromosoma Y. La PCR con estos 2 cebadores amplifica una región de 36 pb del gen de SRY (*Sex-determining Region Y*), dando lugar a un producto con los fluoróforos donador y aceptor separados entre sí por 6 bases.

Dirección	ID	Molde	SEC ID N°:
Cebador directo:	ES0619-FL	5'-CCGCAGATCCCGC-[FL-dT]-TCG-3'	20
Cebador inverso	ES0620-RX	5'-GCACTTCGCTGCAGAG-[ROX-dT]-ACC-3'	21

Dirección	ID	Molde	SEC ID N°:
Diana 39 pb		5'-CCGCAGATCCCGCTTCGGTACTCTGCAGCGAAGTGC-3'	22

La Figura 5 muestra la amplificación de la región de SRY de 36 pb como se ha descrito anteriormente.

5 El ensayo de SRY por FRET se aplicó a muestras de ADN purificadas de la orina de gestantes. Los resultados de la Figura 6 muestran la detección de secuencias SRY en muestras de gestantes con fetos de sexo masculino, pero no en una muestra de una gestante con un feto de sexo femenino. En la Figura 6, M indica muestras de gestantes con fetos del sexo masculino y F indica una muestra de una gestante con un feto del sexo femenino.

10 La señal de fluorescencia detectada por el método de FRET con cebador marcado indica la presencia de productos de amplificación bicatenarios en los que (i) ambos cebadores marcados se incorporan y (ii) los cebadores se incorporan de tal manera que los fluoróforos se colocan muy próximos entre sí. En la mayoría de los casos, estos dos requisitos bastan para garantizar que solamente los productos de PCR específicos generan señal de fluorescencia detectable. Sin embargo, la desventaja de usar un método de PCR altamente sensible es la generación ocasional, incontrolada, de productos inespecíficos, que también pueden dar lugar a una señal fluorescente dependiente de FRET. En la PCR convencional, los productos inespecíficos se diferencian generalmente por tamaño usando electroforesis en gel. El método de FRET con cebador marcado permite diferenciar estos productos inespecíficos midiendo su temperatura de fusión (disociación). Por ejemplo, un producto inespecífico más grande presenta probablemente una mayor temperatura de fusión que la de un producto específico. Dado que la FRET solo se produce cuando estos productos están en su estado bicatenario, su transición a un estado monocatenario viene acompañada por una disminución en la fluorescencia FRET. Por lo tanto, la temperatura de esta transición puede medirse inmediatamente después de la fase de amplificación, sin necesidad de ningún colorante adicional. La fase de amplificación y las señales de fluorescencia en la fase de fusión se basan en el mismo efecto FRET, garantizando de este modo que en ambos casos se analiza el mismo producto.

## 25 Ejemplo 2

El Ejemplo 2 muestra el diseño de cebadores con fluoróforos localizados en el extremo 5' para la detección de dianas de ADN ultracorto por PCR usando fluorescencia dependiente de FRET.

30 En comparación con cebadores no marcados, el uso de cebadores marcados con fluoróforos cerca de sus extremos 3' puede disminuir la eficacia de la PCR, más probablemente debido a la reducción en la capacidad de procesamiento de la polimerasa ya que ésta lee bases marcadas con fluoróforo de los cebadores incorporados en los moldes. Para superar este problema, se desarrolló otra variante del esquema PCRc FRET con cebador marcado. En este ejemplo, como se muestra en la Figura 7, los cebadores contienen colas oligonucleotídicas en los extremos 5' de sus secuencias de unión a diana. En la Figura 7, M indica molde; C1 y C2 indican cebadores; D y A indican fluoróforos donadores y aceptores, respectivamente; los círculos en negrita indican las posiciones de modificaciones de replicación bloqueante. Las colas están marcadas en sus extremos 5' con fluoróforos apropiados, de tal manera que cada molécula bicatenaria del producto PCR lleva un par de fluoróforos FRET. En cada cebador, la cola está separada de la región de unión a diana mediante una base de replicación bloqueante, tal como iso-dC, para garantizar que las colas no se replican durante la PCR, y por tanto permanecen monocatenarias. Las colas se seleccionan para que no tengan homología con ninguna otra secuencia en el sistema, con la excepción de que se diseñan tramos de secuencia cortos inmediatamente adyacentes a los fluoróforos para que sean complementarios entre sí (extremos adhesivos). El emparejamiento de los extremos adhesivos acerca estrechamente los fluoróforos del par FRET entre sí. Debido a su concentración local aumentada, se espera que estos extremos adhesivos se emparejen más rápidamente cuando ambos formen parte del mismo producto PCR bicatenario. La fluorescencia se mide a una temperatura a la cual los extremos adhesivos se emparejan solamente si forman parte de la molécula bicatenaria del producto PCR. La intensidad de fluorescencia FRET medida a esta temperatura se correlaciona directamente con el rendimiento del producto PCR. Los productos PCR inespecíficos de longitud significativamente más grande no deben contribuir a la señal de fluorescencia FRET porque sus extremos adhesivos están demasiado separados como para emparejarse entre sí.

55 Se diseñó un sistema modélico para analizar esta versión de ensayo con cebador marcado. Se mezclaron dos oligonucleótidos "cebadores" marcados en sus extremos 5' con los colorantes FAM y ROX, respectivamente y se añadieron a una serie de oligonucleótidos "molde", y se midieron las curvas de disociación de las mezclas. Los moldes contenían secuencias complementarias entre sí de los dos cebadores y diferían en la distancia entre estas secuencias. En cada mezcla se generaron las curvas de disociación. Se observó una señal FRET aumentada de los oligonucleótidos marcados en presencia de los "moldes", lo que muestra que es posible detectar la incorporación de los cebadores marcados en los productos PCR.

60



Ejemplo 3

El Ejemplo 3 muestra el diseño del esquema de la PCR de un solo tubo para la detección de dianas de ADN ultracorto.

5 Se desarrolló un nuevo esquema de PCRc que ofrece alta especificidad diana utilizando tres componentes específicos de secuencia, que incluían una sonda TaqMan, que incluso permite amplicones muy cortos mediante un solapamiento de secuencia de reconocimiento diana parcial de la sonda TaqMan con el cebador específico de diana en sentido (misma cadena). Para alojar el solapamiento de la sonda y el cebador, se diseñó un nuevo esquema de PCRc de un solo tubo en 2 fases. El diagrama de flujo proporcionado en la Figura 8 muestra los detalles y etapas específicos de la reacción. En la Figura 8, M indica molde; C1, C2, y C3 indican cebadores; PI1 y PI2 indican productos intermedios; So indica sonda TaqMan™, doblemente marcada con fluoróforo F e inactivador I. En la fase 1, el molde M de ADN diana se amplificó usando los cebadores C1 y C2, que mapean en estrecha proximidad entre sí en la secuencia diana, lo que permite moldes muy cortos. El cebador C1 lleva una secuencia de extensión en el extremo 5' no relacionada diana, que se incorpora en el producto PI1/PI2 de la PCR junto con la secuencia molde. El producto intermedio PI2 de la PCR resultante es suficientemente largo para servir como molde en la fase 2, lo que implica los cebadores C3 y C2 y una sonda So TaqMan marcada. Los mecanismos de la fase 2 son en gran medida idénticos a los de un ensayo PCRc TaqMan convencional. Durante esta fase, al igual que en un ensayo PCRc TaqMan convencional, la cantidad de producto final de la PCR se controla midiendo el aumento de fluorescencia de la mezcla de PCR. Los tres componentes específicos de diana en el ensayo son los cebadores C3 y C2 y la sonda (So) TaqMan. La determinación de las temperaturas de emparejamiento ( $T_e$ ) de los oligonucleótidos participantes, sus concentraciones, temperaturas de extensión y el número de ciclos en cada fase es una parte importante del desarrollo del ensayo. El ensayo resultante confirma ser excepcionalmente sensible, altamente específico de secuencia e idóneo para la detección de fragmentos diana tan cortos con tan solo 20 a 50 bases (dianas "ultracortas").

Los componentes oligonucleotídicos implicados en el ensayo PCRc en 2 fases para dianas ultracortas se diseñó con las siguientes consideraciones:

- 30 - Cuando se selecciona entre posibles dianas, se da preferencia a las localizadas en regiones de secuencia genómica de  $T_f$  relativamente elevada, lo que permite el diseño de cebadores y sondas correspondientemente cortos.
- La  $T_f$  del complejo producto PCR - So sonda se seleccionó que era de 68 °C a 70 °C.
- 35 - La  $T_f$  de las secuencias de reconocimiento diana de los cebadores C2 y C3 se seleccionaron que eran de 8 °C a 10 °C por debajo de la de la sonda So, como normalmente sería en un ensayo TaqMan convencional.
- La  $T_f$  de la secuencia de reconocimiento diana del cebador C1 se seleccionó que era de 8 °C a 10 °C por debajo de la de los cebadores C2 y C3 lo que permite controlar la duración de cada fase alterando la temperatura de la fase de emparejamiento/extensión. Este requisito de baja  $T_f$  también permite secuencias de reconocimiento diana muy cortas del cebador C1, reduciendo por tanto la longitud total necesaria mínima del molde.

40 Un ejemplo específico de este método es un ensayo desarrollado con la finalidad de detectar secuencias de *M. tuberculosis* en muestras de ADN en orina. La diana es una región de 39 pb dentro de la repetición IS6110 de la bacteria.

Dirección	ID	Molde	SEC ID
Cebador directo 1ª fase (C1)	ES0564	<b>5'-GAACACGACCTACGACGAGTCAGCA TCTAGCTTCGGACCACCA-3'</b>	23
Cebador inverso (C2)	ES0563	5'-CTGCTACCCACAGCCGGTTAG-3'	24
Cebador directo 2ª fase (C3)	ES0565	5'-CACGACCTACGACGAGTCAGC-3'	25
Sonda (So) TaqMan MGB	ES0566-M	FAM-5'-TTCGGACCACCAGCAC-3'-MGB-NFQ	26
Diana MTB		<b>5'-GCTTCGGACCACCAGCACCTAACCGGCTGTGGG TAGCAG-3'</b>	27

45 La Figura 9, panel A, demuestra que esta técnica detecta eficazmente 5 equivalentes genómicos de *M. tuberculosis* por reacción. La Figura 9, panel B ilustra la aplicación de este ensayo para la detección de ADN-Tr de *M. tuberculosis* en muestras de orina de pacientes con tuberculosis pulmonar y controles no infectados. Específicamente, el panel A muestra la amplificación de patrones IS6110 y el panel B muestra la detección de IS6110 en ADN de muestras de orina de 8 pacientes con tuberculosis (TB1 a TB8) y de dos individuos sanos (H1 y H2).

Ejemplo 4

El Ejemplo 4 muestra un diseño alternativo del esquema PCR de un solo tubo para la detección de dianas de ADN ultracorto.

5 Al realizar los experimentos descritos anteriormente, se determinó que para conseguir una mejor linealidad del ensayo es importante impedir que el cebador C1 compita por el molde con la sonda So en la fase 2 de la reacción. Para esta finalidad, el cebador C1 se modificó de tal manera que existe preferentemente en una configuración plegada, de tallo-bucle a la temperatura (temperaturas) de etapa de emparejamiento/extensión de la fase 2. Como se muestra en la Figura 10, para impedir que la región bucle-tallo se copie en el producto de la PCR, se introdujo una base de replicación bloqueante iso-dC en la parte bucle del cebador C1. En la Figura 10, M indica molde; C1, C2 y C3 indican cebadores; PI1 y PI2 indican productos intermedios; So indica sonda TaqMan™, doblemente marcada con fluoróforo F e inactivador I. ⊗ indica iso-dC.

15 Se ha demostrado que el ensayo de PCR en tiempo real de 2 fases puede detectar un número de dianas diverso. Para cada diana, se diseñó a medida un conjunto de secuencias de cebador y sonda, y las condiciones físicas del ensayo se optimizaron. Los factores optimizados incluyeron concentración de Mg<sup>2+</sup>, concentraciones de cebadores y sonda, las temperaturas de la etapa de emparejamiento/extensión para cada fase, y la longitud (es decir, el número de ciclos de amplificación) de la fase 1. Las respuestas del sistema que se optimizaron incluyeron ensayar la sensibilidad, especificidad y linealidad. Se descubrió que el ensayo de la PCR de 2 fases puede usarse para detectar de modo fiable dianas ultracortas a concentraciones tan bajas como de 1 a 5 copias por reacción.

25 Uno de dichos sistemas de PCR en tiempo real de 2 fases se diseñó para detectar la diana SRY de 25 pb. En la Figura 11 se muestran las curvas de amplificación de la concentración patrón de moldes de control positivo. La Figura 12 ilustra la detección de secuencias SRY fetales en ADN aislado de orina de gestante con feto de sexo masculino pero no con feto de sexo femenino. En la Figura 12, M y F indican muestras de gestantes con fetos de sexo masculino y femenino, respectivamente.

Ejemplo 5

30 El Ejemplo 5 muestra la detección de secuencias fetales de tamaño diferente en ADN aislado de orina materna mediante dos métodos.

35 El ADN de la orina de gestantes con fetos de sexo masculino se aisló mediante el método basado en sílice de Botezatu et al., Clin Chem. 46: 1078-1084, 2000 y mediante la técnica basada en intercambio aniónico descrita en la Publicación de Solicitud de Patente de Estados Unidos N° 20080139801. Después, el ADN aislado se analizó para determinar la presencia de secuencias TSPY, específicas del cromosoma Y, por PCR en tiempo real usando cebadores diseñados para la detección de dianas ultracortas de 43 pares de bases y de 84 pares de bases. El método basado en sílice aísla fragmentos de ADN de 100-150 pares de bases y más grandes. La técnica basada en intercambio aniónico aísla fragmentos de ADN más grandes que 10 pares de bases. Independiente del método de purificación de ADN, las secuencias específicas del género masculino se detectaron satisfactoriamente en ADN urinario usando el ensayo de amplicón de 43 pares de bases, pero no el ensayo de 84 pares de bases. Además, la Figura 13 demuestra que la cantidad detectada de secuencias TSPY en la preparación con Q-Sepharose era dos veces mayor que la de la preparación con sílice.

45 Los siguientes experimentos se diseñaron para caracterizar ADN-Tr fetal con más detalle. Usando cuatro conjuntos de cebadores y sondas, que amplificaron secuencias del gen de SYR de 25 pares de bases, 39 pares de bases, 65 pares de bases y 88 pares de bases, se realizó PCR en tiempo real con ADN aislado de las mismas muestras de orina de gestantes con fetos de sexo masculino mediante dos técnicas, la basada en sílice o la absorción en resina Q. Los datos presentados en la siguiente tabla demuestran claramente que ambos factores son muy importantes, un método de aislamiento de ADN y el tamaño del amplicón. En primer lugar, la sensibilidad es mayor con un tamaño de amplicón más corto. Incluso el aumento de tamaño de una secuencia diana de 25 pares de bases a 39 pares de bases disminuyó la sensibilidad del ensayo, y el ADN fetal no pudo detectarse en todas las muestras con un amplicón de 88 pares de bases. En segundo lugar, el aislamiento de fragmentos de ADN más cortos que 150 pares de bases con la técnica basada en resina-Q aumentó significativamente la sensibilidad cuando se amplificaron secuencias de 25 pares de bases y de 39 pares de bases. Ambos métodos de aislamiento de ADN dieron resultados similares con el amplicón de 65 pares de bases.

60 La cantidad de embarazos detectados satisfactoriamente con fetos de sexo masculino depende del tamaño del amplicón. El ADN se aisló mediante dos métodos de muestras de orina de diez gestantes con fetos de sexo masculino.

Método de aislamiento de ADN	Tamaño de la diana SRY			
	25 pares de bases	39 pares de bases	65 pares de bases	88 pares de bases
Resina Q	10	8	3	0
Sílice	7	4	3	0

Los datos obtenidos proporcionan información sobre las propiedades de ADN-Tr, en particular características de ADN-Tr fetal en la orina materna. En primer lugar, una mayor sensibilidad de detección de la secuencia fetal en ADN purificado con resina Q cuando se comparó con ADN aislado por el método de sílice demuestra que fragmentos de ADN de 50 - <150 pares de bases contienen ADN-Tr fetal. Esta diferencia en sensibilidad se observa con amplicones solo de 25 pares de bases y 39 pares de bases, lo que significa que fragmentos más grandes de ADN-Tr fetal detectable con amplicones de 65 pares de bases pertenece a fracciones de ADN aislado por ambos métodos, más probablemente a fragmentos de ADN con 150-200 pares de bases.

En segundo lugar, la sensibilidad de detección de secuencias fetales en ADN aislado con el método de sílice depende del tamaño del amplicón en un intervalo de tamaño de 25-88 pares de bases, aunque los fragmentos de ADN más cortos aislados por esta técnica tienen una longitud de aproximadamente 150 pares de bases. La explicación más plausible de estos resultados es la presencia de roturas monocatenarias en fragmentos de 150-200 pares de bases de ADN-Tr, que constituye dianas amplificables significativamente más cortas.

Basándose en los resultados anteriores, la detección de dianas de ADN ultracorto es esencial para la detección satisfactoria de secuencias de ADN-Tr.

#### Ejemplo 6

El ejemplo 6 muestra la detección de secuencias de ADN transrenal bacteriano de diferente tamaño en ADN aislado de orina de pacientes con tuberculosis mediante dos métodos.

Dado que el ADN bacteriano está cubierto por diferentes proteínas distintas en comparación con el ADN eucariota y que no está empaquetado en nucleosomas, los datos obtenidos con ADN-Tr humano no son necesariamente correctos para ADN procariota. Recientemente, se detectó ADN de *Mycobacterium tuberculosis* (MTB) mediante PCR anidada en la orina de pacientes con tuberculosis pulmonar (Cannas, A. et al., Int. J. Tuberc. Lung Dis. 12: 146-151, 2008). En el primer conjunto de experimentos con ADN de MTB, se aisló ADN urinario mediante por los dos métodos descritos anteriormente y se analizaron por PCR en tiempo real usando cebadores diseñados para amplicones de diversos tamaños. La siguiente tabla demuestra que los fragmentos de ADN-Tr bacteriano pueden detectarse en la orina de pacientes infectados por amplificación de dianas cortas y ultracortas, pero en el último caso se detectó un número de copias génicas específicas de MTB significativamente más alto. Incluso se detectaron más copias de secuencias de ADN de MTB con cebadores diseñados para dianas ultracortas en preparaciones de ADN aisladas por métodos basados en intercambio aniónico.

Dependencia del tamaño del amplicón de la detección de ADN-Tr de MTB (copias/ml) en ácidos nucleicos aislados por dos métodos de la orina de un paciente con tuberculosis pulmonar activa.

Tamaño de la Diana	Sílice	Q-Sepharose
39 pares de bases	24	50
49 pares de bases	5	4
99 pares de bases	0	0

#### Ejemplo 7

El Ejemplo 7 muestra la detección de ADN transrenal procariota y eucariota en ADN urinario fraccionado.

Los ácidos nucleicos aislados de orina se separaron adicionalmente en fracciones de alto/medio y bajo peso molecular. Se añadió etanol a los ácidos nucleicos eluidos de la Q-Sepharose al 30 % v/v, y la mezcla se hizo pasar a través de una columna de sílice. Se recogió una fracción a través de flujo, y después de la adición de etanol hasta el 70 % la mezcla se cargó sobre otra columna de sílice. Ácidos nucleicos de alto/medio y bajo peso molecular, respectivamente, se eluyeron de la primera y segunda columnas. La Figura 14 ilustra la separación de ácidos nucleicos urinarios de diferentes pesos moleculares. En la figura 14, el carril 1 muestra ácidos nucleicos totales; el carril 2 muestra la fracción de alto/medio peso molecular y el carril 3 muestra fracciones de peso molecular bajo.

En el primer conjunto de experimentos, se comparó la cantidad de secuencias TSPY y SRY específicas del cromosoma Y en las fracciones de alto/medio y bajo peso molecular. Los datos presentados en la siguiente tabla demuestran que las últimas contenían la cantidad significativa de secuencias específicas de feto.

- 5 Concentraciones de ADN-Tr fetal en fracciones de ácido nucleico de orina de una gestante con un feto de sexo masculino.

ADN	TSPY	SRY
	GE/ml de orina	GE/ml de orina
ADN total	44	67
PM alto/medio	3	19
PM bajo	33	61

- 10 Se realizaron experimentos similares para el análisis de la distribución de ADN-Tr bacteriano en ADN urinario fraccionado. En la Figura 15 se presentan los resultados del análisis de ADN de MTB en ADN fraccionado de la orina de un paciente con tuberculosis pulmonar. En la Figura 15, el carril 1 muestra ADN total; el carril 2 muestra ADN de peso molecular alto/medio; el carril 3 muestra ADN de peso molecular bajo; el carril 5 muestra sin molde (reacción control); y el carril 5 muestra control positivo con ADN genómico de MTB (cepa Erdman).
- 15 Una vez más, se detectaron secuencias específicas de MTB en la fracción de peso molecular tanto alto/medio como bajo, conteniendo la última más copias de ADN-r bacteriano.

## REIVINDICACIONES

1. Un método de detección de ácidos nucleicos que no son de hospedador que se originan en zonas distintas a las del tracto urinario en un paciente, que comprende:
- 5 (a) obtener una muestra de orina de dicho paciente;  
 (b) aislar sustancialmente dichas secuencias de ácido nucleico en dicha muestra, sin excluir ácidos nucleicos de 10 a 150 pares de bases; y  
 10 (c) ensayar la presencia de una o más secuencias específicas de ácidos nucleicos que no son de hospedador que han atravesado la barrera renal detectando una o más secuencias específicas de 20-50 nucleótidos de longitud, con un método seleccionado del grupo que consiste en reacción en cadena de la polimerasa, reacción en cadena de la polimerasa anidada, reacción en cadena de la ligasa y amplificación por desplazamiento de cadena, usando cebadores específicos con fluoróforos internamente marcados para detección por FRET.
- 15 2. El método de la reivindicación 1, donde dichos ácidos nucleicos son ADN.
3. El método de la reivindicación 1, donde dichos ácidos nucleicos son ARN.
4. El método de la reivindicación 1, donde dichos ácidos nucleicos que no son de hospedador son ácidos nucleicos patógenos.
- 20 5. El método de la reivindicación 1, donde dichos ácidos nucleicos que no son de hospedador son ácidos nucleicos fetales y el método es para detectar una enfermedad genética o un trastorno en un feto, donde la muestra de orina se obtiene de una gestante y los ácidos nucleicos han atravesado las barreras placentaria y renal.
- 25 6. El método de la reivindicación 1, donde dichos ácidos nucleicos que no son de hospedador son ácidos nucleicos de células, tejidos u órganos trasplantados y el método es para controlar células, tejidos u órganos trasplantados en zonas distintas a las del tracto urinario.
- 30 7. El método de la reivindicación 1, que comprende adicionalmente reducir la degradación de ácido nucleico en dicha muestra de orina.
8. El método de la reivindicación 7, donde la reducción de la degradación de ácido nucleico comprende inhibir la actividad nucleasa aumentando el pH, aumentando la concentración salina, termoinactivando, o tratando dicha muestra de orina con un compuesto seleccionado del grupo que consiste en:
- 35 ácido etilendiaminotetraacético, clorhidrato de guanidina, isotiocianato de guanidina, N-lauroilsarcosina y dodecilsulfato sódico.
- 40 9. El método de la reivindicación 1, donde dicha muestra de orina ha permanecido en la vejiga urinaria menos de 12 horas.
10. El método de la reivindicación 1, donde la etapa (b) comprende aislar sustancialmente dichos ácidos nucleicos en dicha muestra de orina por precipitación o usando un material adsorbente sólido.
- 45 11. El método de la reivindicación 4, donde el patógeno se selecciona del grupo que consiste en un virus, una bacteria, un hongo, un micoplasma y un protozoo.
12. Un método de detección del cáncer en un paciente que comprende:
- 50 (a) obtener una muestra de orina de dicho paciente;  
 (b) aislar sustancialmente secuencias de ácidos nucleicos en dicha muestra, sin excluir ácidos nucleicos de 10 a 150 pares de bases; y  
 55 (c) ensayar la presencia de uno o más ácidos nucleicos específicos de 20-50 nucleótidos de longitud, que son indicativo de cáncer, y que han atravesado la barrera renal detectando una o más secuencias específicas de 20-50 nucleótidos de longitud, con un método seleccionado del grupo que consiste en reacción en cadena de la polimerasa, reacción en cadena de la polimerasa anidada, reacción en cadena de la ligasa y amplificación por desplazamiento de cadena, usando cebadores específicos con fluoróforos internamente marcados para detección por FRET.
- 60 13. El método de la reivindicación 12, donde dichos ácidos nucleicos son ADN.
14. El método de la reivindicación 12, donde dichos ácidos nucleicos son ARN.
- 65 15. El método de la reivindicación 12, que comprende adicionalmente reducir la degradación de ácidos nucleicos en dicha muestra de orina.

16. El método de la reivindicación 15, donde la reducción de la degradación de ácido nucleico comprende inhibir la actividad nucleasa aumentando el pH, aumentando la concentración salina, termoinactivando, o tratando dicha muestra de orina con un compuesto seleccionado del grupo que consiste en:

5        ácido etilendiaminotetraacético, clorhidrato de guanidina, isotiocianato de guanidina, N-lauroilsarcosina y dodecilsulfato sódico.

17. El método de la reivindicación 12, donde dicha muestra de orina ha permanecido en la vejiga urinaria menos de 12 horas.

10        18. El método de la reivindicación 12, donde la etapa (b) comprende aislar sustancialmente dichos ácidos nucleicos, indicativo de cáncer, en dicha muestra de orina por precipitación o usando un material adsorbente sólido.

15        19. El método de la reivindicación 1 o 12, donde dicho ensayo es mediante reacción en cadena de la polimerasa para amplificar los ácidos nucleicos específicos de 20-50 nucleótidos de longitud.

20. El método de la reivindicación 1 o 12, donde la etapa (a) comprende filtrar dicha muestra para eliminar las sustancias contaminantes.

**Figura 1**

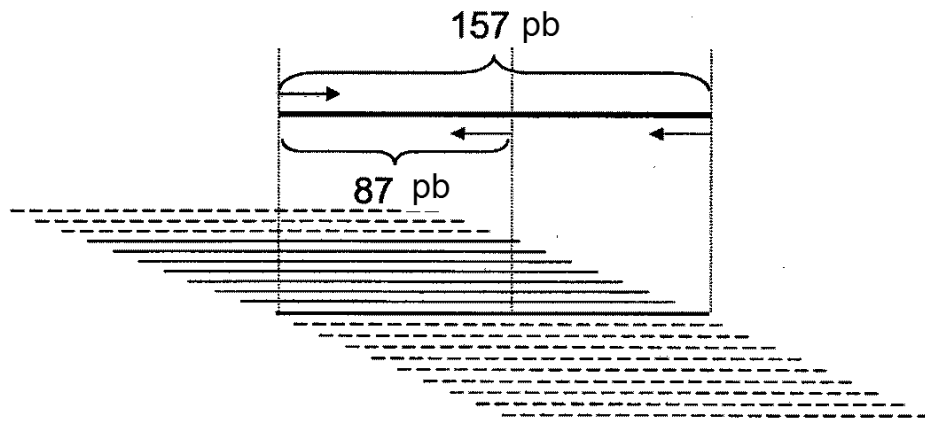


Figura 2

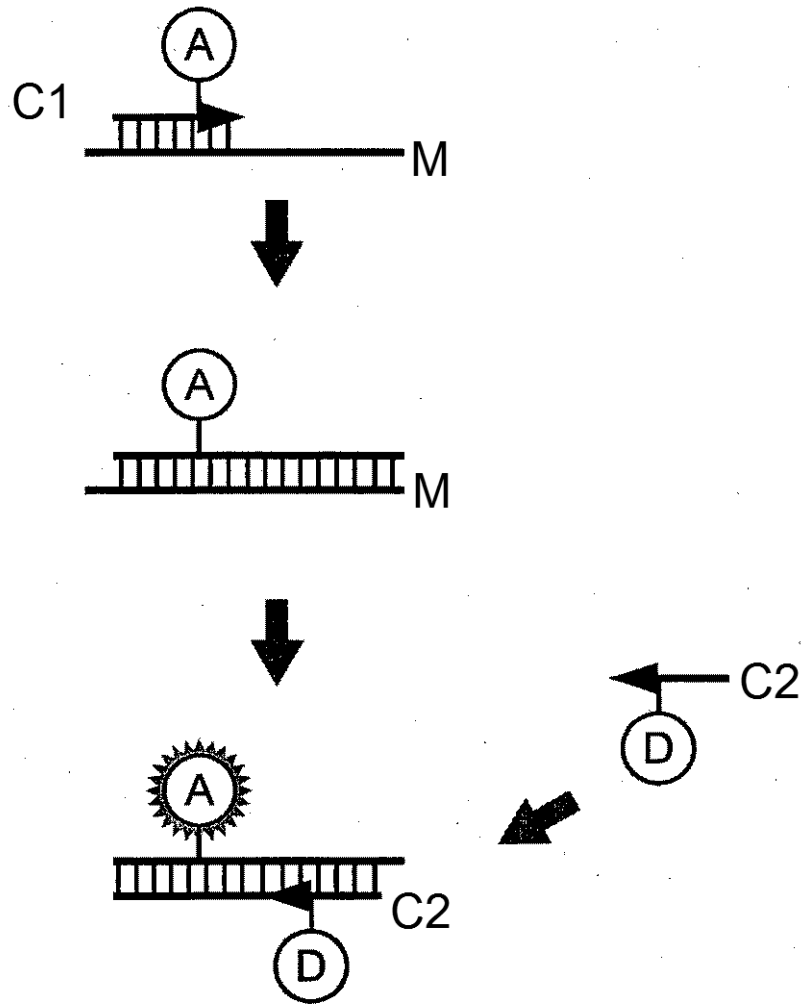




Figura 3

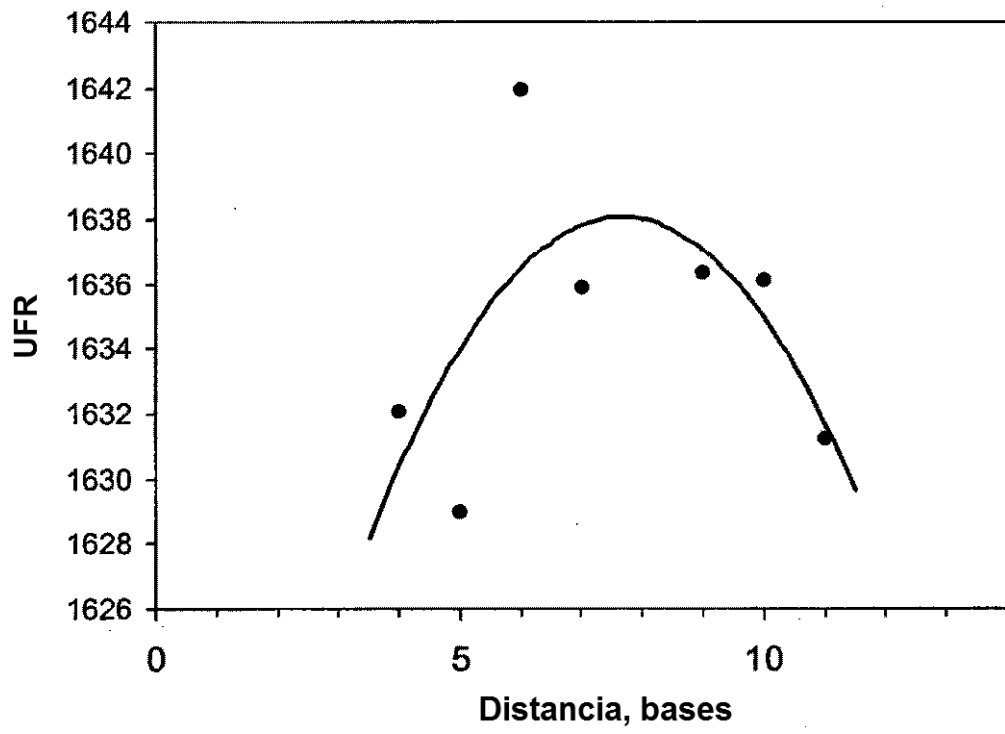


Figura 4

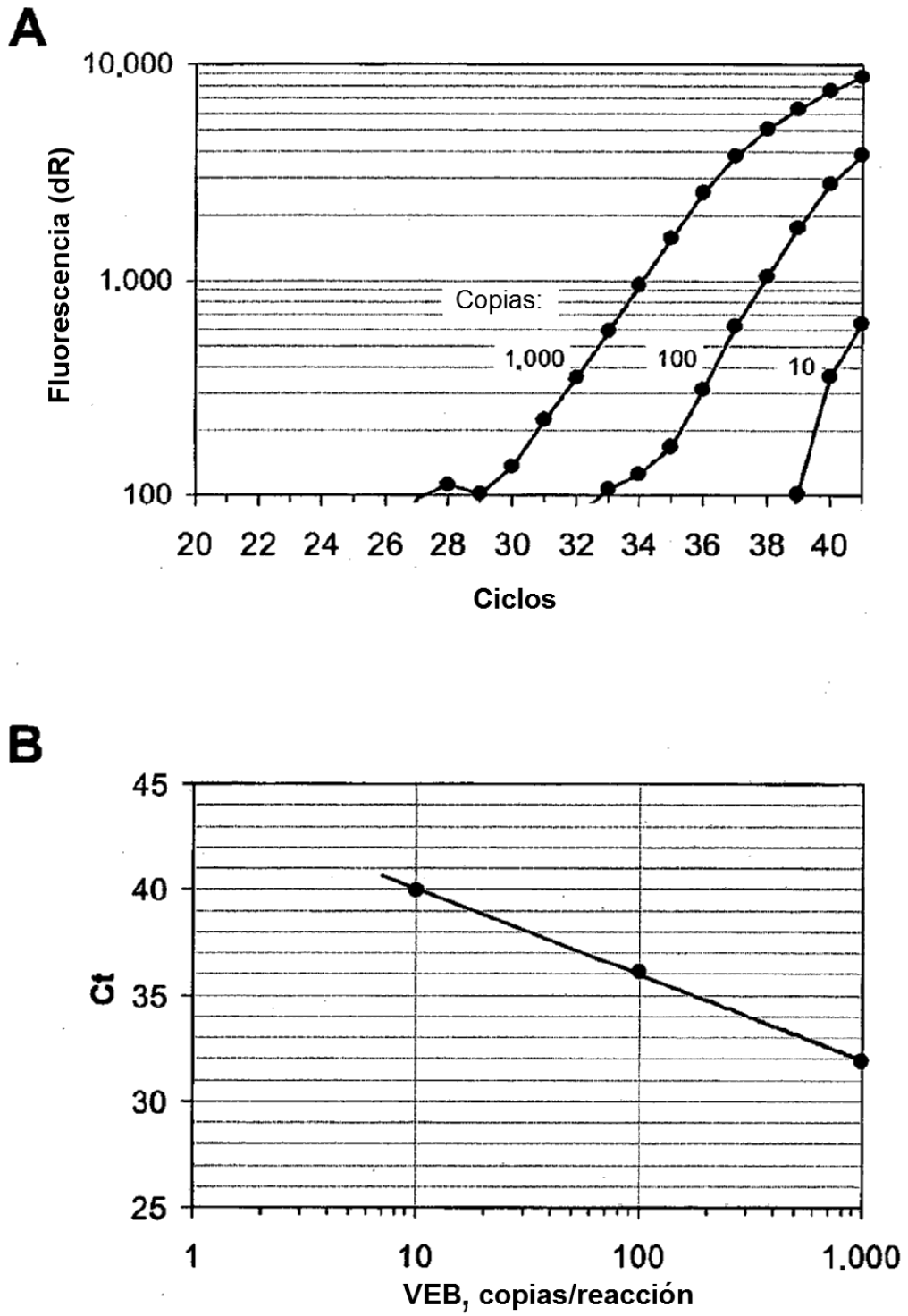


Figura 5

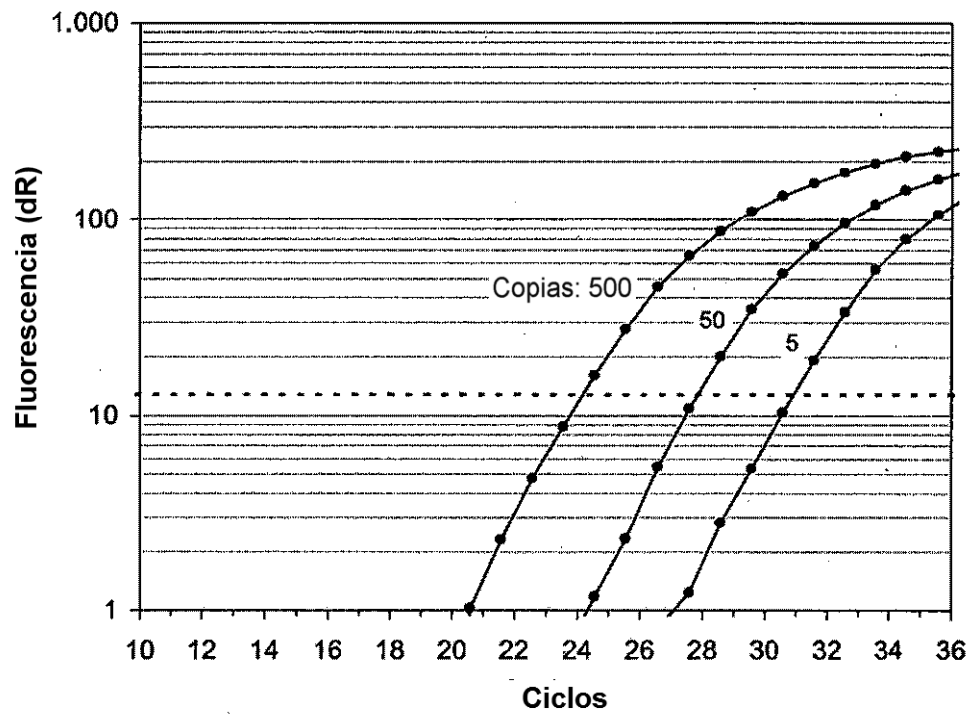


Figura 6

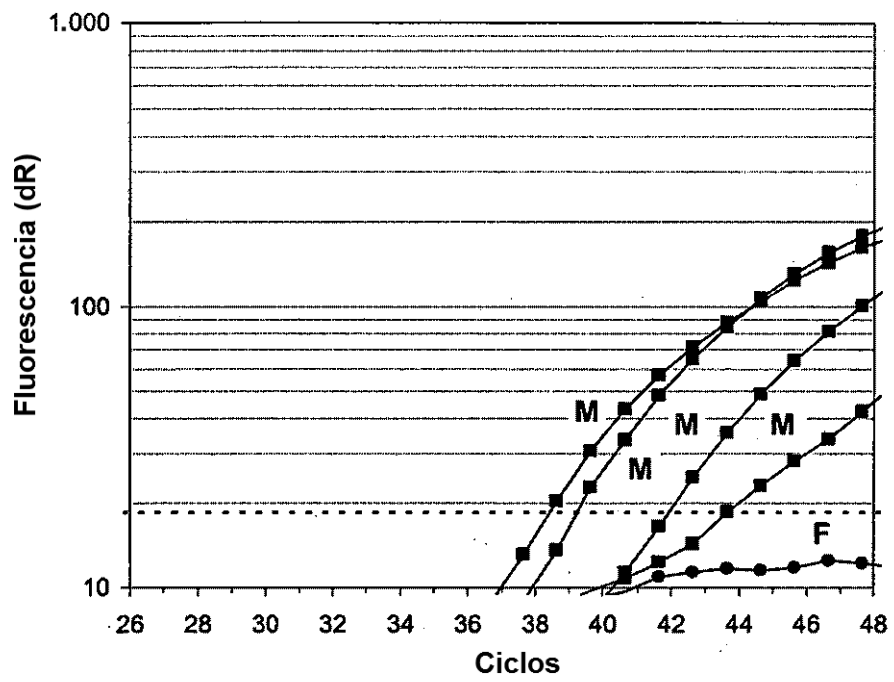


Figura 7

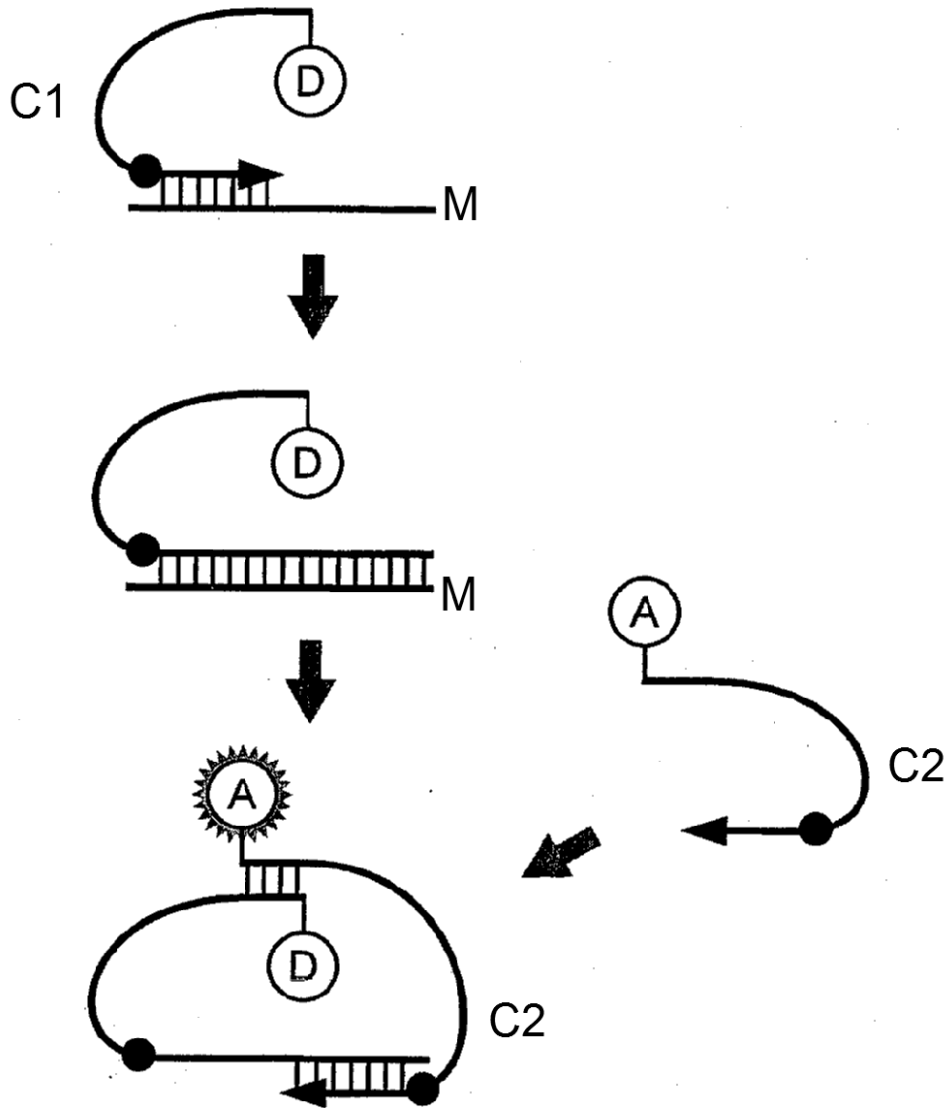


Figura 8

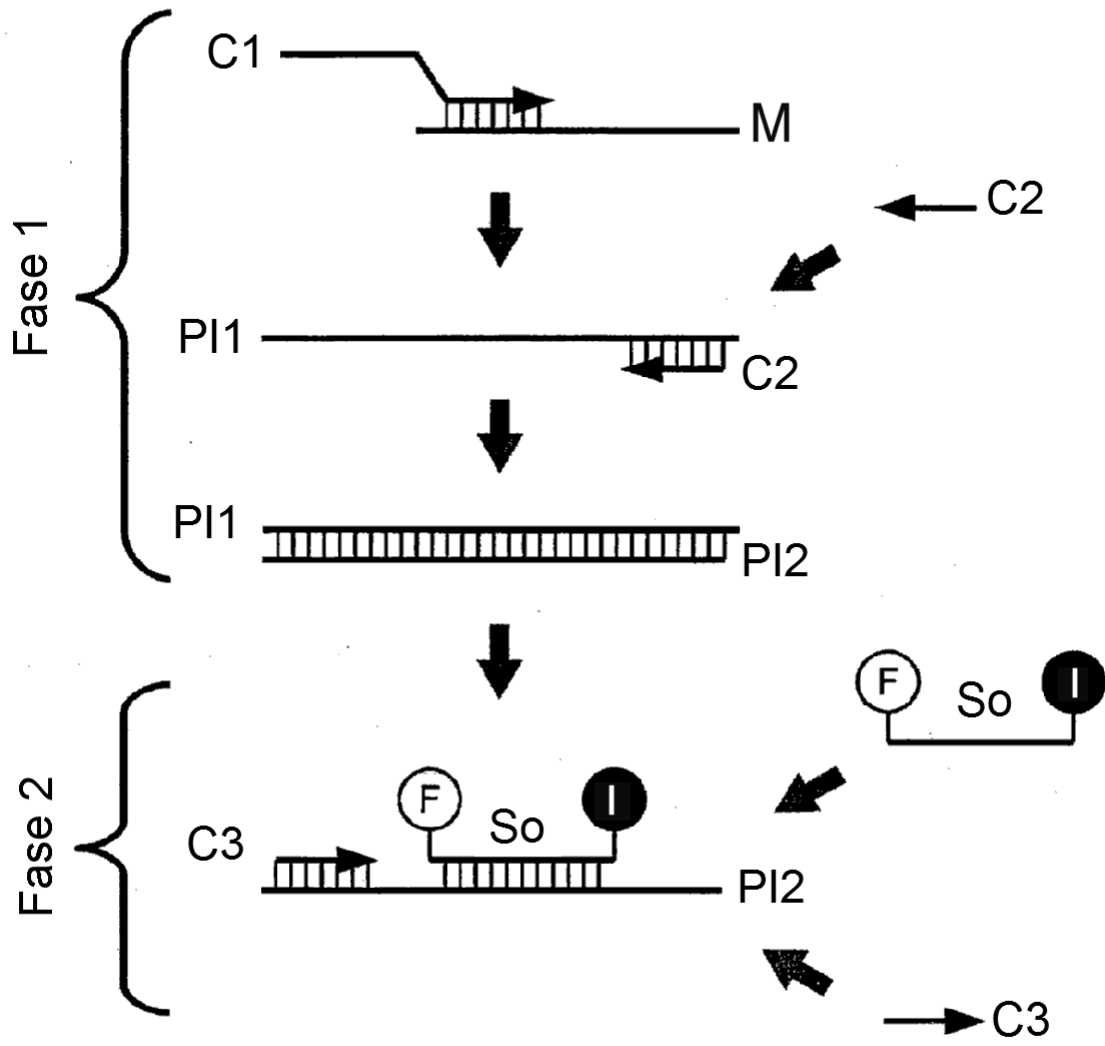


Figura 9

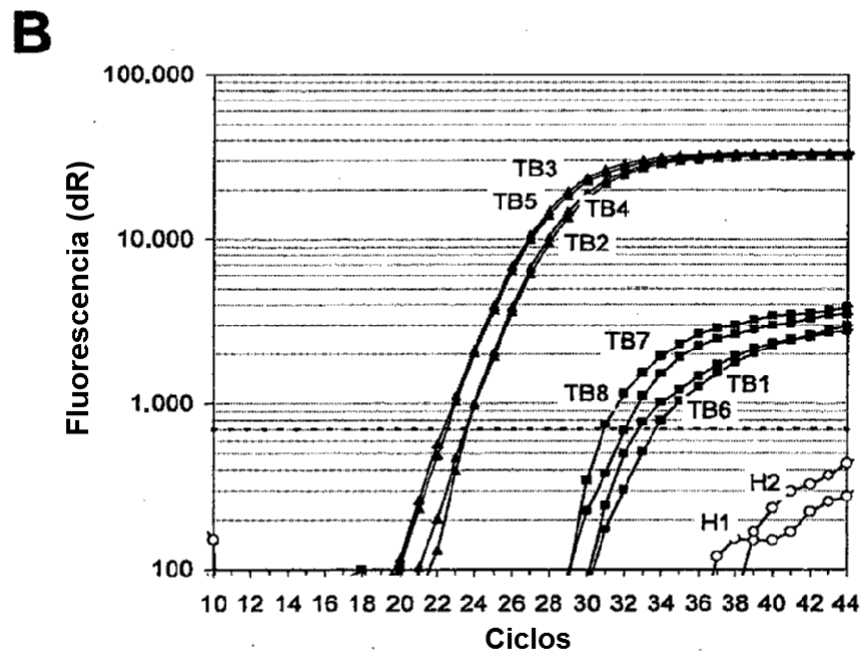
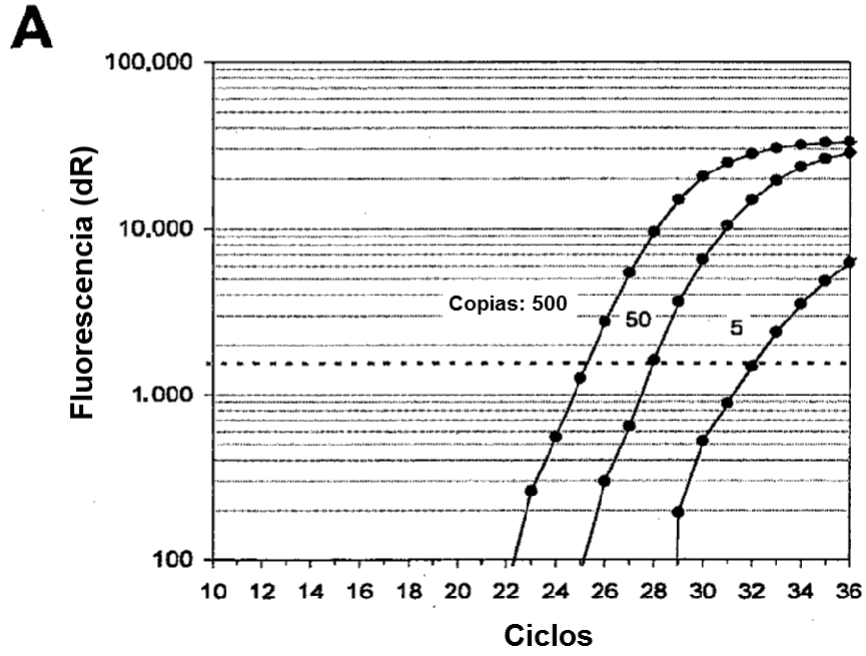


Figura 10

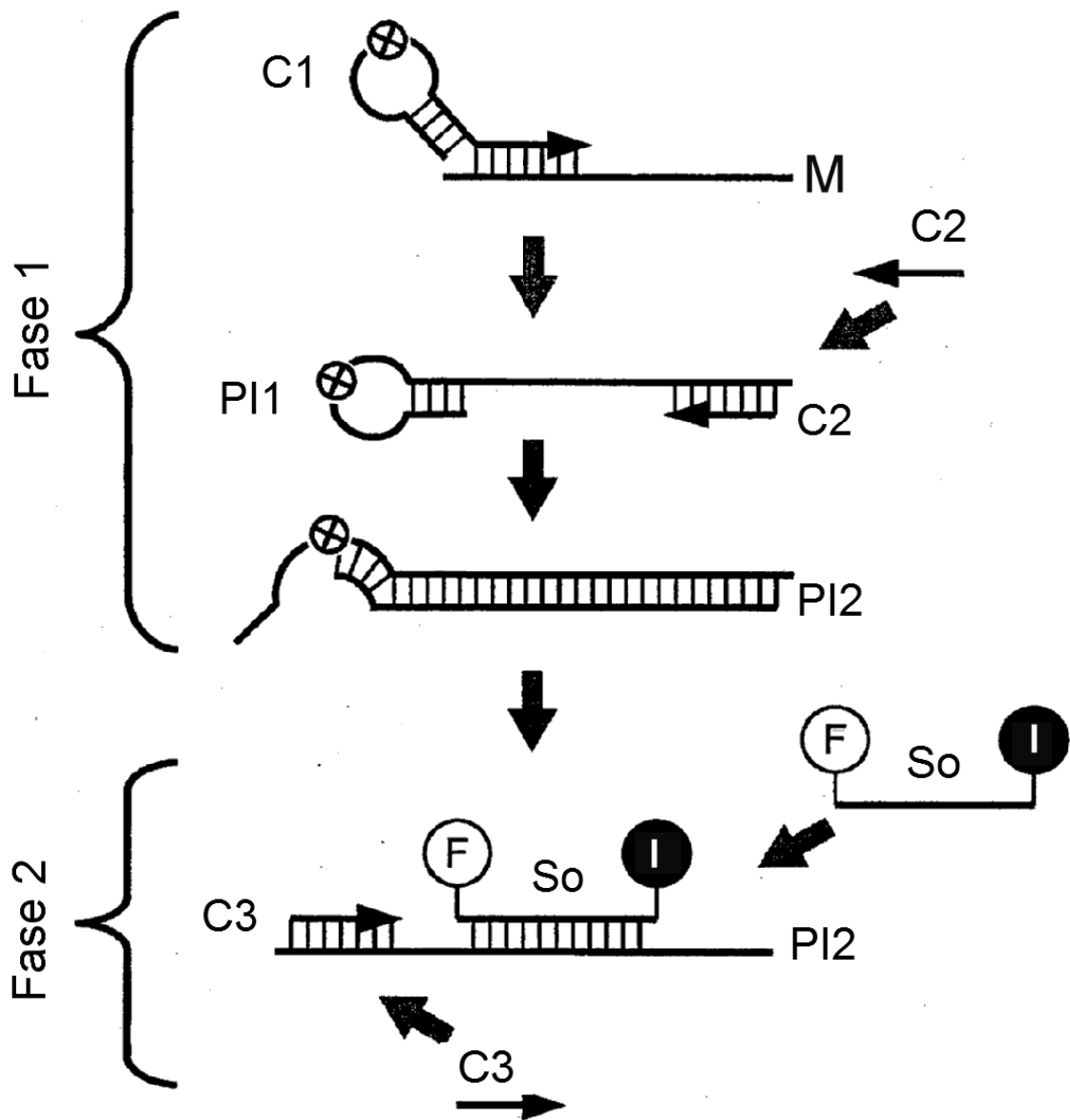




Figura 11

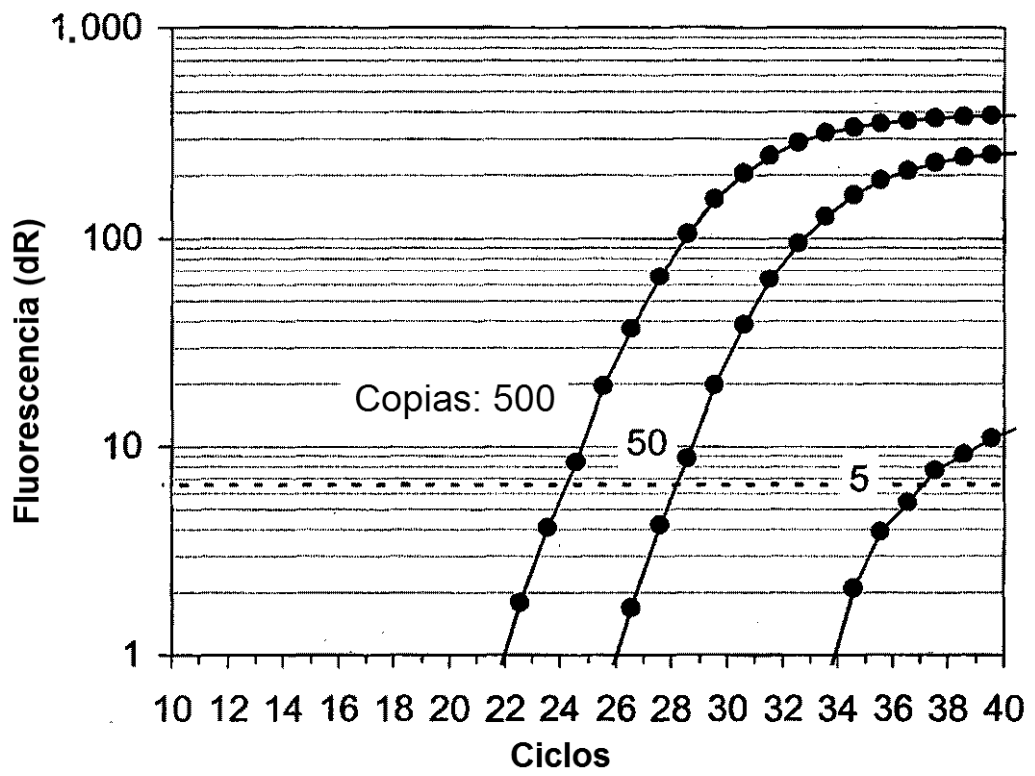


Figura 12

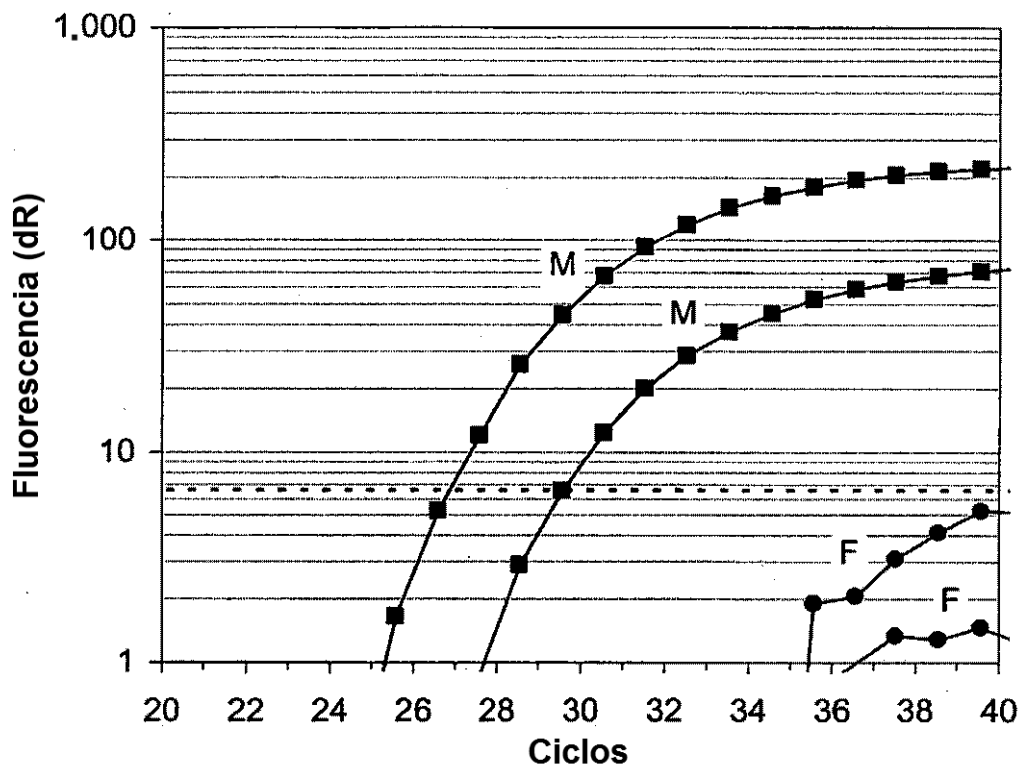
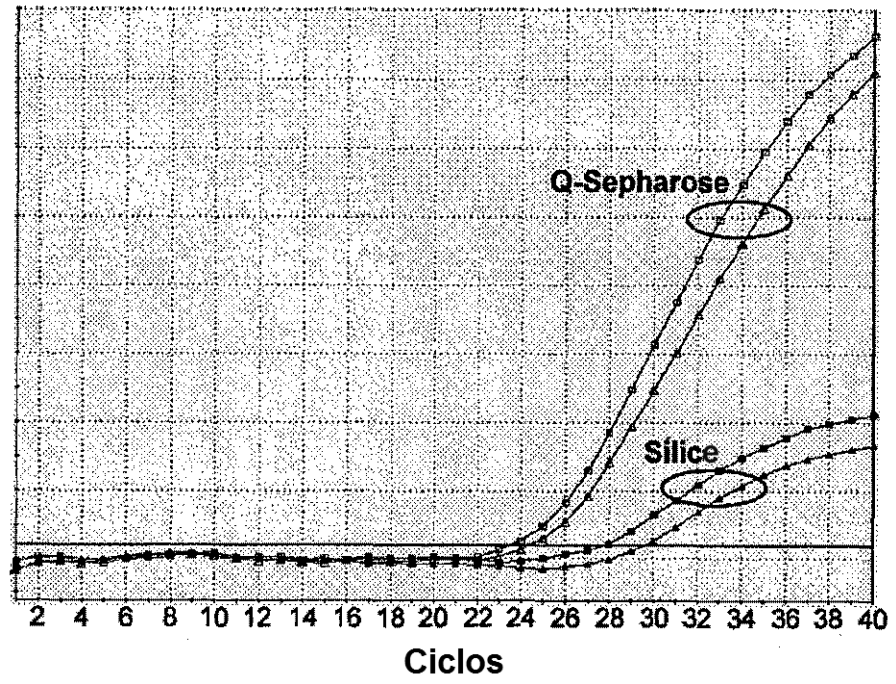


Figura 13



**Figura 14**

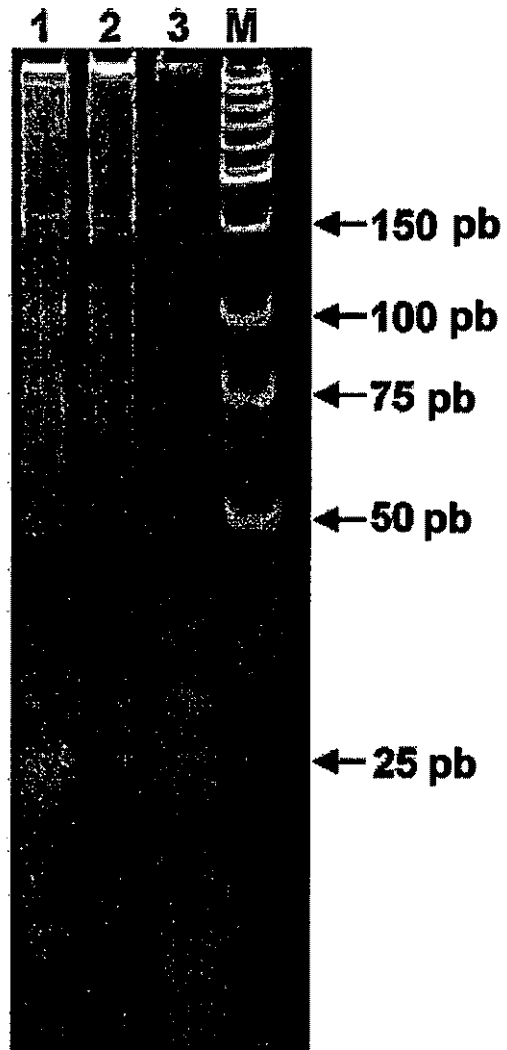


Figura 15

