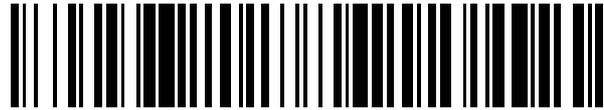


19



OFICINA ESPAÑOLA DE
PATENTES Y MARCAS

ESPAÑA



11 Número de publicación: **2 541 356**

51 Int. Cl.:

C12Q 1/68 (2006.01)

12

TRADUCCIÓN DE PATENTE EUROPEA

T3

96 Fecha de presentación y número de la solicitud europea: **02.02.2010 E 10706492 (5)**

97 Fecha y número de publicación de la concesión europea: **08.04.2015 EP 2391736**

54 Título: **Procedimiento de cuantificación de especies pequeñas de ARN**

30 Prioridad:

02.02.2009 DK 200900156
17.09.2009 DK 200901038

45 Fecha de publicación y mención en BOPI de la traducción de la patente:
17.07.2015

73 Titular/es:

EXIQON A/S (100.0%)
Skelstedet 16
2950 Vedbaek, DK

72 Inventor/es:

BUSK, PETER KAMP

74 Agente/Representante:

CARPINTERO LÓPEZ, Mario

Observaciones :

Véase nota informativa (Remarks) en el folleto original publicado por la Oficina Europea de Patentes

ES 2 541 356 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

Procedimiento de cuantificación de especies pequeñas de ARN

Campo de la invención

5 La presente invención se refiere a un procedimiento de amplificación y cuantificación de moléculas pequeñas de ARN no codificante usando tecnología de reacción en cadena de la polimerasa con transcripción inversa cuantitativa (qRT-PCR).

Antecedentes de la invención

10 Los microARN son una clase abundante de ARN no codificantes de aproximadamente 22 nucleótidos, que desempeñan importantes tareas reguladoras en el desarrollo de animales, plantas y virus. El conocimiento de los microARN se inició hace casi 15 años por el descubrimiento de *lin-4*, que codifica un pequeño ARN implicado en la cronología y progresión del nematodo en el ciclo vital y el desarrollo larvario de *C. elegans* (Lee y col. 1993 Cell 75:843-854, Wightman y col. 1993 Cell 75:855-862), pero sólo recientemente se ha reconocido que los microARN forman una clase principal de ribo-reguladores que tienen amplias funciones reguladoras en animales (Lagos-Quintana y col. 2001 Science 294:853-858, Lau y col. 2001 Science 294:858-862, Lee y Ambros. 2001 Science 294:862-864). Desde entonces, ha tenido lugar una revolución en el estudio de los microARN, y hoy en día la base de datos miRBase versión 12.0 (<http://microma.sanger.ac.uk/>) incluye 866 microARN humanos y la base de datos PubMed (<http://www.ncbi.nlm.nih.gov/pubmed/>) abarca 3900 artículos relacionados con microARN, lo que refleja el interés e importancia de los microARN.

20 Los microARN están implicados en la regulación de la expresión génica a nivel post-transcripcional mediante la degradación o bloqueo de la traducción de dianas de ARN mensajero, y se ha especulado que aproximadamente el 30% del genoma humano podría estar regulado por microARN. La importancia de los microARN también es obvio debido a su implicación en diversos procesos celulares incluyendo el desarrollo, crecimiento y proliferación, apoptosis, diferenciación, y diversas enfermedades humanas (<http://www.mir2disease.org/>) tales como cáncer y diabetes.

25 La importancia de los microARN en cáncer se pone de relieve en un reciente artículo (Barbarotto y col. 2008 Int. J. Cancer. 122:969-977), que resumen los paradigmas principales para la implicación de los miARN en cánceres humanos: Por tanto, "(i) los miARN están alterados en cualquier tipo de cáncer humano analizado; (ii) los miARN actúan como oncogenes y supresores tumorales; (iii) alteraciones en los miARN pueden causar predisposición a cáncer; (iv) el perfilado de miARN es una nueva herramienta de diagnóstico para pacientes con cáncer y (v) el perfilado de miARN representa herramientas de pronóstico para pacientes con cáncer." Por consiguiente, procedimientos para el perfilado de expresión y cuantificación de microARN en células y fluidos corporales de pacientes con cáncer son de gran importancia. Para abordar esta necesidad, la presente invención describe el desarrollo de un nuevo ensayo robusto y fiable de qRT-PCR para mediciones de microARN.

35 La cuantificación de microARN por procedimientos de qRT-PCR es muy complicada debido al pequeño tamaño de los microARN de solamente 21 a 25 nucleótidos, que es el tamaño de los cebadores normalmente usados para PCR. Se han publicado soluciones a este problema en Raymond y col. RNA. 2005 Nov; 11(11):1737-44, Gilad y col. PLoS ONE. 2008 Sep 5; 3(9):e3148 y Sharbati-Tehrani y col. BMC Molecular Biology. 2008, 9:34. Raymond y col. describen un ensayo de qRT-PCR que implica una etapa de transcripción inversa específica de gen seguida de una etapa de qPCR con verde SYBR® usando un cebador directo específico de gen que contiene moléculas de ácido nucleico bloqueado (LNA) y un cebador inverso universal. Gilad y col. informan de un ensayo de qRT-PCR que implica una etapa de poliadenilación, una etapa de transcripción inversa no específica, y una etapa de qPCR que implica un cebador directo específico de gen, un cebador TaqMan específico de gen y un cebador inverso universal. Sharbati-Tehrani y col. desarrollaron un ensayo de qRT-PCR que implica una etapa de transcripción inversa específica de gen seguida de una etapa de qPCR con verde SYBR® usando un cebador directo específico de gen y 45 2 cebadores universales.

El documento WO 2005/098029 A2 desvela procedimientos para la detección y cuantificación de microARN.

Sin embargo, las técnicas existentes para la cuantificación de microARN por qRT-PCR no cumplen la presente necesidad de ensayos para microARN, que requieren alta especificidad que permita discriminación entre microARN muy relacionados, alta sensibilidad, bajo fondo en un procedimiento relativamente simple.

50 La presente invención se caracteriza por solamente una reacción de transcripción inversa para todos los microARN en una muestra y además proporciona un procedimiento de PCR extremadamente sensible con una especificidad desigual que puede usarse para la cuantificación precisa de moléculas pequeñas de ARN tales como microARN.

Sumario de la invención

55 El establecimiento y comprensión de los patrones de desregulación de los microARN asociados con diversas enfermedades humanas tales como cánceres, exigen nuevas tecnologías mejoradas para la detección y

cuantificación de microARN en células humanas y fluidos corporales. La presente invención introduce un nuevo ensayo altamente sensible y específico para este propósito.

5 En un aspecto, la presente invención proporciona un procedimiento para amplificar y cuantificar moléculas de microARN en una muestra: En la primera etapa del procedimiento, se producen ADN complementarios (ADNc) de los microARN en una muestra por la acción concertada de dos enzimas en una reacción de un solo tubo. En primer lugar, se añaden colas de poli-A al extremo 3'-terminal de los microARN usando una poli(A) polimerasa, y en segundo lugar se hibrida un cebador de extensión a la cola poli-A y se producen los ADNc mediante una transcriptasa inversa usando el microARN como molde. La primera etapa es inespecífica y produce ADNc de todos los microARN presentes en una muestra. En la segunda etapa del procedimiento se amplifican y cuantifican los ADNc específicos en una reacción de qPCR usando series de cebadores específicos de microARN de cebadores directos e inversos que contienen monómeros de LNA.

10 En otro aspecto, la invención proporciona cebadores oligonucleotídicos enumerados en la Tabla 18 (SEC ID N° 1 a SEC ID N° 128).

15 Los cebadores de la invención pueden usarse para detectar microARN de mamífero usando el procedimiento de la invención.

En otro aspecto, la invención proporciona kits para la detección de microARN de mamífero, comprendiendo los kits un cebador de extensión universal y series de cebadores directos e inversos específicos de microARN para la cuantificación de al menos un microARN, un subconjunto de microARN o todos los microARN conocidos.

20 La presente invención es útil para ensayos cuantitativos fiables y específicos de microARN, incluyendo ensayos para diagnosticar y pronosticar enfermedades tales como cáncer usando ensayos únicos o aplicaciones de alto rendimiento en plataformas robóticas. Las muestras que contienen ARN extraídas de diversos tipos celulares de organismos vivos, tales como mamíferos y plantas e incluyendo células infectadas por virus pueden analizarse usando el procedimiento de la invención.

Figuras

25 La FIGURA 1 muestra las etapas implicadas en qRT-PCR específica de la presente invención. Para ilustrar el principio, la qRT-PCR de un microARN sirve como ejemplo. La etapa 1 es reacción en un tubo de todos los microARN presentes en una muestra. La etapa 2 es una qPCR específica de microARN usando pares de cebadores directos e inversos para un microARN específico. Un óvalo indica inserción de LNA en cebadores directos e inversos. Cuando el procedimiento se realiza en la práctica, a los miARN presentes en una muestra en primer lugar se les añade una cola poli-A usando una poli(A) polimerasa, que añade restos de adenina al extremo 3' de las moléculas de ARN. En segundo lugar, se hibrida un cebador de extensión, que tiene una secuencia de nucleótidos poli-T-núcleo, un motivo VN-degenerado en el extremo 3' y una cola en el extremo 5', al miARN con cola poli-A a través de hibridación con la secuencia VN-poli-T del cebador de extensión (N=C, G, A y T; V= C, G, y A). Este cebador puede mencionarse como cebador RT universal. Posteriormente, el cebador de extensión se extiende en una reacción de transcripción inversa usando el miARN como molde. Todas estas reacciones se realizan en una reacción de un tubo. El producto de extensión primaria resultante está compuesto por el cebador de extensión y el ADN recién sintetizado, que es ADNc complementario a todos los miARN en la muestra. En la siguiente etapa, se realiza PCR específica de miARN. Se hibrida un cebador directo específico de miARN al extremo 3' del ADNc recién sintetizado y la síntesis de la hebra superior se realiza extendiendo el cebador directo en una reacción de polimerización de ADN usando el producto de extensión primaria como molde. Después se hibrida un cebador inverso específico de miARN compuesto por una secuencia del extremo 3' específica de miARN, un tramo poli-T y una cola en el extremo 5' con la hebra superior y la hebra inferior se sintetiza por extensión del cebador inverso. Se describen diversas demostraciones del procedimiento de la invención en la sección de EJEMPLOS.

45 La FIGURA 2 muestra la amplificación de hsa-miR-197 (Ejemplo 1) con el cebador directo 5' ttmCaccaccttctcca (SEC ID N° 1) y el cebador inverso 5'-cttttttttttttGctgggt (SEC ID N° 2). **Molde sintético:** se usaron 10⁷ copias de hsa-miR-197 sintético para la adición de cola poliA/RT. Se usó una cantidad correspondiente a 10⁵ copias para PCR. **ARN humano total:** se usaron 100 ng de ARN humano total para la adición de cola poliA/RT (etapa 1). Se usó una cantidad correspondiente a 1 ng para PCR. **Controles negativos:** control de agua y un control de ARN humano total son poliA polimerasa en la reacción de RT. La línea negra indica el resultado obtenido con el molde sintético mientras que la línea gris muestra el resultado obtenido con ARN humano total como molde. Las curvas de fusión del resultado obtenido con el molde sintético y el ARN humano total son casi idénticas.

La FIGURA 3 muestra las curvas de amplificación y la primera derivada de las curvas de fusión del Ejemplo 2.

55 La FIGURA 4 muestra diagramas de amplificación del Ejemplo 4 donde se demuestra la discriminación entre hsa-let-7a y las variantes hsa-let-7f, hsa-let-7c y hsa-let-7e. Las señales de amplificación de los controles negativos son también idénticas.

La FIGURA 5A, 5B y 5C muestran el procedimiento y los procesos que posibilitan la amplificación por PCR y la

discriminación entre miR maduros, pre-miR y pri-miR. Véase el ejemplo 6, 7 y 8. A) Poliadenilación de todos los extremo 3' de ARN. B) Transcripción inversa de ARN poliadenilado en ADNc usando el cebador RT universal (N=C, G, A y T; V= C, G, y A). C) Amplificación por PCR específica de microARN usando cebadores específicos de gen. Obsérvese que el sitio de poliadenilación en combinación con los cebadores inversos específicos de gen asegura la detección específica de cada una de las moléculas individuales de miR maduros, pre-miR y pri-miR. La Fig. 5A ilustra el ensayo usado para ensayar miR maduros. La Fig. 5B ilustra el ensayo usado para ensayar pre-miR y la Fig. 5C ilustra el ensayo usado para ensayar pri-miR.

La FIGURA 6 muestra curvas de amplificación de (A) el ensayo de pre-mir-203 sobre pre-miR-203, miR-203 y controles sin molde (NTC). (B) Curvas de amplificación de (A) el ensayo de miR-203 sobre pre-miR-203, miR-203 y controles sin molde (NTC).

La FIGURA 7 muestra la diferente expresión de un panel de genes seleccionados de miARN en corazón e hígado. Los datos se presentan como la diferencia en el valor (ΔC_p) del punto de cruce (C_p) entre corazón e hígado, véase la tabla 15.

La FIGURA 8 muestra la detección de cada uno de cuatro miR enumerados ensayados por el presente procedimiento (líneas negras con rombos) y comparado con un procedimiento disponible en el mercado donde la transcripción inversa se realiza como una reacción de un tubo para todos los microARN presentes en una muestra (líneas grises con esferas). La figura presenta los valores del punto de cruce (C_p) como una función de la concentración de molde. Cada valor es por triplicado.

Definiciones

"Moléculas pequeñas de ARN" se refiere a diminutas moléculas de ARN en una célula viva tales como pequeñas "moléculas de ARN no codificante" es decir moléculas que no se traducen en proteínas. Las moléculas de ARN no codificantes incluyen ARN tales como microARN (miARN), ARN interferentes pequeños (ARNip), ARN nucleares pequeños (ARNnp), ARN nucleolares pequeños (ARNnop), ARN temporales pequeños (ARNtp), ARN antigénicos (ARNag) y ARN de interacción con piwi (ARNpi).

Las expresiones "microARN", "miARN" y "miR" se usan como sinónimos y se refieren a ARN no codificantes de 21-25 nucleótidos derivados de genes endógenos de organismo vivos tales como animales y plantas. Estos llamados miARN maduros son biológicamente activos y se procesan a partir de precursores tipo horquilla más largos llamados pre-miARN (pre-miR) que tienen una longitud de aproximadamente 75 nucleótidos. Los precursores de pre-miARN son pri-miARN (pri-miR) con una longitud de 500 a 3000 nucleótidos. Los miARN se ensamblan en complejos llamados miRNP y actúan como reguladores principales en proceso biológicos importantes mediante su unión a ARN mensajero e interfiriendo con la eficacia de traducción. Los microARN diana de la presente invención se refieren a todos los microARN conocidos, tales como microARN conocidos por la bibliografía científica y bases de datos públicas tales como la base de datos miRBase (<http://microrna.sanger.ac.uk/>) que es la sede de datos de microARN en la web administrada por el Sanger Institute, RU. La miRBase adición 12 se incorpora por la presente por referencia, incluyendo todas las secuencias de miARN maduros y miARN pre-maduros desveladas en la misma. El "perfilado de microARN" describe un análisis a gran escala en que se determinan los niveles de expresión de todos los microARN en una muestra tal como una muestra de tumor para entablar las marcas distintivas de microARN para una enfermedad particular tal como una enfermedad cancerosa.

"Añadir colas poli-A", "adición de colas poli-A" y "poliadenilación" se refiere a la síntesis de una cola poli(A), un tramo de ARN donde todas las bases son adeninas, en los extremo 3' de una molécula de ARN. La poliadenilación es un proceso biológico natural en organismos vivos, pero también puede realizarse in vitro usando diversas polimerasas tales como la poli(A) polimerasa I de *E. coli* (E-PAP) disponible en el mercado.

"Cebador de extensión I" y "cebador RT" se refiere a un cebador oligonucleotídico, que comprende una secuencia de reconocimiento, complementaria a una secuencia en la secuencia diana de ácido desoxirribonucleico y/o ribonucleico, por ejemplo al extremo 3' del microARN maduro o ARN no codificante pequeño en la secuencia diana de ácido ribonucleico, y una secuencia de anclaje esencial para la posterior amplificación por PCR. Dicho cebador de extensión se usa como cebador anclado en una reacción de transcripción inversa para generar un producto de extensión de cebador o ADNc.

Un "ADNc" se refiere a un ADN complementario producido por transcripción inversa de un molde ARN usando una enzima transcriptasa inversa. Puede usarse cualquier transcriptasa inversa para sintetizar las moléculas de ADNc, tales como transcriptasas inversas derivadas de la transcriptasa inversa del virus de la leucemia murina de moloney (M-MuLV), la transcriptasa inversa del virus de la mieloblastosis aviar (AMV), la transcriptasa inversa del virus de la leucemia bovina (BLV), la transcriptasa inversa del virus del sarcoma de Rous (RSV) y la transcriptasa inversa del virus de la inmunodeficiencia humana (VIH).

"Cebadores" se refiere a cortos oligonucleótidos sintetizados químicamente, habitualmente con una longitud de aproximadamente veinte a treinta bases. Se hibridan a un ADN diana, que después se copia por una ADN polimerasa para producir una hebra de ADN complementario. Un "cebador directo" y un "cebador inverso" constituyen una "serie de cebadores de PCR" usada en PCR, donde hibridan con hebras de ADN complementario y

dirigen la replicación uno hacia el otro produciendo la hebra superior y la hebra inferior, respectivamente, lo que conduce a un aumento exponencial en el segmento de ADN diana. La extensión derivada del molde de los cebadores de PCR puede realizarse por cualquier ADN polimerasa, tales como ADN polimerasas termoestables bacterianas, incluyendo ADN polimerasa Taq de *Thermus aquaticus*, ADN polimerasa Pfu de *Pirococcus furiosus*, ADN polimerasa Vent de *Thermococcus litoralis* o ADN polimerasas recombinantes tales como ADN polimerasa Phusion.

Las expresiones "amplificación", "PCR", "reacción de PCR" y "amplificación por PCR", son términos intercambiables usados para indicar el uso de un sistema de amplificación de ácido nucleico, que multiplica los ácidos nucleicos diana usando la reacción en cadena de la polimerasa (PCR).

"qPCR" y "PCR cuantitativa a tiempo real" se refiere al uso de PCR para amplificar y cuantificar simultáneamente una molécula de ADN diana. La qPCR posibilita tanto la detección como la cuantificación de la cantidad de copias o cantidad relativa de una secuencia específica en una muestra de ADN, cuando se normaliza a la aportación de ADN. El ADN amplificado se cuantifica según se acumula en la reacción en tiempo real después de cada ciclo de amplificación. La cuantificación se consigue usando diversas químicas de ensayo incluyendo colorantes fluorescentes, tales como verde SYBR®, que se intercala con ADN bicatenario, y sondas oligonucleotídicas indicadoras fluorescentes tales como sondas Taqman, que liberan señal de fluorescencia durante el proceso de amplificación.

"qRT-PCR" se refiere a reacción en cadena de la polimerasa cuantitativa con transcripción inversa en que un ADNc producido en una reacción de transcripción inversa sirve como molde de ADN inicial para el proceso de amplificación, que después se combina con qPCR para cuantificar la baja abundancia de moléculas de ARN tales como microARN en una muestra de un tipo celular o tisular particular. Se describen procedimientos para qPCR y qRT-PCR en "A-Z of Quantitative PCR." (Bustin, SA (ed.) International University Line (La Jolla, CA, EEUU), 2004).

"Hibridación" se refiere a la unión de dos polímeros complementarios de ácido nucleico monocatenario (tales como oligonucleótidos), tales como ARN, ADN o polímeros que comprenden o que consisten en análogos nucleotídicos (tales como oligonucleótidos de LNA). La hibridación es altamente específica, y puede controlarse mediante la regulación de la concentración de sales y la temperatura. La hibridación sucede entre secuencias complementarias, pero también puede suceder entre secuencias que comprenden algunos desapareamientos. Los oligonucleótidos usados en los procedimientos de la presente invención pueden, por lo tanto, ser 100% complementarios a la molécula diana. Como alternativa, en una realización los oligonucleótidos pueden comprender al menos uno o dos desapareamientos.

La expresión " T_m " o "temperatura de fusión" de un oligonucleótido es en el presente contexto una medida de la estabilidad de un dúplex formado entre el oligonucleótido y su hebra de ADN complementaria perfecta determinada a Na^+ 115 mM, sin formamida. En general la T_m se define como la temperatura a la cual el 50% de los dúplex formados entre el oligonucleótido y una hebra de nucleótidos complementaria se disocian en hebras individuales. La longitud y composición de nucleótidos, tal como la secuencia de nucleótidos y el contenido de nucleótidos G y C, del oligonucleótido son factores importantes que afectan a la T_m . La sustitución de los nucleótidos normales A, G, C y T con las correspondientes moléculas de LNA en un oligonucleótido aumenta la T_m . De forma similar, las condiciones de hibridación definidas por la concentración salina, la concentración de oligonucleótido, y la presencia de desnaturalizantes (tales como formamida o DMSO) afecta a la T_m . Los especialistas en la técnica de biología molecular conocen varias fórmulas útiles para el cálculo de las T_m teóricas que se han desarrollado para evaluar la T_m de un oligonucleótido para PCR, transferencias de Southern y Northern, e hibridación *in situ*. Ejemplos de calculadores de T_m son OligoCalc (W. A. Kibbe (2007) *Nucleic Acids Res* Volumen 35, Web Server punto W43-W46) y LNA Probe T_m Predictor en <http://www.ex-igon.com/oligo-tools>.

El término "base", como se usa en el presente documento cubre las nucleobases de origen natural adenina (A), guanina (G), citosina (C), timina (T) y uracilo (U) así como nucleobases de origen no natural tales como xantina, diaminopurina, 8-oxo- N^6 -metiladenina, 7-desazaxantina, 7-desazaguanina, N^4, N^4 -etanocitosina, N^6, N^6 -etano-2,6-diaminopurina, 5-metilcitosina, 5-(C^3-C^6)-alquil-citosina, 5-fluorouracilo, 5-bromouracilo, pseudoisocitosina, 2-hidroxi-5-metil-4-triazolopiridina, isocitosina, isoguanina, inosina y las nucleobases de "origen no natural" descritas en Benner y col., patente de Estados Unidos N° 5.432.272 y Susan M. Freier y Karl-Heinz Altmann, *Nucleic Acid Research*, 25: 4429-4443, 1997. El término "nucleobase" por tanto incluye no solamente los heterociclos purina y pirimidina conocidos, sino también análogos heterocíclicos y tautómeros de los mismos. Nucleobases de origen natural y no natural adicionales incluyen las descritas en la patente de Estados Unidos N° 3.687.808; en el capítulo 15 de Sanghvi, en *Antisense Research and Application*, Ed. S. T. Croke y B. Lebleu, CRC Press, 1993; en Englisch, y col., *Angewandte Chemie*, Edición Internacional, 30: 613-722, 1991 (véase, especialmente las páginas 622 y 623, y en la *Concise Encyclopedia of Polymer Science and Engineering*, J. I. Kroschwitz Ed., John Wiley & Sons, páginas 858-859, 1990, Cook, *Anti-Cancer DrugDesign* 6: 585-607, 1991).

Los nucleótidos incorporados en oligonucleótidos se mencionan como restos nucleotídicos.

La expresión "base nucleosídica" o "análogo de nucleobase" pretende incluir adicionalmente compuestos heterocíclicos que pueden servir como bases nucleosídicas incluyendo ciertas "bases universales" que no son bases

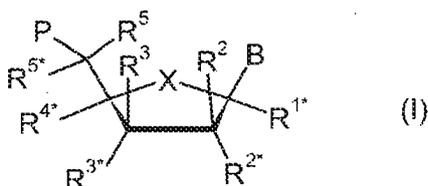
nucleosídicas en el sentido más clásico pero sirven como base nucleosídicas. Se menciona especialmente como base universal el 3-nitropirrol o un 5-nitroindol. Otros compuestos preferidos incluyen derivados de pireno y piridiloxazol, pirenilo, derivados de pirenilmetilglicerol y similares. Otras bases universales preferidas incluyen, derivados de pirrol, diazol o triazol, incluyendo aquellas bases universales conocidas en la técnica.

- 5 Por "ácido nucleico bloqueado", "LNA", "monómero de LNA" o "molécula de LNA" (por ejemplo, un nucleósido de LNA o nucleótido de LNA) o un oligómero de LNA (por ejemplo, un oligonucleótido o ácido nucleico) se entiende un análogo nucleosídico o nucleotídico que incluye al menos un monómero de LNA.

10 Para distinguir entre restos nucleotídicos de LNA y de origen natural en secuencias oligonucleotídicas que contienen LNA presentadas en el presente documento, los LNA se indican por letras mayúsculas, mientras que los restos nucleotídicos de origen natural se indican por letras minúsculas: mC se refiere a LNA metil citosina.

15 Los monómeros de LNA desvelados en la publicación PCT WO 99/14226 son en general ácidos nucleicos particularmente deseables para su incorporación en un oligonucleótido de la invención. Además, los ácidos nucleicos pueden modificarse en el extremo 3' y/o 5 por cualquier tipo de modificación conocida en la técnica. Por ejemplo, cualquier de ellos o ambos extremos puede taparse con un grupo protector, unirse a un grupo enlazador flexible, unirse a un grupo reactivo para ayudar a la fijación a la superficie del sustrato, etc. Los monómeros deseables de LNA y su procedimiento de síntesis también se desvelan en el documento WO 98/39352.

Los monómeros de LNA preferidos, también mencionados como "oxi-LNA", son monómeros de LNA que incluyen compuestos bicíclicos desvelados en la publicación PCT WO 03/020739 donde el puente entre R^{4'} y R^{2'} mostrado en la siguiente fórmula (I) juntos determinan -CH₂-O- o -CH₂-CH₂-O-.



20 Se entiende que referencias en el presente documento a una unidad de ácido nucleico, resto de ácido nucleico, monómero de LNA, o término similar son inclusivas tanto de unidades nucleosídicas y unidades nucleotídicas individuales como de unidades nucleosídicas y unidades nucleotídicas dentro de un oligonucleótido.

25 Una "base modificada" u otros términos similares se refieren a una composición (por ejemplo, un nucleótido o base nucleosídica de origen no natural), que puede aparear con una base natural (por ejemplo, adenina, guanina, citosina, uracilo, y/o timina) y/o puede aparear con un nucleótido o base nucleosídica de origen no natural. De forma deseable, la base modificada proporciona un diferencial de T_m de 15, 12, 10, 8, 6, 4, o 2°C o menor como se describe en el presente documento. Se describen bases modificadas ejemplares en el documento EP 1 072 679 y documento WO 97/12896.

30 La expresión "resto químico" se refiere a una parte de una molécula. "Modificada por un resto químico" por tanto se refiere a una modificación de la estructura molecular normal por inclusión de una estructura química inusual. La unión de dicha estructura puede ser covalente o no covalente.

35 La expresión "inclusión de un resto químico" en una sonda oligonucleotídica por tanto se refiere a la unión de una estructura molecular. Dichos restos químicos incluyen aunque sin limitación agentes de unión al surco menor unidos de forma covalente y/o no covalente (MGB) y/o ácidos nucleicos intercalantes (INA) seleccionados entre un grupo que consiste en colorantes asimétricos de cianina, DAPI, verde SYBR® I, verde SYBR® II, oro SYBR®, PicoGreen®, naranja tiazol, Hoechst 33342, bromuro de etidio, 1-O-(1-pirenilmetil)glicerol y Hoechst 33258. Otros restos químicos incluyen los nucleótidos modificados, bases nucleosídicas u oligonucleótidos modificados de LNA.

40 "Análogo oligonucleotídico" se refiere a una molécula de unión a ácido nucleico capaz de reconocer una secuencia de nucleótidos diana particular. Un análogo oligonucleotídico particular es ácido péptido nucleico (PNA) en que la estructura azúcar fosfato de un oligonucleótido se reemplaza por una estructura tipo proteína. En PNA, los nucleótidos se unen a la estructura poliamida no cargada que produce una estructura quimérica de ácido pseudopéptido-nucleico, que es homomorfa a las formas de ácido nucleico.

45 "Análogo nucleotídico de alta afinidad" o "análogo nucleotídico potenciador de afinidad" se refiere a un análogo nucleotídico de origen no natural que aumenta la "afinidad de unión" de una sonda oligonucleotídica a su secuencia de reconocimiento complementaria cuando se sustituye con al menos uno de estos análogos nucleotídicos de alta afinidad.

50 Como se usa en este documento, una sonda con una "afinidad de unión" aumentada por una secuencia de reconocimiento en comparación con una sonda que comprende la misma secuencia pero no comprende un nucleótido estabilizador, se refiere a una sonda para la cual la constante de asociación (K_a) del segmento de

reconocimiento de la sonda es mayor que la constante de asociación de las hebras complementarias de una molécula bicatenaria. En otra realización preferida, la constante de asociación del segmento de reconocimiento de la sonda es mayor que la constante de disociación (K_d) de la hebra complementaria de la secuencia de reconocimiento en la secuencia diana en una molécula bicatenaria. Los monómeros se mencionan como "complementarios" si contienen nucleótidos que pueden formar enlaces de hidrógeno de acuerdo con las normas de apareamiento de bases de Watson-Crick (por ejemplo, G con C, A con T o A con U) u otros motivos de enlace de hidrógeno tales como por ejemplo diaminopurina con T, 5-metil C con G, 2-tiotimidina con A, inosina con C, pseudoisocitosina con G, etc.

Por "oligonucleótido", "oligómero" u "oligo" se entiende una cadena sucesiva de monómeros (por ejemplo, glucósidos de bases heterocíclicas) conectada mediante enlaces internucleosídicos. El enlace entre dos monómeros sucesivos en el oligo consiste en 2 a 4, deseablemente 3, grupos/átomos seleccionados entre $-\text{CH}_2-$, $-\text{O}-$, $-\text{S}-$, $-\text{NR}^{\text{H}}-$, $>\text{C}=\text{O}$, $>\text{C}=\text{NR}^{\text{H}}$, $>\text{C}=\text{S}$, $-\text{Si}(\text{R}^{\text{H}})_2-$, $-\text{SO}-$, $-\text{S}(\text{O})_2-$, $-\text{P}(\text{O})_2-$, $-\text{PO}(\text{BH}_3)-$, $-\text{P}(\text{O},\text{S})-$, $-\text{P}(\text{S})_2-$, $-\text{PO}(\text{R}^{\text{H}})-$, $-\text{PO}(\text{OCH}_3)-$, y $-\text{PO}(\text{NHR}^{\text{H}})-$, donde R^{H} se selecciona entre hidrógeno y alquilo C_{1-4} , y R^{H} se selecciona entre alquilo C_{1-6} y fenilo. Ejemplos ilustrativos de dichos enlaces son $-\text{CH}_2-\text{CH}_2-\text{CH}_2-$, $-\text{CH}_2-\text{CO}-\text{CH}_2-$, $-\text{CH}_2-\text{CHOH}-\text{CH}_2-$, $-\text{O}-\text{CH}_2-\text{O}-$, $-\text{O}-\text{CH}_2-\text{CH}_2-$, $-\text{O}-\text{CH}_2-\text{CH}=\text{}$ (incluyendo R^{H} (véase la fórmula I) cuando se usa como un enlace a un monómero subsiguiente), $-\text{CH}_2-\text{CH}_2-\text{O}-$, $-\text{NR}^{\text{H}}-\text{CH}_2-\text{CH}_2-$, $-\text{CH}_2-\text{CH}_2-\text{NR}^{\text{H}}-$, $-\text{CH}_2-\text{NR}^{\text{H}}-\text{CH}_2-$, $-\text{O}-\text{CH}_2-\text{CH}_2-\text{NR}^{\text{H}}-$, $-\text{NR}^{\text{H}}-\text{CO}-\text{O}-$, $-\text{NR}^{\text{H}}-\text{CO}-\text{NR}^{\text{H}}-$, $-\text{NR}^{\text{H}}-\text{CS}-\text{NR}^{\text{H}}-$, $-\text{NR}^{\text{H}}-\text{C}(=\text{NR}^{\text{H}})-\text{NR}^{\text{H}}-$, $-\text{NR}^{\text{H}}-\text{CO}-\text{CH}_2-\text{NR}^{\text{H}}-$, $-\text{O}-\text{CO}-\text{O}-$, $-\text{O}-\text{CO}-\text{CH}_2-\text{O}-$, $-\text{O}-\text{CH}_2-\text{CO}-\text{O}-$, $-\text{CH}_2-\text{CO}-\text{NR}^{\text{H}}-$, $-\text{O}-\text{CO}-\text{NR}^{\text{H}}-$, $-\text{NR}^{\text{H}}-\text{CO}-\text{CH}_2-$, $-\text{O}-\text{CH}_2-\text{CO}-\text{NR}^{\text{H}}-$, $-\text{O}-\text{CH}_2-\text{CH}_2-\text{NR}^{\text{H}}-$, $-\text{CH}=\text{N}-\text{O}-$, $-\text{CH}_2-\text{NR}^{\text{H}}-\text{O}-$, $-\text{CH}_2-\text{O}-\text{N}=\text{}$ (incluyendo R^{H} cuando se usa como un enlace a un monómero subsiguiente), $-\text{CH}_2-\text{O}-\text{NR}^{\text{H}}-$, $-\text{CO}-\text{NR}^{\text{H}}-\text{CH}_2-$, $-\text{CH}_2-\text{NR}^{\text{H}}-\text{O}-$, $-\text{CH}_2-\text{NR}^{\text{H}}-\text{CO}-$, $-\text{O}-\text{NR}^{\text{H}}-\text{CH}_2-$, $-\text{O}-\text{NR}^{\text{H}}-$, $-\text{O}-\text{CH}_2-\text{S}-$, $-\text{S}-\text{CH}_2-\text{O}-$, $-\text{CH}_2-\text{CH}_2-\text{S}-$, $-\text{O}-\text{CH}_2-\text{CH}_2-\text{S}-$, $-\text{S}-\text{CH}_2-\text{CH}=\text{}$ (incluyendo R^{H} cuando se usa como un enlace to a monómero subsiguiente), $-\text{S}-\text{CH}_2-\text{CH}_2-$, $-\text{S}-\text{CH}_2-\text{CH}_2-\text{O}-$, $-\text{S}-\text{CH}_2-\text{CH}_2-\text{S}-$, $-\text{CH}_2-\text{S}-\text{CH}_2-$, $-\text{CH}_2-\text{SO}-\text{CH}_2-$, $-\text{CH}_2-\text{SO}_2-\text{CH}_2-$, $-\text{O}-\text{SO}-\text{O}-$, $-\text{O}-\text{S}(\text{O})_2-\text{O}-$, $-\text{O}-\text{S}(\text{O})_2-\text{CH}_2-$, $-\text{O}-\text{S}(\text{O})_2-\text{NR}^{\text{H}}-$, $-\text{NR}^{\text{H}}-\text{S}(\text{O})_2-\text{CH}_2-$, $-\text{O}-\text{S}(\text{O})_2-\text{CH}_2-$, $-\text{O}-\text{P}(\text{O})_2-\text{O}-$, $-\text{O}-\text{P}(\text{O},\text{S})-\text{O}-$, $-\text{O}-\text{P}(\text{S})_2-\text{O}-$, $-\text{S}-\text{P}(\text{O})_2-\text{O}-$, $-\text{S}-\text{P}(\text{O},\text{S})-\text{O}-$, $-\text{S}-\text{P}(\text{S})_2-\text{O}-$, $-\text{O}-\text{P}(\text{O})_2-\text{S}-$, $-\text{O}-\text{P}(\text{O},\text{S})-\text{S}-$, $-\text{O}-\text{P}(\text{S})_2-\text{S}-$, $-\text{S}-\text{P}(\text{O})_2-\text{S}-$, $-\text{S}-\text{P}(\text{O},\text{S})-\text{S}-$, $-\text{S}-\text{P}(\text{S})_2-\text{S}-$, $-\text{O}-\text{PO}(\text{R}^{\text{H}})-\text{O}-$, $-\text{O}-\text{PO}(\text{OCH}_3)-\text{O}-$, $-\text{O}-\text{PO}(\text{OCH}_2\text{CH}_3)-\text{O}-$, $-\text{O}-\text{PO}(\text{OCH}_2\text{CH}_2\text{S}-\text{R})-\text{O}-$, $-\text{O}-\text{PO}(\text{BH}_3)-\text{O}-$, $-\text{O}-\text{PO}(\text{NHR}^{\text{H}})-\text{O}-$, $-\text{O}-\text{P}(\text{O})_2-\text{NR}^{\text{H}}-$, $-\text{NR}^{\text{H}}-\text{P}(\text{O})_2-\text{O}-$, $-\text{O}-\text{P}(\text{O},\text{NR}^{\text{H}})-\text{O}-$, $-\text{CH}_2-\text{P}(\text{O})_2-\text{O}-$, $-\text{O}-\text{P}(\text{O})_2-\text{CH}_2-$, y $-\text{O}-\text{Si}(\text{R}^{\text{H}})_2-\text{O}-$; entre los que $-\text{CH}_2-\text{CO}-\text{NR}^{\text{H}}-$, $-\text{CH}_2-\text{NR}^{\text{H}}-\text{O}-$, $-\text{S}-\text{CH}_2-\text{O}-$, $-\text{O}-\text{P}(\text{O})_2-\text{O}-$, $-\text{O}-\text{P}(\text{O},\text{S})-\text{O}-$, $-\text{O}-\text{P}(\text{S})_2-\text{O}-$, $-\text{NR}^{\text{H}}-\text{P}(\text{O})_2-\text{O}-$, $-\text{O}-\text{P}(\text{O},\text{NR}^{\text{H}})-\text{O}-$, $-\text{O}-\text{PO}(\text{R}^{\text{H}})-\text{O}=\text{}$, $-\text{O}-\text{PO}(\text{CH}_3)-\text{O}-$, y $-\text{O}-\text{PO}(\text{NHR}^{\text{H}})-\text{O}-$, donde R^{H} se selecciona entre hidrógeno y alquilo C_{1-4} , y R^{H} se selecciona entre alquilo C_{1-6} y fenilo, son especialmente deseables. Se dan ejemplos ilustrativos adicionales en Mesmaeker y col., Current Opinion in Structural Biology 1995, 5, 343-355 y Susan M. Freler y Karl-Heinz Altmann, Nucleic Acids Research, 1997, vol. 25, pág. 4429-4443. El lado a mano izquierda del enlace internucleosídico se une al anillo de 5 miembros como sustituyente P^* en la posición 3', mientras que el lado a mano derecha se une a la posición 5' de un monómero precedente.

La expresión "monómero subsiguiente" se refiere al monómero adyacente en la dirección 5'-terminal y el "monómero precedente" se refiere al monómero adyacente en la dirección 3'-terminal. Debe apreciarse que mientras la síntesis natural de ADN y ARN procede en la dirección 5' a 3', muchos esquemas de síntesis química proceden en la dirección de 3' a 5'.

Cuando se realiza PCR cuantitativa, el ciclo en el cual la fluorescencia de una muestra cruza el umbral se llama el ciclo umbral o Ct. Ct se usa para la cuantificación de un molde.

El "punto de cruce" o valor C_p es ligeramente diferente, pero es un valor relacionado que puede usarse para la cuantificación de un molde de forma algo similar al uso de Ct. El Software LightCycler® 480 calcula las segundas derivadas de curvas de amplificación completas y determina donde este valor está en su máximo. Este valor (punto de cruce, C_p) representa el ciclo en el cual el aumento de fluorescencia es más elevado y donde comienza la fase logarítmica de una PCR. Ambos términos Ct y C_p se explican adicionalmente en Bustin, SA (ed.) "A-Z of Quantitative PCR." International University Line (La Jolla, California, EEUU), 2004.

De forma adecuada, la "diana" o "ácido nucleico diana" o "ácido ribonucleico diana" se refiere a cualquier ácido nucleico relevante de una secuencia específica única, por ejemplo, un ácido nucleico biológico, por ejemplo, derivado de un sujeto o ser humano. Dentro del contexto de los oligonucleótidos y sondas de detección usadas en la invención para detectar miARN, la "diana" es un miARN humano o precursor del mismo, o en una realización, una molécula que retiene la información de secuencia genética contenida en la misma - tal como todo o parte (suficiente) de la secuencia de nucleótidos o complemento inverso de la misma.

"Secuencia diana" se refiere a una secuencia específica de ácido nucleico (o secuencia correspondiente de nucleobases) dentro de cualquier ácido nucleico diana.

La expresión "diseño de cebador" se refiere a procedimientos tales como los proporcionados a continuación. El diseño de cebador es un enfoque sistemático usado para diseñar la secuencia de nucleótidos en cebadores directos e inversos asegurando de este modo la especificidad de la sonda y la eficacia de unión a los microARN diana. Se han usado las siguientes normas para el diseño de cebadores para qPCR específica de miR:

Diseño de cebador directo:

Preferentemente, los cebadores directos se diseñan para ser idénticos a 12 a 18 bases del extremo 5' de la secuencia de miR. Preferentemente, la T_m de los cebadores directos debe estar en el intervalo entre 55°C y 65°C, sin embargo, también puede ser aceptable una T_m por debajo de 55°C y por encima de 65°C. Para asegurar que la T_m de los cebadores esté preferentemente en el intervalo entre 55°C y 65°C, puede insertarse uno o más monómeros de LNA en la secuencia sustituyendo el nucleótido natural. También puede añadirse una secuencia artificial de nucleótidos al extremo 5' del cebador directo para cerciorarse de que la T_m esté en el intervalo entre 55°C y 65°C.

Diseño de cebador inverso:

10 El cebador inverso es de acuerdo con la fórmula II:

$$R^3-(T)_x-R^4 \text{ (II)}$$

en la que R^3 es una secuencia de nucleótidos del extremo 5', $(T)_x$ es una parte central de x restos consecutivos de timina en la cantidad de x , en la que x es un número entero de 5 a 50, y R^4 es una secuencia de nucleótidos del extremo 3' que hibrida específicamente con una parte de la molécula de microARN.

15 R^4 es preferentemente una secuencia de nucleótidos de 1 a 10 nucleótidos diseñada desde el extremo 3' de un miARN específico. R^4 es capaz de hibridar específicamente con una hebra de ADN (es decir la hebra superior) producida por extensión del correspondiente cebador directo específico de miARN. Para asegurar la especificidad de miARN y cerciorarse de que la T_m del cebador preferentemente esté en el intervalo entre 55°C y 65°C, puede insertarse uno o más monómeros de LNA en la secuencia R^4 que sustituye el correspondiente
20 nucleótido natural.

La parte central $(T)_x$ es preferentemente un tramo de aproximadamente 15 restos nucleotídicos consecutivos de timina que hibrida con la parte de cola poli-A de la hebra de ADN producida a partir de la extensión del correspondiente cebador directo específico de miARN.

25 La secuencia R^3 del cebador inverso típicamente tiene una longitud de 1 a 20 nucleótidos. Por ejemplo R^3 puede ser de 17 nucleótidos de longitud, 8, 7 o 6 nucleótidos de longitud o incluso solamente de un nucleótido de longitud. En ciertas realizaciones de la presente invención, la secuencia R^3 es 5'-TGACACGGAGGTAG-3' (SEC ID N° 3). La longitud de la secuencia R^3 puede reducirse desde el extremo 5' para ajustar la T_m del cebador inverso al intervalo preferible entre 55°C y 65°C. La secuencia R^3 es idéntica a o al menos solapa con parte de la secuencia R^1 (fórmula (III)) del cebador de extensión.

30 El procedimiento para diseñar el cebador inverso se describe a continuación.

A. Diseño de varios cebadores que cumplen las siguientes condiciones:

- 1) Se delecionan todos los restos de adenina del extremo 3' de la secuencia de nucleótidos de miR. Formarán parte de la cola poli-A.
- 2) Después de delecionar los restos de adenina empieza con el complemento inverso a la base del extremo 3' del miR y continúa hasta solapar una base con el cebador directo.
- 3) Se deleciona una base del extremo 3' del cebador inverso si la secuencia es un resto de citosina y el extremo 3' del cebador directo es un resto de guanina.
- 4) Se deleciona una base del extremo 3' del cebador si la secuencia es un resto de guanina y el extremo 3' del cebador directo es un resto de citosina.
- 40 5) Se deleciona una base del extremo 3' del cebador si las últimas dos bases están solapando con las últimas dos bases del cebador directo (desde el extremo 3').
- 6) Se repite este procedimiento hasta que se cumplan las condiciones.
- 7) Si ningún cebador cumple las condiciones se ignoran las normas nº 2 y 3 y se permite solapamiento de dos bases (pero no más) para secuencias que acaban con AA, AT, TA o TT.
- 45 8) Si ningún cebador cumple las condiciones se intenta otro diseño de cebador directo.

B. Se elige el cebador inverso más largo que cumpla las siguientes condiciones:

- 1) Al menos cuatro bases de longitud.
- 2) Menos de cinco restos de citosina y restos de guanina en las últimas seis bases en el extremo 3' del cebador.

3) Menos de cuatro restos de citosina y restos de guanina en las últimas cinco bases en el extremo 3' del cebador excepto si la última o segunda última base es un resto de adenina o resto de timina.

4) Si es posible, no más de dos restos de adenina o restos de timina en el extremo 3'.

5) Si ningún cebador cumple las condiciones se intenta otro diseño de cebador directo.

5 C. Opcionalmente se inserta un monómero de LNA de acuerdo con las siguientes normas:

1) Se inserta LNA en el primer resto de citosina o resto de guanina desde el extremo 5' de la parte R⁴ del cebador inverso.

2) Ningún LNA en secuencias con tres o más restos de citosina o restos de guanina consecutivos.

3) El LNA debe estar en la posición cuatro o superior desde el extremo 3' del cebador.

10 4) Si no pueden cumplirse las condiciones, se inserta LNA en el primer resto de adenina o resto de timina desde el extremo 5' de la parte R⁴ del cebador inverso.

5) El LNA debe estar en la posición cuatro o superior desde el extremo 3' del cebador.

6) Si no pueden cumplirse las condiciones se inserta LNA-timina (LNA-T) en el extremo 5' de la parte R⁴ del cebador.

15 D. Adición de cola:

Se añade una secuencia de fórmula R³-(T)_x al extremo 5' del cebador inverso. En ciertas realizaciones de la presente invención se añade la secuencia de nucleótidos: 5'-TGACACGGAGGTACTAG TTTTTTTTTTTTTTTT-3' (SEC ID N° 4) al extremo 5' del cebador inverso.

20 Si se añadió un LNA-T a la parte específica de miR del cebador inverso (etapa C6) se deleciona un resto de timina de la cola ya que nunca deba haber más de 15 restos consecutivos de timina.

Finalmente, se retiran nucleótidos del extremo 5' del cebador inverso para refinar la T_m del cebador.

"Muestra" de ARN se refiere a composiciones que comprenden ARN obtenidas de células, tejidos o fluidos de un organismo de acuerdo con procedimientos convencionales descritos por ejemplo en RNA Isolation and Characterization Protocols (Rapley, Ralph; Manning, David L. (Eds.) 1998) conocidos para los especialistas en la técnica o mediante el uso de kits comerciales tales como miRNeasy (QIAGEN GmbH, Hilden, Alemania) o miRVana (Ambion Inc., Austin, TX, EEUU). Fuentes de aislamiento de fracciones de ARN son muestras de células, o tejido o fluido aislado de un organismo u organismos, incluyendo aunque sin limitación, por ejemplo, piel, plasma, suero, fluido medular, fluido linfático, fluid sinovial, orina, lágrimas, células sanguíneas, órganos, tumores, y también muestras de constituyentes de cultivo celular *in vitro* (incluyendo aunque sin limitación medio condicionado resultante del crecimiento de células en medio de cultivo celular, células recombinantes y componentes celulares). "Muestra" también puede referirse a células o fluidos que pueden usarse directamente en un procedimiento de qRT-PCR sin enriquecimiento previo de la fracción de ARN o incluso composiciones que comprenden ARN que comprenden ARN sintetizado de forma artificial.

Células o tipos celulares también se refieren a cualquier célula de origen Eucariota, Procariota y Archaea.

35 Un "organismo vivo" se refiere a una entidad viva, incluyendo aunque sin limitación, por ejemplo, ser humano, ratón, rata, *Drosophila*, *C. elegans*, levadura, *Arabidopsis thaliana*, maíz, arroz, pez cebra, primates, animales domésticos, etc.

Descripción detallada de la realización preferida

Resumen detallado de la reacción de qRT-PCR y los cebadores implicados:

40 La presente invención proporciona procedimientos para la amplificación de moléculas de microARN en una muestra, comprendiendo el procedimiento las etapas descritas esquemáticamente en la Fig. 1, y comprenden:

(a) añadir colas poli-A a una población de moléculas de ARN en una muestra;

(b) producir moléculas de ADNc de las moléculas de ARN con cola poli-A usando un cebador de extensión en una reacción de transcripción inversa; y

45 (c) amplificar las moléculas de ADNc por PCR usando un cebador directo y un cebador inverso ambos cuales son específicos para dicha molécula de ARN.

Cuando se realiza el procedimiento en la práctica la etapa (a) y (b) se realizan típicamente como una reacción

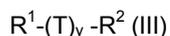
concertada que es universal para todos los ARN a analizar - de ahí su sobrenombre: "RT universal". La ventaja de solamente una reacción de síntesis de ADNc de primera hebra (o reacción RT) a usar como molde para múltiples ensayos de PCR a tiempo real es que ahorra muestra valiosa, reduce la variación técnica y reduce el gasto de tiempo en el laboratorio.

5 Durante la etapa (c) del procedimiento se amplifican por PCR específicamente ARN individuales (o grupos de individuales) usando cebadores directos e inversos específicos. Típicamente los cebadores se optimizan introduciendo uno o más análogos nucleotídicos de LNA en la secuencia de los cebadores, y típicamente la PCR es PCR a tiempo real cuantitativa. Como puede observarse a partir de los ejemplos, el procedimiento producen 1) ensayos especialmente específicos que posibilitan la discriminación entre secuencias de ARN altamente relacionadas y 2) un fondo extremadamente bajo que posibilita la cuantificación precisa de niveles muy bajos de ARN.

El procedimiento se ha usado extensivamente para cuantificar pequeños ARN. En una realización preferida el pequeño ARN es un microARN.

15 El cebador de extensión puede ser de una longitud en el intervalo de 10 a 100 nucleótidos, tal como una longitud en el intervalo de 15 a 45 nucleótidos. Preferentemente, el cebador de extensión tiene una longitud de 20, 21, 22, 23, 24, 25, 26, 27, 28, 29 o 30 nucleótidos.

En una realización preferida, el cebador de extensión es de fórmula III:



20 en la que R^1 es una secuencia de nucleótidos del extremo 5', $(T)_y$ es una parte central de restos consecutivos de timina en la cantidad de y , en la que y es un número entero de 5 a 50, y R^2 es una secuencia de nucleótidos del extremo 3', en la que R^2 es un motivo de secuencia de anclaje degenerado VN, que comprende los dos restos nucleotídicos 3'-terminales, en la que V indica una selección de restos que comprenden bases que puede formar pares de bases con todas salvo una de las bases naturales (por ejemplo, apareamiento de bases con guanina, citosina, uracilo y timina pero no con adenina), típicamente V indica que la base en cualquier molécula cebadora es una base seleccionada aleatoriamente entre adenina, guanina y citosina y en la que N indica una base que puede formar pares de bases con cualquiera de las bases naturales (por ejemplo, adenina, guanina, citosina, uracilo y timina), típicamente N puede ser una base seleccionada aleatoriamente entre restos de adenina, guanina, citosina o timina, o en la que

25 R^2 es un motivo de secuencia degenerado VNN, que comprende los tres restos nucleotídicos 3' terminales, en la que V indica una selección de restos que comprenden bases que pueden formar pares de bases con todas salvo una de las bases naturales (por ejemplo, apareamiento de bases con guanina, citosina, uracilo y timina pero no con adenina), típicamente V indica que la base es una base seleccionada aleatoriamente entre adenina, guanina y citosina y en la que N indica una base que puede formar pares de bases con cualquiera de las bases naturales (por ejemplo, adenina, guanina, citosina, uracilo y timina), típicamente N puede ser una base seleccionada aleatoriamente entre restos de adenina, guanina, citosina o timina.

Típicamente, la parte del extremo 5' R^1 es una secuencia de nucleótidos con una longitud de 1 a 30 nucleótidos. Por ejemplo la secuencia R^1 puede ser de 6, 7, 8, 9, o 10 nucleótidos de longitud. La secuencia R^1 incluye al menos una secuencia de hibridación para la secuencia R^3 en el cebador inverso de la fórmula II (véase a continuación) a usar en la posterior qPCR específica de ARNm.

40 Preferentemente, y en la fórmula II está en el intervalo de 5 a 50, más preferentemente y está en el intervalo de 5 a 21. Por ejemplo y es 12, 13, 14, 15, 16, 17 o 18. Más preferentemente y es 15.

En una realización especialmente preferida, y de la fórmula (III) es igual a x de la fórmula (II).

En una realización preferible, el cebador de extensión comprende al menos un LNA.

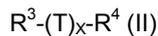
45 En una cierta realización de la presente invención el cebador de extensión tiene la secuencia 5'-GGTACTAGTTTTTTTTTTTTTTVN-3'(SEC ID N° 5).

Preferentemente, el cebador directo tiene una longitud en el intervalo de 10 a 100 nucleótidos, tal como 12 a 22 o 13 a 20 o 14, 15, 16, 17, 18 o 19 nucleótidos. Véase la 18 para realizaciones específicas.

El cebador directo puede comprender uno, dos o incluso más LNA.

50 En una realización preferida, la secuencia de nucleótidos del cebador directo se diseña para hibridar específicamente con la molécula de ADN complementaria de una molécula específica de microARN usando las normas de diseño de cebador descritas en la definición de "diseño de cebador" (véase la sección de DEFINICIONES).

Preferentemente, el cebador inverso es de fórmula II:



5 en la que R^3 es una secuencia de nucleótidos del extremo 5', $(T)_x$ es una parte central de nucleótidos consecutivos de timina en la cantidad de x , en la que x es un número entero de 5 a 50, y R^4 es una secuencia de nucleótidos del extremo 3' que hibrida específicamente con una secuencia de nucleótidos de una molécula de ARN diana, y en la que el cebador directo o R^4 del cebador inverso comprende al menos un LNA.

Preferentemente, la secuencia de nucleótidos del extremo 5' R^3 del cebador inverso de fórmula II es una secuencia de nucleótidos con una longitud de 1 a 30 nucleótidos.

X en la fórmula II está en el intervalo de 5 a 50, preferentemente, x está en el intervalo de 5 a 21. Por ejemplo x es 12, 13, 14, 15, 16, 17 o 18. Más preferentemente x es 15.

10 En una realización especialmente preferida x de la fórmula (II) es igual a y de la fórmula (III).

En una realización preferida, la secuencia de nucleótidos del extremo 3' R^4 del cebador inverso de fórmula II tiene una longitud en el intervalo de 1 a 10 nucleótidos.

15 Como se ilustra en el ejemplo 2 LNA tienen un profundo efecto. Por consiguiente, en una realización preferida, la parte del extremo 3', R^4 , del cebador inverso de fórmula II comprende al menos un LNA. Más preferentemente, la parte del extremo 3', R^4 , del cebador inverso de fórmula II contiene solamente un LNA. En una realización particularmente preferida, el LNA se sitúa en la posición 5' o la posición adyacente a la posición 5' de la parte R^4 del cebador inverso.

20 En una realización preferida, la secuencia de nucleótidos del cebador inverso se diseña para que hibride específicamente con una molécula específica de microARN usando las normas de diseño de cebador descritas en la definición de "diseño de cebador" (véase la sección de DEFINICIONES).

Diseño de cebadores

La invención también proporciona procedimientos para diseñar la secuencia de nucleótidos de los cebadores directos y los cebadores inversos usados en la invención. Se presentan enfoques sistemáticos y evaluación experimental de los cebadores en la sección de EJEMPLOS 3.

25 **Ejemplos de aplicaciones de la presente invención**

La presente invención es útil para la amplificación y cuantificación de pequeñas moléculas de ARN tales como microARN en diversas células o tejidos originarios de seres humanos u otros organismos como se describe en los EJEMPLOS 5 y 9. Como se ilustra en el ejemplo 10, el presente procedimiento es superior con respecto a la sensibilidad y especificidad, en comparación con un enfoque de síntesis de ADNc en un único tubo algo similar que está disponible en el mercado.

Por tanto, un aspecto de la invención es un procedimiento para medir la cantidad de un microARN diana en una muestra de un organismo vivo, comprendiendo el procedimiento las etapas de:

a) amplificar el microARN diana de acuerdo con el procedimiento de una cualquiera de las reivindicaciones 1 a 28

35 b) medir la cantidad de las moléculas amplificadas de ADN.

La cantidad de las moléculas amplificadas de ADN se mide típicamente usando PCR a tiempo real cuantitativa basada en fluorescencia mediante, por ejemplo, control de la fluorescencia de verde SYBR® como una función del número de ciclos de PCR.

40 Por consiguiente, la presente invención puede usarse como una herramienta para el perfilado de microARN de diferentes tipos celulares y tisulares dentro de un organismo vivo. Por tanto, la cantidad de microARN específicos y las cantidades de microARN específicos presentes en diferentes tipos celulares y tisulares pueden determinarse usando la presente invención. Asimismo, la invención puede usarse para discriminar entre los niveles de microARN maduros, pre-microARN y pri-microARN en diferentes tipos celulares y tisulares usando cebadores apropiados dirigidos al microARN maduro o sus precursores (véase la Fig. 5).

45 En otro aspecto, la presente invención puede usarse como una herramienta para el perfilado de microARN de pacientes que padecen diversas enfermedades tales como cáncer. A modo de ejemplo, pueden establecerse los microARNomas de diversos tejidos cancerosos usando la invención.

50 En otro aspecto más, la presente invención puede usarse para el diagnóstico de diversas enfermedades tales como cáncer midiendo la expresión de microARN en tejidos y fluidos corporales de individuos normales y de individuos que tienen una enfermedad, y posteriormente analizando las diferencias en los perfiles de microARN.

En otra realización, la presente invención puede usarse para medir cambios en la cantidad de microARN específicos en respuesta al tratamiento de un individuo afectado por enfermedad mediante agentes farmacéuticos, tales como agentes quimioterapéuticos, y mediante cirugía.

5 En otra realización, la presente invención puede usarse para medir biomarcadores predictivos específicos de microARN que se correlacionan con supervivencia sin recidiva de pacientes que tienen una enfermedad, tal como una enfermedad cancerosa.

Debido a su simplicidad: una etapa "RT universal" y una etapa discriminatoria de PCR, la presente invención también es adecuada para procedimientos de alto rendimiento en plataformas robóticas dirigidas a la cuantificación de un único microARN o un conjunto de microARN. Por tanto, el procedimiento es particularmente adecuado para múltiples reacciones posteriores de PCR de microARN individuales como se describe en el EJEMPLO 5, 9 y 10.

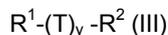
En una cierta realización, el procedimiento de la invención puede usarse para determinar cuantitativamente la cantidad de microARN maduro en una muestra sin interferencia del pre-miR correspondiente, y viceversa puede determinarse la cantidad de un pre-miR sin interferencia del microARN maduro como se describe en los EJEMPLOS 6, 7 y 8.

15 En otra realización, el procedimiento de la invención puede usarse para la discriminación entre dianas con diferencias individuales de nucleótidos como se describe en el EJEMPLO 4.

En otro aspecto, la presente invención proporciona kits para detectar al menos un microARN diana, comprendiendo los kits una o más series de cebadores específicos para la detección de un microARN diana, comprendiendo cada serie de cebadores, en primer lugar, un cebador de extensión universal para producir una molécula de ADNc complementaria a un microARN diana y, en segundo lugar, una serie de cebadores de PCR que comprende un cebador directo específico para el extremo 5' del miARN diana y un cebador inverso específico para el extremo 3' del miARN diana para amplificar la molécula de ADNc.

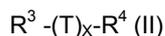
Por consiguiente, en un aspecto, la invención proporciona un kit para detectar al menos un microARN diana. El kit comprende al menos una serie de cebadores específicos para la detección de un microARN diana, comprendiendo dicha serie de cebadores:

a) un cebador de extensión de fórmula I:



en la que R^1 es una secuencia de nucleótidos del extremo 5', $(T)_y$ es una parte central de restos consecutivos de timina en la cantidad de y , en la que y es un número entero de 5 a 50, y R^2 es una secuencia de nucleótidos del extremo 3', y

b) un cebador inverso de fórmula II:



en la que R^3 es una secuencia de nucleótidos del extremo 5', $(T)_x$ es una parte central de restos consecutivos de timina en la cantidad de x , en la que x es un número entero de 5 a 50, y R^4 es una secuencia de nucleótidos del extremo 3' que hibrida específicamente con una secuencia de nucleótidos de una molécula de microARN diana, y

c) un cebador directo.

En una realización, el kit se diseña para detectar al menos un microARN diana de mamífero que comprende al menos una serie de cebadores específicos para la detección de un microARN diana.

Preferentemente, los cebadores de extensión, inversos y directos se diseñan siguiendo las normas de diseño dadas en la parte "diseño de cebador" de la sección de DEFINICIONES y en otras partes e siendo los cebadores directos e inversos que incluyen al menos una molécula de LNA realizaciones especialmente preferidas.

Un ejemplo no limitante de un cebador de extensión se muestra como la SEC ID N° 5.

Los cebadores directos e inversos incluidos en el kit pueden diseñarse para detectar cualquier microARN diana de mamífero de acuerdo con los procedimientos descritos en el presente documento. Se enumeran ejemplos no limitantes de cebadores directos e inversos en la TABLA 16.

En ciertas realizaciones, el kit incluye múltiples series de cebadores que pueden usarse para detectar diversas dianas de microARN de mamífero, tales como dos dianas de microARN hasta varios cientos de dianas de microARN.

Un kit de la invención también puede proporcionar una serie de cebadores suministrados en placas de qPCR de microtitulación tales como placas de qPCR de microtitulación de 96, 768, 869, 1536 o incluso 3456 pocillos

adecuadas para la manipulación robótica como se indica en el EJEMPLO 9.

Un kit de la invención también puede incluir reactivos necesarios para la adición de cola poli-A, las reacciones de extensión de cebador y PCR, tales como tampones, sales, agentes reductores, desoxinucleósidos, trifosfatos, nucleósidos, trifosfatos, y enzimas. También puede incluirse un reactivo de detección para la qPCR tal como verde SYBR®. Asimismo, también puede incluirse un kit para el aislamiento de ARN.

Un aspecto adicional de la invención es un procedimiento de alto rendimiento para medir la cantidad de microARN diana específicos en una muestra de un organismo vivo usando el procedimiento de la presente invención e integrando un proceso automatizado donde la reacción de adición de cola poli-A y la reacción de transcripción inversa combinadas se divide en alícuotas en pocillos individuales de una placa de microtitulación que contiene series de cebadores específicos de microARN de cebadores directos e inversos, produciendo las etapas de:

a) adición de colas poli-A a una población de moléculas de ARN en una muestra y producción de moléculas de ADNc de las moléculas de ARN con cola poli-A usando un cebador de extensión en una reacción de transcripción inversa; y

b) pipeteo de alícuotas de la reacción combinada de adición de cola poli-A y transcripción inversa en pocillos individuales de una placa de microtitulación; y

c) amplificación de microARN diana específicos en pocillos individuales de una placa de microtitulación que contiene series de cebadores específicos de microARN; y

d) medición de la cantidad de moléculas de microARN específicas en pocillos individuales.

que se realizan de un modo compatible con una configuración experimental de alto rendimiento. Dicha configuración típicamente comprenderá uno o más robots de pipeteo.

Ejemplos

Ejemplo 1: producción de moléculas de ADN específicas usando qPCR específica de miR

En este ejemplo se amplificó hsa-miR-197 a partir de una muestra de ARN humano usando la reacción en cadena de la polimerasa con transcripción inversa cuantitativa específica de miR (qRT-PCR) de la presente invención.

Se mezclaron en hielo:

- 1 µl de tampón de poli(A) polimerasa 10X (New England Biolabs)
- 1 µl de ATP 1 mM
- 1 µl de cebador RT 10 µM (=cebador de extensión) (L2TA: 5'-ggtactagttttttttttvn (SEC ID N° 5), v indica restos de citosina, guanina y adenina, n indica restos de citosina, guanina, adenina y timina)).
- 1 µl de mezcla de dATP 1 mM, dCTP 1 mM, dGTP 1 mM, dTTP 1 mM
- 0,5 µl (200 U/µl) de transcriptasa inversa MuLV (New England Biolabs Inc., Ipswich, MA, EEUU)
- 0,2 µl (5 U/µl) de poli(A) polimerasa (New England Biolabs)
- 1 µl de muestra de ARN (muestra de ARN humano total =100 ng de una mezcla de 25 ng de ARN de corazón humano, 25 ng de ARN de cerebro humano, 25 ng de ARN de hígado humano y 25 ng de ARN de pulmón humano todo de Ambion, Austin, TX, EEUU. Los moldes sintéticos se prepararon en 10 ng/µl de ARN de fago MS2 en TE, se añaden aproximadamente 10⁷ copias a la reacción. El molde sintético se obtiene de Integrated DNA technologies Inc., Coralville, IA, EEUU)
- Agua hasta 10 µl

Controles negativos: control de agua y un control de ARN humano total sin poliA polimerasa en la reacción RT.

La mezcla se incubó a 42°C, 1 hora seguido de 95°C, 5 minutos.

Para qPCR se usó 1 µl o menos de la reacción de adición de cola poliA/RT (etapa 1 en la Fig. 1) para cada reacción de PCR con cebadores directos e inversos específicos de gen para hsa-miR-197; cebador directo 5' ttmCaccacctctcca (SEC ID N° 1) y cebador inverso 5'-ctttttttttttGctgggt (SEC ID N° 2) (en las secuencias de nucleótidos las letras minúsculas indican un nucleótido de origen natural, las letras mayúsculas indican LNA, mC se refiere a LNA metil citosina).

La PCR a tiempo real se hizo en un termociclador ABI 7500® (Applied Biosystems Inc, Foster City, CA, EEUU) controlando la fluorescencia de verde SYBR® como una función del número de ciclos de PCR. Una mezcla típica de reacción de PCR contenía:

- 10 µl de mezcla maestra de PCR 2x (Roche cat n° 04 673 484 001, Roche Diagnostics A/S, Hvidovre, Dinamarca)
- 1 µl o menos de la reacción RT

- 1 µl de tampón TE con cebador directo específico de miR 2,5 µM y cebador inverso específico de miR 2,5 µM (tampón TE: Tris/HCl 10 mM (pH 8,0), EDTA 1mM).
- Agua hasta 20 µl.

5 La mezcla se incubó a 95°C durante 10 min seguido de 40 ciclos de 95°C durante 5 segundos; 60°C durante 60 segundos con medición de la fluorescencia.

La amplificación del producto correcto se midió comparando el perfil de la curva de fusión del producto de PCR con el perfil de la curva de fusión de un producto de PCR obtenido por amplificación de un molde sintético (Fig. 2). No se obtuvo señal con los controles negativos. El experimento muestra que se obtuvo el mismo producto de PCR de hsa-miR-197 y correcto usando tanto la muestra de ARN humano total como hsa-miR-197 como molde en la etapa 1.

10 **Ejemplo 2: efecto de LNA en el cebador inverso**

El efecto de diferentes diseños de cebadores de PCR específicos de miR de la etapa 2 puede ensayarse sobre moldes de ADN artificial con la misma secuencia que el producto de la reacción de transcripción inversa. Una importante ventaja de usar un molde de ADN artificial para la PCR es que se eliminan las variaciones experimentales en la eficacia de la etapa de transcripción inversa.

15 Molde de ADN de hsa-let-7a:

5'-tgcggtgacacggaggtagtactagtttttttttaactatacaeaetaaccta-3' (SEC ID N° 6)

ADN de salmón: 2 ng/µl en tampón TE

Cebador directo específico de miR:

20 F7a: 5'-tGaGgtagtaggtg (SEC ID N° 7) (letras minúsculas indican un nucleótido de origen natural, letras mayúsculas indican LNA).

Cebadores inversos específicos de miR:

r7a.2: 5'-cggtagacacggaggtagtactagtttttttttaactata (SEC ID N° 8)

r7a.7: 5'-cggtagacacggaggtagtactagtttttttttaamCtata (SEC ID N° 9)

Se preparó una mezcla de PCR:

- 25
- 550 µl de mezcla maestra de PCR 2 x (Roche cat n° 04 673 484 001)
 - 440 µl de agua, y como se describe en la tab. 1.

TABLA 1: Se prepararon cuatro reacciones de PCR:

Muestra	Molde	Cebador directo 10 µM	Cebador inverso 10 µM	Mezcla de PCR
N° 1	1 µl de ADN de salmón	0,5 µl F7a	0,5 µl r7a.2	18 µl
N° 2	10000 copias de molde de ADN de hsa-let-7a en ADN de salmón	0,5 µl F7a	0,5 µl r7a.2	18 µl
N° 3	1 µl de ADN de salmón	0,5 µl F7a	0,5 µl r7a.7	18 µl
N° 4	10000 copias de molde de ADN de hsa-let-7a en ADN de salmón	0,5 µl F7a	0,5 µl r7a.7	18 µl

La PCR a tiempo real se realizó en un termociclador ABI 7500® controlando la fluorescencia de verde SYBR® como una función del número de ciclos de PCR.

La mezcla se incubó a 95°C durante 10 min seguido de 40 ciclos de 95°C durante 5 segundos; 60°C durante 60 segundos con medición de la fluorescencia.

30 La amplificación del producto correcto se midió de acuerdo con las recomendaciones del fabricante del termociclador (Applied Biosystems, Foster City, CA, EEUU). En resumen, la reacción de PCR se incubó a 60°C durante 1 minuto y se midió la fluorescencia durante un lento aumento de la temperatura hasta 95°C. La primera derivada de las curvas de fusión se muestra en la figura 3:

Los resultados muestra (Figura 3) que el cebador inverso sin LNA (r7a.2) da una señal positiva en el control negativo mientras que el cebador inverso con LNA (r7a.7) no. Por tanto la base de LNA en r7a.7 es necesaria para evitar un desarrollo de producto de PCR inespecífico en la reacción de control negativo. Ambos cebadores amplifican el molde de control positivo.

- 5 Como puede observarse a partir de la tabla 2, se descubrió que la inclusión de un LNA en la secuencia específica de miR del cebador inverso reducía la señal de fondo en PCR.

TABLA 2: Efecto de LNA en pares de cebadores para qPCR específica de miR

hsa miR	Cebador directo 5' → 3	Cebador inverso 5' → 3	C _T control negativo	C _T molde
let-7a	tGaGgtagtaggttg (SEC ID N° 7)	cggtagacacggaggtagtagtttttttttttaactata (SEC ID N° 8)	28	25
		cggtagacacggaggtagtagttttttttttaamCtata (SEC ID N° 9)	nd	24
miR -16	tAgmCagcacgtaaa (SEC ID N° 10)	cacggaggtagtagtttttttttttcgccaat (SEC ID N° 11)	27	24
		cacggaggtagtagttttttttttmCgccaat (SEC ID N° 12)	nd	26
miR -21	tAgmCttatcagactgatg (SEC ID N° 13)	gcggtgacacggaggtagtagtttttttttttcaac (SEC ID N° 14)	32	25
		gcggtgacacggaggtagtagttttttttttmCaac (SEC ID N° 15)	38	24
miR-23a	atmCamCattgccag (SEC ID N° 16)	tgacacggaggtagtagtttttttttttgaaatc (SEC ID N° 17)	34	25
		tgacacggaggtagtagttttttttttGaaatc (SEC ID N° 18)	39	26
miR150	tmCtmCccaacccttg (SEC ID N° 19)	tgacacggaggtagtagttttttttttmCactggta (SEC ID N° 20)	28	23
		tgacacggaggtagtagttttttttttcactggta (SEC ID N° 21)	38	25
miR208a	ataaGamCgAgcaaaaag (SEC ID N° 22)	mCggtgacacggaggtagtagtttttttttttacaag (SEC ID N° 23)	35	25
		cggtagacacggaggtagtagttttttttttAcaagc (SEC ID N° 24)	nd	26
		cggtagacacggaggtagtagttttttttttTacaagc (SEC ID N° 25)	nd	26

Letras minúsculas indican nucleótidos de origen natural, letras mayúsculas indican LNA, mC se refiere a LNA metil citosina, C_T indica ciclo umbral, nd, no detectable.

Ejemplo 3: diseño manual de cebador y validación de cebadores para miR

Se diseñaron cebadores de forma manual siguiendo las normas de diseño presentadas en la parte "diseño de cebador" de la sección DEFINICIONES.

10

Validación de cebador:

ES 2 541 356 T3

Usando las normas de diseño de cebador es posible conseguir cebadores de PCR que tengan una tasa de éxito >70% en experimentos de PCR a tiempo real de acuerdo con los siguientes criterios de validación: Se prepara mezcla Rt para cuatro muestras de transcripción inversa (RT):

1. Agua
- 5 2. 100 ng de mezcla de ARN humano total* (por defecto se usa una mezcla de 25 ng de cada ARN total de corazón, cerebro, hígado y pulmón de Ambion).
*Mezcla de ARN: 1 µl de ARN de corazón 1 µg/µl, 1 µl de ARN de cerebro 1 µg/µl, 1 µl de ARN de hígado 1 µg/µl, 1 µl de ARN de pulmón 1 µg/µl, 36 µl de TE. Se almacena en alícuotas de 1 µl a -80°C
- 10 3. 100 ng de mezcla de ARN humano total sin adición de cola poliA.
4. 10⁷ copias del miR sintético en 10 ng de ARN de fago MS2 en TE (los miR sintéticos se obtuvieron de Integrated DNA technologies Inc., Coralville, IA, EEUU). El miR puede añadirse como una combinación que comprende hasta al menos 20 miR.

Mezcla RT	Total
Tampón PAP 10x	4,4 µl
ATP 1 mM	4,4 µl
Cebador RT L6TA 1 µM	4,4 µl
4x dNTP 1 mM	4,4 µl
Transcriptor 1:10	2,2 µl
Agua	11 µl

Tampón PAP = tampón de poli(A) polimerasa (New England Biolabs).
L6TA = 5'-tgcggtgacacggaggtagctagtttttttttttVN (SEC ID N° 129).
Transcriptor = Transcriptasa inversa (Roche Diagnostics A/S, Hvidovre, Dinamarca, cat n° 03 531 295 001).

Reacciones de transcripción inversa:

muestra	Mezcla de ARN 0,1 µg/µl*	1 µl	agua	PAP ^a (NEB) 0,5 U/µl	Mezcla RT
N° 1			1 µl	2 µl	7 µl
N° 2	1 µl			2 µl	7 µl
N° 3	1 µl		2 µl		7 µl
N° 4		1e7miR		2 µl	7 µl

Incubar 42°C, 1 h>95°C, 5'
Añadir 90 µl de TE a cada muestra y almacenar a -20°C
a) Recuérdese diluir la poli(A) polimerasa (PAP) 1:10 antes de su uso

15

qPCR específica de miR:

Se ejecuta la PCR con los cebadores directos e inversos en 1 µl de cada reacción de transcripción inversa (RT):

Muestra	1 µl de reacción RT	Cebador directo 5 µM	Cebador inverso 5 µM	Faststart 2x	Agua
N° 1	N° 1	0,5 µl	0,5 µl	10 µl	8 µl
N° 2	N° 2	0,5 µl	0,5 µl	10 µl	8 µl
N° 3	N° 3	0,5 µl	0,5 µl	10 µl	8 µl
N° 4	N° 4	0,5 µl	0,5 µl	10 µl	8 µl

PCR a tiempo real en el ABI 7500:

95°C, 10 min
 95°C, 15 segundos; 60°C, 60 segundos; 40 ciclos
 Ejecutar análisis de curva de fusión

5 **Criterios de aceptación:**

Muestra 1: Umbral de ciclo (Ct) por encima de 40 en comparación con el área exponencial para nº 2 y 4. Derivada del pico de fusión por debajo de 5000.

Muestra 2: Ct por debajo de 35

10 Un pico en curva de fusión con forma de campana, salvo que se justifique de otro modo que el pico deba estar entre 69°C y 80°C. Pico a la misma temperatura (+/- 0,5°C) que en la muestra 4.

En el área exponencial, el punto de cruce a 10 veces delta Rn menos el punto de cruce a delta Rn debe ser entre 3,2 y 4,4:
 3,2, < (C10T-CT) < 4,4

15 Muestra 3: Ct por encima de 40 en comparación con el área exponencial para nº 2 y 4. Derivada del pico de fusión por debajo de 5000.

Muestra 4: Un pico en curva de fusión con forma de campana, salvo que se justifique de otro modo que el pico deba estar entre 69°C y 80°C. Pico a la misma temperatura (+/- 0,5°C) que en la muestra 2.

Tabla 3: Diseño y validación de 17 pares de cebadores

mIR	Cebador directo 5' → 3	SEC ID Nº	Cebador inverso 5' → 3	SEC ID Nº	¿Ensayo válido?
<i>hsa-miR-124</i>	taaGgcacgcggtga	26	tgacacggagggtactagttttttttttTggcat	43	Sí
<i>hsa-miR-9</i>	ctgtmCtttGgtatctag	27	tgacacggagggtactagttttttttttmCatacag	44	Sí
<i>hsa-miR-181a</i>	aamCattmCaacgctgt	28	tgacacggagggtactagtttttttttttamCtcac	45	Sí
<i>hsa-miR-128</i>	tmCamCagtgaaccggt	29	tgacacggagggtactagttttttttttAaagaga	46	Sí
<i>hsa-miR-488</i>	ttGaaaGgctatttc	30	tgacacggagggtactagttttttttttGacca	47	No
<i>hsa-miR-328</i>	ctggccctctctgcc	31	tgacacggagggtactagttttttttttAcggaa	48	Sí
<i>hsa-miR-324</i>	cgcaccccctaggcat	32	tgacacggagggtactagttttttttttAcacca	49	Sí
<i>hsa-miR-331</i>	cTaGgtatggtcca	33	tgacacggagggtactagttttttttttGgatc	50	No
<i>hsa-miR-34a</i>	tGgcAgtgtcttagc	34	tgacacggagggtactagtttttttttttamCaacca	51	Sí
<i>hsa-miR-130a</i>	caGtGcaatgttaaag	35	tgacacggagggtactagttttttttttAtgc	52	No
<i>hsa-miR-1</i>	tGgAatgtaaagaagt	36	tgacacggagggtactagttttttttttAtacata	53	No
<i>hsa-miR-23b</i>	atmCamCattgccag	37	tgacacggagggtactagttttttttttggTaadc	54	Sí
<i>hsa-miR-133a</i>	tTtGgtcccctcaa	38	tgacacggagggtactagttttttttttGagctg	55	Sí
<i>hsa-miR-133b</i>	tTtGgtcccctcaa	39	tgacacggagggtactagttttttttttAgctg	56	Sí
<i>hsa-miR-93</i>	cAaaGtgctgtcgtg	40	tgacacggagggtactagttttttttttmCtacctg	57	No
<i>hsa-miR-181b</i>	aamCattmCattgctgtc	41	tgacacggagggtactagttttttttttAccca	58	Sí
<i>hsa-miR-24</i>	tGgctmCagttcagca	42	tgacaoggagggtactagttttttttttmCtgctc	59	Sí
					Total: 12/17 =71%

Letras minúsculas indican nucleótidos de origen natural, letras mayúsculas indican LNA, mC se refiere a LNA metil citosina.

20 Resultado (véase tab. 3): Se diseñaron diecisiete pares de cebadores de acuerdo con las normas de diseño. Doce de los 17 ensayos se validaron satisfactoriamente de acuerdo con el protocolo de validación correspondiente a una tasa de éxito del 71%.

Tabla 4: Diseño y validación de 15 pares de cebadores. La T_m teórica del cebador inverso se optimizó a 59°C:

mIR	Cebador directo 5' → 3	SEC ID Nº	Cebador inverso 5' → 3	SEC ID Nº	¿Ensayo válido?
<i>hsa-miR-146b</i>	ctgtGagaactgaattcca	60	gtactagttttttttttAgcct	75	Sí
<i>hsa-miR-146b-3p</i>	tgccctgtggactca	61	gtactagttttttttttmCcagaac	76	Sí

(continuación)

miR	Cebador directo 5' → 3'	SEC ID N°	Cebador inverso 5' → 3'	SEC ID N°	¿Ensayo válido?
<i>hsa</i> -miR-429	ctgtaamCtGtgga	62	gtactagtttttttttAcggtt	77	Sí
<i>hse</i> -miR-193a-3p	aactggcctacaaagtcc	63	gtactagtttttttttamCtgg	78	Sí
<i>hsa</i> -miR-193a	gtcttgcgggcga	64	ggfactagttttttttmCatct	79	Sí
<i>hsa</i> -miR-193b	aamCtggccctcaaag	65	gaggtagttttttttmCatct	80	Sí
<i>hsa</i> -miR-149	tmCtggCtcogtgtctca	66	tagttttttttgggAgtg	81	Sí
<i>hsa</i> -miR-452	aamCtGttgcagaggaa	67	gtactagttttttttmCagtt	82	Sí
<i>hsa</i> -miR-452*	ctmCatmCtgcaagaagta	68	gtactagttttttttmCactt	83	No
<i>hsa</i> -miR-30b	tGtaaamCatcctacactc	69	gtactagtttttttttaGctga	84	No
<i>hsa</i> -miR-34b	ctgcaatcactaactccact	70	gaggtagtttttttttAtgg	85	Sí
<i>hsa</i> -miR-34c	aggcaGtgtagtagctg	71	tactagtttttttttGcaatca	86	Sí
<i>hsa</i> -miR-134	tgtgactggtgaccaga	72	gtactagttttttttTcccct	87	Sí
<i>hsa</i> -miR-671	ctgaGgaagcoctgga	73	gtactagttttttttmCtoca	88	No
<i>hsa</i> -miR-769-3p	ctgggatctccgggtct	74	aggtagtttttttttAacca	89	Sí
					Total: 12/15 =80%

Letras minúsculas indican nucleótidos de origen natural, letras mayúsculas indican LNA, mC se refiere a LNA metil citosina.

5 Resultado (véase tab. 4): se diseñaron 15 pares de cebadores de acuerdo con las normas de diseño. Doce de los 15 ensayos se validaron satisfactoriamente de acuerdo con el protocolo de validación correspondiente a una tasa de éxito del 80%.

Ejemplo 4: discriminación entre dianas con una diferencia de un único nucleótido.

Hay tres miR que difieren solamente en un nucleótido de la secuencia de *hsa*-let-7a (siguiente tabla).

Tabla 5: Secuencia de nucleótidos de la familia let-7 de miARN

miR	Secuencia ^{a)}
<i>hsa</i> -let-7a	5'-ugagguaguagguuguauaguu-3' (SEC ID N° 90)
<i>hsa</i> -let-7f	5'-ugagguaguag <u>a</u> uuguauaguu-3' (SEC ID N° 91)
<i>hsa</i> -let-7c	5'-ugagguaguagguuguau <u>g</u> uu-3' (SEC ID N° 92)
<i>hsa</i> -let-7e	5'-ugagguag <u>g</u> agguuguauaguu-3' (SEC ID N° 93)

a): La diferencia entre los cuatro miembros estrechamente relacionados de la familia let-7 se indica por letras en negrita.

10 Para ensayar si los cebadores de qPCR para *hsa*-let-7a detectan los miR con una diferencia de un único nucleótido, se realizó el siguiente experimento de qPCR específico de miR:

Se mezclaron en hielo:

Mezcla RT:

- 1 µl de tampón PAP 10x (Epicentre Biotechnologies, Madison, WI, EEUU)
- 1 µl de ATP 1 mM
- 1 µl de cebador RT 10 µM (L2TA: 5'-ggtagtagttttttttttvn (SEC ID N° 5), v indica c, g y a, n indica c, g, a y t)
- 1 µl de mezcla de dATP 1 mM, dCTP 1 mM, dGTP 1 mM, dTTP 1 mM
- 0,5 µl de 2 unidades/µl de Transcriptor (Roche Diagnostics A/S, Hvidovre, Dinamarca, cat n° 03 531 295 001).
- 0,2 µl (5 U/µl) de poli(A) polimerasa (Epicentre)
- 4,5 µl de agua

Se prepararon las siguientes muestras y se incubaron a 42°C, 1 hora seguido de 95°C, 5 minutos:

Molde sintético	Mezcla RT
1 µl de ARN de fago MS2 a 10 ng/µl en TE	9 µl
1 µl 10 ⁸ copias de hsa-let-7a ¹	9 µl
1 µl 10 ⁸ copias de hsa-let-7f ¹	9 µl
1 µl 10 ⁸ copias de hsa-let-7c ¹	9 µl
1 µl 10 ⁸ copias de hsa-let-7e ¹	9 µl

¹Los moldes sintéticos se prepararon en 10 ng/µl de ARN de fago MS2 en TE. Los moldes sintéticos se obtienen de Integrated DNA technologies Inc., Coralville, IA, EEUU.

Para qPCR se usó 1 µl de la reacción de adición de cola poliA/RT para cada reacción de PCR con el cebador directo de *hsa-let-7a* 5'-tGaGtagtaggttg (SEC ID N° 7) y el cebador inverso 5'-cggagtagtagtttttttttAactat (SEC ID N° 94).

La PCR a tiempo real se hizo en un termociclador ABI 7500 controlando la fluorescencia de verde SYBR® como una función del número de ciclos de PCR. La mezcla de reacción de PCR contenía:

- 10 µl de mezcla maestra de PCR 2x (Roche cat n° 04 673 484 001)
- 1 µl o menos de la reacción RT
- 1 µl de TE con cebador directo específico de miR 2,5 µM y cebador inverso específico de miR 2,5 µM
- agua hasta 20 µl.

La mezcla se incubó a 95°C durante 10 min seguido de 40 ciclos de 95°C durante 5 segundos; 60°C durante 60 segundos con medición de la fluorescencia.

La amplificación del producto correcto se midió comparando el perfil de la curva de fusión del producto de PCR con el perfil de la curva de fusión de un producto de PCR obtenido por amplificación de un molde sintético.

El resultado del experimento de la PCR a tiempo real se analizó de acuerdo con procedimientos convencionales (Bustin, SA (ed.) "A-Z of Quantitative PCR." International University Line (La Jolla, California, EEUU), 2004).

El resultado se muestra en la tabla 6 y como diagramas de amplificación en la Figura 4.

Tabla 6:

Molde	Ct	% de señal en molde de hsa-let-7a ²
10 ng/µl de ARN de fago MS2	nd ¹	0
<i>hsa-let-7a</i>	25	100
<i>hsa-let-7f</i>	38	0,01
<i>hsa-let-7c</i>	30	4
<i>hsa-let-7e</i>	nd	0

¹nd, no detectado
²El porcentaje de señal se calculó como $100/2^{(C_T(\text{molde})-C_T(\text{hsa-let-7a}))}$ suponiendo una eficacia de amplificación de 100.

Ejemplo 5: cuantificación de miR en ARN total de cerebro humano

En este ejemplo se determinó el número de copias de miR *hsa-let-7a*, *hsa-miR-21*, *hsa-miR-27b* y *hsa-miR-195* en

ARN de cerebro humano total (Ambion).

Se mezclaron en hielo:

Mezcla RT:

- 1 µl de tampón PAP 10x (New England Biolabs)
- 1 µl de ATP 1 mM
- 1 µl cebador RT 10 µM (L2TA: 5'-ggtagctagtttttttttt1tvn (SEC ID N° 5), v indica restos de citosina, guanina y adenina, n indica restos de citosina, guanina, adenina y timina)).
- 1 µl de mezcla de dATP 1 mM, dCTP 1 mM, dGTP 1 mM, dTTP 1 mM
- 0,5 µl de 2 unidades/µl de Transcriptor (Roche cat n° 03 531 295 001, Roche Diagnostics A/S, Hvidovre, Dinamarca).
- 0,5 µl (SU/µl) de poli(A) polimerasa (New England Biolabs Inc., Ipswich, MA, EEUU)
- 3 µl de agua

Se prepararon las siguientes muestras y se incubaron a 42°C, 1 hora seguido de 95°C, 5 minutos:

Molde sintético/agua	ARN de fago MS2 en TE (10 ng/µl)	ARN de cerebro humano (10 ng/µl)	Mezcla RT
1 µl de agua	1 µl		8 µl
1 µl ~ 10 ² copias	1 µl		8 µl
1 µl ~ 10 ³ copias	1 µl		8 µl
1 µl ~ 10 ⁴ copias	1 µl		8 µl
1 µl ~ 10 ⁵ copias	1 µl		8 µl
1 µl ~ 10 ⁶ copias	1 µl		8 µl
1 µl ~ 10 ⁷ copias	1 µl		8 µl
1 µl ~ 10 ⁸ copias	1 µl		8 µl
1 µl ~ 10 ⁹ copias	1 µl		8 µl
1 µl de agua		1 µl	8 µl

- 15 Molde sintético: Cantidades iguales (número de copias) de *hsa-let-7a*, *hsa-miR-21*, *hsa-miR-27b* y *hsa-miR-195* sintéticos en 10 ng/µl de ARN de fago MS2 en TE (obtenido de Integrated DNA technologies Inc).

TE: Tris/HCl 10 mM (pH 8,0), EDTA 1 mM.

Para la qPCR se usó 1 µl de la reacción de adición de cola poliA/RT para cada reacción de PCR con los cebadores específicos de gen:

Tabla 7:

miR	Cebador directo 5' → 3	Cebador inverso 5' → 3
<i>hsa-let-7a</i>	tGaGgtagtaggttg (SEC ID N° 7)	tgacacggaggtagttagttttttttttAactat (SEC ID N° 94)
<i>hsa-miR-21</i>	tAgmCttatcagactgatg (SEC ID N° 13)	gcggtgacacggaggtagttagttttttttttmCaac (SEC ID N° 15)
<i>hsa-miR-27b</i>	tCamCagtggctaag (SEC ID N° 95)	tgacacggaggtagttagttttttttttGcaga (SEC ID N° 96)
<i>hsa-miR-195</i>	ctgtaGcaGcacagaa (SEC ID N° 97)	tgacacggaggtagttagttttttttttGccaat (SEC ID N° 98)

20 La PCR a tiempo real se hizo en un termociclador ABI 7500® controlando la fluorescencia de verde SYBR® como una función del número de ciclos de PCR. La mezcla de reacción de PCR contenía:

- 10 µl de mezcla maestra de PCR 2x (Roche cat nº 04 673 484 001)
- 1 µl o menos de la reacción RT
- 1 µl de TE con cebador directo específico de miR 2,5 µM y cebador inverso específico de miR 2,5 µM
- agua hasta 20 µl.

5 La mezcla se incubó a 95°C durante 10 min seguido de 40 ciclos de 95°C durante 5 segundos; 60°C durante 60 segundos con medición de la fluorescencia.

La amplificación del producto correcto se midió comparando el perfil de la curva de fusión del producto de PCR con el perfil de la curva de fusión de un producto de PCR obtenido por amplificación de un molde sintético.

10 Para cada miR, el resultado del experimento de PCR a tiempo real se analizó de acuerdo con procedimientos convencionales (Bustin, SA (ed.) "A-Z of Quantitative PCR." International University Line (La Jolla, California, EEUU)" 2004) y se usaron los valores Ct de las muestras sin ARN de cerebro humano para construir curvas patrón.

El Ct de la muestra con ARN de cerebro humano se comparó con la curva patrón para determinar la cantidad de miR en la muestra (Bustin, SA (ed.) "A-Z of Quantitative PCR." International University Line (La Jolla, California, EEUU), 2004).

15 Resultados:

Tabla 8:

miR	Copias por 10 pg de ARN de cerebro
<i>hsa-let-7a</i>	16000
<i>hsa-miR-21</i>	400
<i>hsa-miR-27b</i>	400
<i>hsa-miR-195</i>	1000

Ejemplo 6: diseño de ensayos de qPCR de premiR

Este ejemplo muestra que el ensayo de *hsa-miR-10a* no detecta el correspondiente premiR, *hsa-premiR-10a*. Asimismo, es posible usar el diseño de cebador para preparar un ensayo que detecte *hsa-premiR-10a* pero no *hsa-miR-10a*. Se mezclaron en hielo:

Mezcla RT:

- 1 µl de tampón PAP 10x (New England Biolabs)
- 1 µl de ATP 1 mM
- 1 µl de cebador RT 10 µM (L2TA: 5'ggtagctagttttttttttvn (SEC ID N° 5), v indica restos de citosina, guanina y adenina, n indica restos de citosina, guanina, adenina y timina)).
- 1 µl de mezcla de dATP 1 mM, dCTP 1 mM, dGTP 1 mM, dTTP 1 mM
- 0,5 µl de 2 unidades/µl de Transcriptor (Roche cat nº 03 531 295 001).
- 0,5 µl (5 U/µl) de poli(A) polimerasa (New England Biolabs)
- 3 µl de agua

30 Se prepararon las siguientes muestras y se incubaron a 42°C, 1 hora seguido de 95°C, 5 minutos:

muestra de ARN	mezcla RT
1 µl ~ agua	9 µl
1 µl ~ 10 ⁶ copias de <i>hsa-miR-10a</i>	9 µl
1 µl ~ 10 ⁶ copias de <i>hsa-premiR-10a</i>	9 µl

Para qPCR se usó 1 µl de la reacción de adición de cola poliA/RT para cada reacción de PCR con los cebadores específicos de la Tabla 9.

^aMezcla de 1 µl de 1 µg/µl de ARN de corazón, 1 µl de 1 µg/µl de ARN de cerebro, 1 µl de 1 µg/µl de ARN de hígado, 1 µl de 1 µg/µl de ARN de pulmón, 1 µl de 1 µg/µl de ARN de riñón, 1 µl de 1 µg/µl de ARN linfóide, 1 µl de 1 µg/µl de ARN de yeyuno, 1 µl de 1 µg/µl de ARN de colon, 1 µl de 1 µg/µl de ARN de mama y 1 µl de 1 µg/µl de ARN de leucemia en TE.

5 Tampón TE: Tris/HCl 10 mM (pH 8,0), EDTA 1 mM.

Para qPCR se usó 1 µl de la reacción de adición de cola poliA/RT para cada reacción de PCR con los cebadores específicos de la Tabla 11.

Tabla 11:

Diana	Cebador directo 5' → 3	Cebador inverso 5' → 3
<i>hsa-miR-10a</i>	tAccctGtagatccgaa (SEC ID N° 99)	tgacacggaggtagctagttttttttttmCacaaat (SEC ID N° 100)
<i>hsa-premiR-10a</i>	tgtGtaaggaattttgtgt (SEC ID N° 101)	gaggtagctagtttttttttttAttc (SEC ID N° 102)

10 La PCR a tiempo real se hizo en un termociclador ABI 7500 controlando la fluorescencia de verde SYBR® como una función del número de ciclos de PCR. La mezcla de reacción de PCR contenía:

- 10 µl de mezcla maestra de PCR 2x (Roche cat n° 04 673 484 001)
- 1 µl o menos de la reacción RT
- 1 µl de TE con cebador directo específico de miR 2,5 µM y cebador inverso específico de miR 2,5 µM
- agua hasta 20 µl.

15 La mezcla se incubó a 95°C durante 10 min seguido de 40 ciclos de 95°C durante 5 segundos; 60°C durante 60 segundos con medición de la fluorescencia.

Para cada miR, el resultado del experimento de PCR a tiempo real se analizó de acuerdo con procedimientos convencionales (Bustin, SA (ed.) "A-Z of Quantitative PCR." International University Line, 2004). El resultado se muestra en la tab. 12.

Tabla 12:

ARN	Ensayo de <i>hsa-miR10a</i>	Ensayo de <i>hsa-premiR10</i>
control negativo	por debajo de la detección	por debajo de la detección
ARN total	C _T = 26,22	C _T = 37,25
<i>hsa-miR10a</i>	C _T = 28,83	no ensayado
<i>hsa-premiR10a</i>	no ensayado	C _T = 32,59

20 El resultado muestra que la muestra de ARN total contiene más de 10⁶ copias de *hsa-miR-10a* porque el C_T está por debajo del C_T de la muestra con 10⁶ copias de *hsa-miR-10a* mientras que la muestra de ARN total contiene menos de 10⁶ copias de *hsa-premiR-10a* porque el C_T está por debajo del C_T de la muestra con 10⁵ copias de *hsa-premiR-10a*.

25 **Ejemplo 8: detección específica de pre-miARN**

Objetivo del experimento: Determinar si la metodología de PCR cuantitativa con transcriptasa inversa universal (UniRT qPCR) descrita en esta solicitud podría usarse para detectar pre-miR específicamente sin co-detección del correspondiente miR maduro.

30 **Material:** Se seleccionaron ARN de miR 203 (5'- gugaauuuuaggaccacuag) (SEC ID N° 103) y ARN de pre-miR 203 (5'- agugguucuuuacagucaacaguucuguagcgcaauugugaaauguuuaggaccacuag) (SEC ID N° 104) sintéticos como objetos de ensayo. Los ARN sintéticos se sintetizaron por Integrated DNA technologies Inc., Coralville, IA, EEUU. Los ARN se diluyeron a 1*10⁶ moléculas/µl en TEMS2 (tampón TE (Tris HCl 10 mM pH 8, y EDTA 0,1 mM mezclados con 10 ng/µl de ARN viral MS2 (Roche Applied Science Inc). Los cebadores usados fueron miR-203.Rev (5'-tgacacggaggtagctagtttttttttttCtag) (SEC ID N° 105), miR-203.Fwd (5'- gtGaaatGtttaggacca) (SEC ID N° 106) y pre-miR- 203.Fwd (5'-cagttcaacagttctgtagc) (SEC ID N° 107). El cebador pre-miR-203 Fwd se diseñó en la estructura de bucle de la molécula pre-miR-203. El molde de miR-203 maduro y pre-miR-203 se sometieron a transcripción

inversa usando kit universal de síntesis de ADNc (Exiqon AS, Cat. nº 203300). Se mezclan:

- ARN sintético 1×10^6 moléculas
- Tampón de reacción UniRT 5 x 2 μ l
- Mezcla de enzimas 10x 1 μ l
- Agua hasta 10 μ l

Se incubó a 42°C durante 60 minutos y se desnaturaliza por calor a 85°C durante 5 minutos. Se diluye 10 x en agua.

qPCR con mezcla maestra de verde SYBR, UniRT (Exiqon AS, Cat. nº 203400)

Se mezcla:

- Mezcla de cebadores (3 uM cada uno) 1 μ l
- Mezcla maestra de verde SYBR 5 μ l
- Molde de ADNc 1 μ l
- Agua 3 μ l

Se usaron dos mezclas de cebadores: 1) miR-203 ((cebador miR-203.Fwd y miR-203.Rev) y 2) pre-miR-203 (cebador pre-miR-203.Fwd y miR-203.Rev). Los moldes usados fueron mir-203 y pre-mir-203. También se ejecutó qPCR de control sin molde (NTC) para cada ensayo de PCR. Todas las qPCR se hicieron por duplicado.

Las reacciones de q-RT-PCR se realizaron en una placa de 384 pocillos en un instrumento LightCycler 480 (Roche Diagnostics) usando el siguiente protocolo de PCR

1. 95°C durante 10 minutos
2. 95°C durante 10 segundos
3. 60°C durante 1 minuto

Configuración de detección de señal con verde SYBR (colorante HRM). Se repiten las etapas 2-3 para 45 veces seguidas de análisis de curva de fusión.

Resultados y discusión

Los cebadores convencionales de miR-203 detectan el molde de miR-203 bien con un valor Cp de 28,86. Además el ensayo de miR-203 detecta parcialmente el pre-miR-203 (Cp de 30,125) ya que el miR está localizado en el extremo 3' del pre-mir-203. El diseño de ensayo de pre-miR-203 detecta el pre-miR con los valores Cp de 25,7 sin embargo el miR-203 maduro no se detecta con el ensayo específico de pre-miR-203 (Cp=40). Estos datos muestran claramente que pueden diseñarse ensayos específicos de pre-mir para dirigir específicamente las moléculas de pre-miR.

Tabla 13: Detección de pre-miR-203 y miR-203 usando cebador específico de miR y cebadores específicos de pre-mir.

Molde	Ensayo	Cp medio	Porcentaje de detección
NTC	miR-203		
miR-203	miR-203	28,86	100,0
pre-miR-203	miR-203	30,125	41,6
NTC	Pre-miR-203		
miR-203	Pre-miR-203	40	0,0
Dre-miR-203	Pre-miR-203	25,675	100

Cp medio representa un valor medios de una reacción duplicada de qPCR. El porcentaje de detección se estima como $a = 100/POW-ER(2;(Cp_test-Cp_ref))$ donde Cp_ref es el correspondiente valor Cp del molde y la serie de cebadores.

Ejemplo 9: micro-ARN expresados de forma diferencial en tejidos de corazón e hígado

El objetivo del experimento es determinar si los miARN bien expresados que se expresan de forma diferencial entre tejido de corazón e hígado pueden discriminarse usando una serie de qPCR basada en el procedimiento de PCR cuantitativa con transcriptasa inversa universal (UniRT qPCR) con verde SYBR de la presente invención.

Materiales y procedimientos

5 Se obtuvo ARN total de hígado y corazón completo de Ambion Inc., y se diluyó en agua sin nucleasa a una concentración de 10 ng/μl y se almacenó a -80°C. Se seleccionaron unos pocos miARN que se sabe que se expresan de forma diferencial en muestras tisulares de corazón e hígado a partir de la bibliografía (véase por ejemplo: Liang, Y., y col. (2007) BMC Genomics. 8: pág. 166 y Landgraf P., y col. (2007) Nature Biotechnol. (9): pág. 996-7). Los miR seleccionados fueron hsa-miR-1, hsa-miR-126 y hsa-miR-133b (corazón) y hsa-miR-192, hsa-miR-122*, hsa-miR-194 y hsa-miR-122 (hígado).

Tabla 14: Secuencias cebadoras para siete ensayos de miR. Las letras en mayúscula representan nucleótidos de LNA.

Ensayo	Cebador inverso (5 → 3)	SEC ID N°	Cebador directo (5 → 3)	SEC ID N°
hsa-miR-122	tqacacggaggtactagtttttttttttCaaacac	108	tGgaGtgtgacaatg	115
hsa-miR-194	gtactagtttttttttttCcaca	109	tGtaaCagcaactcca	116
hsa-miR-122*	gagggtactagtttttttttttAtttag	110	aAcgccAtTatcacact	117
hsa-miR-192	gtactagtttttttttttGgct	111	tgactGacCtatgaattgac	118
hsa-miR-126	gtactagtttttttttttTcgcat	112	ctgtCgtaccgtgagta	119
hsa-miR-133b	tgacacgqaggtactagtttttttttttAgctg	113	tTtGgtccccttcaa	120
hsa-miR-1	tqacacgqaqqtactarlttttttttttttAtacata	114	ctgtGgAatgtaaagaagt	121
Las letras mayúsculas representan nucleótidos de LNA.				

10 Las reacciones RT se realizaron por triplicado para cada tejido y control sin enzima (NEC) con kit de síntesis de ADNc universal (Exiqon AS, Cat. n° 203300)

- ARN total 20 ng
- Tampón de reacción UniRT 5 x 4 μl
- Mezcla de enzimas 2 μl
- Agua hasta 20 μl

15 Se incubó a 42°C durante 60 minutos y se desnaturaliza por calor a 85°C durante 5 minutos. Se diluye el ADNc 1/100 en agua sin nucleasa.

La reacción en cadena de la polimerasa cuantitativa (q-PCR), etapa 2 del protocolo, se realizó del siguiente modo:

20 Se mezclaron 5 μl de ADNc diluido con 5 μl de mezcla maestra de verde SYBR, UniRT (Exiqon AS, Cat. N° 203400) en la placa de 384 pocillos con series de cebadores desecados de siete ensayos de miR descritos a continuación. La placa se selló y se puso directamente en el LightCycler para amplificación y análisis.

Las reacciones de q-RT-PCR se realizaron en un LightCycler 480 (Roche Diagnostics) usando el siguiente protocolo de PCR:

1. 95°C durante 10 minutos
2. 95°C durante 10 segundos
- 25 3. 60°C durante 1 minuto

Configuración de detección de señal con verde SYBR (colorante HRM). Se repiten las etapas 2-3 para 45 veces seguidas de análisis de curva de fusión.

El análisis de datos convencional se realizó sobre los datos sin procesar del LC480 usando el software de análisis de datos suministro (Roche Diagnostics). Los valores Cp se recogieron como Abs Cuant./Máx. segundas derivadas.

30 Para este experimento de análisis en los ejemplos de genes bien expresados de miARN tanto de hígado como de corazón, se usó una media de valores Cp de datos sin procesar sin normalización o calibración. Esto se hizo ya que la normalización entre tejidos no es un medio muy preciso para estimar los miR de diferentes fuentes. Entonces se compara la diferencia entre los dos tejidos en términos de Δ de valores Cp. Obsérvese que una diferencia de 1 en el valor Cp representa una diferencia de aproximadamente dos veces en la expresión.

35

Resultados y discusión

Los inventores seleccionaron un total de 7 miARN que sabían previamente, r de la bibliografía, que se expresan de forma diferencial entre tejido de corazón e hígado. Los resultados se muestran en la tabla 15 y Fig. 7. Los datos obtenidos mostraron que los tres genes miR-1, miR-133b y 126 están todos mostrando expresión mucho más elevada en muestras de corazón que en muestras de hígado. Asimismo los miR-192, miR-194 y miR-122 y 122* están mostrando expresión mucho más elevada en hígado que en corazón. La diferencia está variando de 2,6 a 12,9 Cp que corresponde a un intervalo de 5 veces a más de 1000 veces de diferencia en la expresión. En general, los miR expresados de forma diferencial descritos a partir de la bibliografía se distinguen fácilmente por la plataforma de expresión UniRT usando los ensayos aquí descritos.

Tabla 15: Valores de expresión para los 7 miR seleccionados y ensayados en la plataforma UniRT.

Nombre de miR	Corazón (Cp medio)	Hígado (Cp medio)	Δ Cp
hsa-miR-1	20,9	33,9	12,9
hsa-miR-133b	22,0	34,7	12,7
hsa-miR-126	22,5	25,1	2,6
hsa-miR-192	31,6	25,3	-6,3
hsa-miR-122*	37,6	30,0	-7,5
hsa-miR-194	32,3	25,9	-6,4
hsa-miR-122	31,8	21,1	-10,8

Los valores Δ Cp positivos representan una expresión en exceso en corazón y Cp negativos representan expresión en exceso en el hígado.

Ejemplo 10: comparación de ensayos específicos de miR diseñados en la presente invención para procedimiento competitivo usando cebadores de ADN puros

El diseño basado en LNA descrito en la presente invención se comparó con un producto comercial basado en ADN, el kit de transcripción inversa miScript (Qiagen, Cat. n° 218060, QIAGEN GmbH, Hilden, Alemania). Este producto basado en ADN también se basa en una etapa de 3'- poliadenilación del miARN seguida de transcripción inversa con un cebador poli dT basado en ADN donde ambas reacciones suceden en una reacción de un tubo. Como estos dos procedimientos usan las mismas etapas enzimáticas, una comparación ilustra muy bien las sorprendentes ventajas del presente procedimiento basado en LNA ya que el miScript no incluye LNA en los cebadores. Otra diferencia es que el miScript usa un cebador inverso específico para la marca universal añadida con el cebador RT mientras que el cebador inverso basado en LNA del presente procedimiento es específico para el miARN que se está detectando.

Tabla 16: Secuencias de nucleótidos de miARN comparados

miR	Secuencia	SEC ID N°	miR gc%	miR Tm
<i>hsa-let-7a</i>	5'-ugagguaguagguuguauaguu-3'	90	36	50
<i>hsa-miR-143</i>	5'-ugagaugaagcacuguagcuc-3'	122	39	54
<i>hsa-miR-155</i>	5'-uuaaugcuaaucgugauaggggu-3'	123	47	54
<i>hsa-mir-1</i>	5'-uggaauguaaagaaguau-3'	124	27	47

Primera etapa

La transcripción inversa se realizó en una serie de dilución de diana de miARN sintético (obtenido de Integrated DNA technologies Inc., Coralville, IA, EEUU), con un fondo de 10 ng/μl de ARN de bacteriófago MS2 (Roche Applied Science, Catálogo número 10165948001), usando kit de síntesis de ADNc universal (Exiqon A/S, Vedbaek, Dinamarca., Prod. N° 203300) o kit de transcripción inversa miScript (Qiagen, Cat. n° 218060, QIAGEN GmbH, Hilden, Alemania) de acuerdo con las instrucciones del fabricante.

Segunda etapa

Sobre el ADNc obtenido usando el kit de síntesis de ADNc universal (Exiqon, Prod. N° 203300), se realizó qPCR usando mezcla maestra de verde SYBR, RT Universal (Exiqon, Prod. N° 203400) y las series de cebadores descritos en la **Tabla 17**. Sobre el ADNc obtenido usando el kit de transcripción inversa miScript (Qiagen, Cat. n° 218060), se realizó qPCR usando el kit de PCR con verde SYBR miScript (Qiagen, Cat. n° 218073). En ambos casos la amplificación y detección se realizaron en un Roche LC480 LightCycler (Roche Diagnostics A/S, Hvidovre, Dinamarca), usando las condiciones de ciclado indicadas por el fabricante. Cada combinación de ADNc/ensayo se ejecutó por triplicado.

15 Resultados

La Figura 8 muestra los valores Cp por triplicado frente a la concentración de molde obtenidos en el experimento para cada uno de los cuatro miARN ensayados. En los cuatro ensayos comparados, el procedimiento de la presente invención fue más sensible (líneas negras que conectan rombos) que el ensayo miScript (líneas grises que conectan esferas) como se indica por los valores Cp inferiores obtenidos de forma coherente con el ensayo de la presente invención. En el caso de *hsa-let-7a*, hubo una sensibilidad 10 veces mejorada del ensayo de la presente invención, medida como el número de copias más bajo detectado cuantitativamente. Para *hsa-miR-143* y *hsa-miR-155* la diferencia en la sensibilidad fue 100 veces mejor con el ensayo de la presente invención. Para *hsa-miR-1* con un contenido muy bajo de gc (**véase la tabla 16**) y por tanto una baja temperatura de fusión, el ensayo alternativo no fue capaz de detectar el molde incluso a la mayor concentración de ARN. El ensayo diseñado en la presente invención detectó de forma cuantitativa un equivalente de tan poco como 10 copias de miARN en la reacción de PCR. Estos datos muestran claramente que el ensayo de la presente invención es sorprendentemente más sensible. Se atribuye la mejora en la sensibilidad parcialmente al diseño del cebador de extensión que comprende tanto un "secuencia de marca" 5' (R¹) como una "secuencia de anclaje" 3' (R²) y parcialmente al diseño de los cebadores directos e inversos específicos de molde (por ejemplo, específicos de miR) de la reacción de qPCR que incluye LNA. Nuestros resultados indican que el diseño específico de gen de los cebadores directos e inversos permiten detección más sensible que con cebadores de ADN puros usando un cebador inverso universal.

TABLA 18: Secuencias de nucleótidos

Letras minúsculas indican nucleótidos de origen natural, letras mayúsculas indican LNA, mC se refiere a LNA metil citosina. v es un resto de adenina, un resto de guanina, o un resto de citosina y n es un resto de adenina, un resto de guanina, un resto de citosina o un resto de timina.		
Cebador/Nombre de secuencia	Secuencia de nucleótidos (5' → 3')	SEC ID N°
<i>hsa-miR-197</i> ; cebador directo	ttmCaccaccttctcca	1
<i>hsa-miR-197</i> cebador inverso	ctttttttttttGctgggt	2
Cebador inverso secuencia R ³	Tgacacggaggtagt	3
Cebador inverso cola	Tgacacggaggtagtttttttttt	4
L2TA cebador de extensión	Ggtactagttttttttttvn	5
<i>hsa-let-7a</i> molde de ADN	tgcggtgacacggaggtagtttttttttaactatacaacctactacctca	6
<i>hsa-let-7a</i> cebador directo	tGaGgtagtaggtg	7
<i>hsa-let-7a</i> cebador inverso	Cggtgacacggaggtagtttttttttaactata	8
<i>hsa-let-7a</i> cebador inverso	cggtgacacggaggtagtttttttttCtata	9
<i>hsa-miR-16</i> cebador directo	tAgmCagcacgtaaa	10
<i>hsa-miR-16</i> cebador inverso	cacggaggtagtttttttttcgccaat	11

ES 2 541 356 T3

(continuación)

Letras minúsculas indican nucleótidos de origen natural, letras mayúsculas indican LNA, mC se refiere a LNA metil citosina. v es un resto de adenina, un resto de guanina, o un resto de citosina y n es un resto de adenina, un resto de guanina, un resto de citosina o un resto de timina.

Cebador/Nombre de secuencia	de Secuencia de nucleótidos (5' → 3)	SEC ID N°
<i>hsa</i> -miR-15 cebador inverso	cacggaggtagtactagttttttttttCgccaat	12
<i>hsa</i> -miR-21 cebador directo	tAgmCttatcagactgatg	13
<i>hsa</i> -miR-21 cebador inverso	gcggtgacacggaggtagtactagttttttttttcaac	14
<i>hsa</i> -miR-21 cebador inverso	gcggtgacacggaggtagtactattttttttttmCaac	15
<i>hsa</i> -miR-23a cebador directo	atmCamCattgccag	16
<i>hsa</i> -miR-23a cebador inverso	tgacacggaggtagtactagtttttttttttgaaatc	17
<i>hsa</i> -miR-23a cebador inverso	tgacacggaggtagtactagttttttttttGgaaatc	18
<i>hsa</i> -miR-150 cebador directo	tmCtmCccaaccctg	19
<i>hsa</i> -mir-150 cebador inverso	tgacacggaggtagtactagttttttttttmCactggta	20
<i>hsa</i> -miR-150 cebador inverso	tgacacggaggtagtactagttttttttttcactggta	21
<i>hsa</i> -miR-208a cebador directo	ataaGamCgAgcaaaaag	22
<i>hsa</i> -miR-208a cebador inverso	mCggtgacacggaggtagtactagttttttttttacaagc	23
<i>hsa</i> -miR-208a cebador inverso	cggtgacacggaggtagtactagttttttttttAcaagc	24
<i>hsa</i> -miR-208a cebador inverso	cggtgacacggaggtagtactagttttttttttTacaagc	25
<i>hsa</i> -miR-124 cebador directo	taaGgcacgcggtga	26
<i>hsa</i> -miR-9 cebador directo	ctgtmCtttGgttatctag	27
<i>hsa</i> -miR-181a cebador directo	aamCattmCaacgctgt	28
<i>hsa</i> -miR-128 cebador directo	tmCamCagtgaaccggt	29
<i>hsa</i> -miR-488 cebador directo	ttGaaaGgctatttc	30
<i>hsa</i> -miR-328 cebador directo	ctggccctctctgcc	31
<i>hsa</i> -miR-324 cebador directo	cgcaccccctagggcat	32
<i>hsa</i> -miR-331 cebador directo	cTaGgtatggtcca	33
<i>hsa</i> -miR-34a cebador directo	tGgcAgtgtcttagc	34
<i>hsa</i> -miR-130a cebador directo	caGtGcaatgttaaag	35
<i>hsa</i> -miR-1 cebador directo	tGgAatgtaaagaagt	36
<i>hsa</i> -miR-23b cebador directo	atmCamCattgccag	37
<i>hsa</i> -miR-133a cebador directo	tTtGgtcccctcaa	38
<i>hsa</i> -miR-133b cebador directo	tTtGgtcccctcaa	39
<i>hsa</i> -miR-93 cebador directo	cAaaGtgctgtctg	40

ES 2 541 356 T3

(continuación)

Letras minúsculas indican nucleótidos de origen natural, letras mayúsculas indican LNA, mC se refiere a LNA metil citosina. v es un resto de adenina, un resto de guanina, o un resto de citosina y n es un resto de adenina, un resto de guanina, un resto de citosina o un resto de timina.

Cebador/Nombre de secuencia	de	Secuencia de nucleótidos (5' → 3)	SEC ID N°
<i>hsa-miR-181b</i> cebador directo		aarnCattrnCattgctgtc	41
<i>hsa-miR-24</i> cebador directo		tGgctmCagttcagca	42
<i>hsa-miR-124</i> cebador inverso		tgacacggaggtagtgtttttttttTggcat	43
<i>hsa-miR-9</i> cebador inverso		tgacacggaggtagtgtttttttttmCatacag	44
<i>hsa-miR-181a</i> cebador inverso		tgacacggaggtagtgttttttttttamCtcac	45
<i>hsa-miR-128</i> cebador inverso		tgacacggaggtagtgttttttttttAaagaga	46
<i>hsa-miR-488</i> cebador inverso		tgacacggaggtagtgttttttttttGacca	47
<i>hsa-miR-328</i> cebador inverso		tgacacggaggtagtgttttttttttAcggaa	48
<i>hsa-miR-324</i> cebador inverso		tgacacggaggtagtgttttttttttAcacca	49
<i>hsa-miR-331</i> cebador inverso		tgacacggaggtagtgttttttttttGgatc	50
<i>hsa-miR-34a</i> cebador inverso		tgacacggaggtagtgttttttttttamCaacca	51
<i>hsa-miR-130a</i> cebador inverso		tgacacggaggtagtgttttttttttAtgc	52
<i>hsa-miR-1</i> cebador inverso		tgacacggaggtagtgttttttttttAtacata	53
<i>hsa-miR-23b</i> cebador inverso		tgacacggaggtagtgttttttttttggTaatc	54
<i>hsa-miR-133a</i> cebador inverso		tgacacggaggtagtgttttttttttGagctg	55
<i>hsa-miR-133b</i> cebador inverso		tgacacggaggtagtgttttttttttAgctg	56
<i>hsa-miR-93</i> cebador inverso		tgacacggaggtagtgttttttttttmCtacctg	57
<i>hsa-miR-181b</i> cebador inverso		tgacacggaggtagtgttttttttttAccca	58
<i>hsa-miR-24</i> cebador inverso		tgacacggaggtagtgtttttttttmCtgttc	59
<i>hsa-miR-146b</i> cebador directo		ctgtGagaactgaattcca	60
<i>hsa-miR-146b-3p</i> cebador directo		tgccctgtggactca	61
<i>hsa-miR-429</i> cebador directo		ctgtaatamCtGtctggta	62
<i>hsa-miR-193a-3p</i> cebador directo		aactggcctacaaagtcc	63
<i>hsa-miR-193a</i> cebador directo		gtctttgctggcgca	64
<i>hsa-miR-193b</i> cebador directo		aamCtggccctcaaag	65
<i>hsa-miR-149</i> cebador directo		tmCtggcTccgtgtcttca	66
<i>hsa-miR-452</i> cebador directo		aamCtGttgcagaggaa	67
<i>hsa-miR-452*</i> cebador directo		ctmCatmCtgcaaagaagta	68
<i>hsa-miR-30b</i> cebador directo		tGtaaamCatcctacactc	69

ES 2 541 356 T3

(continuación)

Letras minúsculas indican nucleótidos de origen natural, letras mayúsculas indican LNA, mC se refiere a LNA metil citosina. v es un resto de adenina, un resto de guanina, o un resto de citosina y n es un resto de adenina, un resto de guanina, un resto de citosina o un resto de timina.

Cebador/Nombre de secuencia	de	Secuencia de nucleótidos (5' → 3)	SEC ID N°
<i>hsa-miR-34b</i> cebador directo		ctgcaatcactaactccact	70
<i>hsa-miR-34c</i> cebador directo		aggcaGtgtagtagctg	71
<i>hsa-miR-134</i> cebador directo		tgtgactggtgaccaga	72
<i>hsa-miR-671</i> cebador directo		ctgaGgaagccctgga	73
<i>hsa-miR-769-3p</i> cebador directo		ctgggatctccggggtct	74
<i>hsa-miR-146b</i> cebador inverso		cgtagtagttttttttttAgcct	75
<i>hsa-miR-146b-3p</i> cebador inverso		gtactagttttttttttmCcagaac	76
<i>hsa-miR-429</i> cebador inverso		gtactagttttttttttAcggtt	77
<i>hsa-miR-193a-3p</i> cebador inverso		gtactagttttttttttamCtgg	78
<i>hsa-miR-193a</i> cebador inverso		ggtactagtttttttttrnCatct	79
<i>hsa-miR-193b</i> cebador inverso		gaggtagtagttttttttttmCatct	80
<i>hsa-miR-149</i> cebador inverso		tagtttttttttttgggAgtg	81
<i>hsa-miR-452</i> cebador inverso		gtactagttttttttttmCagtt	82
<i>hsa-miR-452*</i> cebador inverso		gtactagttttttttttmCactt	83
<i>hsa-miR-30b</i> cebador inverso		gtactagttttttttttaGctga	84
<i>hsa-miR-34b</i> cebador inverso		gaggtagtagttttttttttAtgg	85
<i>hsa-miR-34c</i> cebador inverso		tactagttttttttttGcaatca	86
<i>hsa-miR-134</i> cebador inverso		gtactagttttttttttTcccct	87
<i>hsa-miR-671</i> cebador inverso		gtactagttttttttttmCtcca	88
<i>hsa-miR-769-3p</i> cebador inverso		aggtagtagttttttttttAacca	89
<i>hsa-let-7a</i>		ugagguaguagguuguauaguu	90
<i>hsa-let-7f</i>		ugagguaguagauuguauaguu	91
<i>hsa-let-7c</i>		ugagguaguagguuguauaguu	92
<i>hsa-let-7e</i>		ugagguaggagguuguauaguu	93
<i>hsa-let-7a</i> cebador inverso		cggaggtactagttttttttttAactat	94
<i>hsa-miR-27b</i> cebador directo		ttmCamCagtggctaag	95
<i>hsa-miR-27b</i> cebador inverso		tgacacggaggtactagttttttttttGcaga	96
<i>hsa-miR-195</i> cebador directo		ctgtaGcaGcacagaa	97

ES 2 541 356 T3

(continuación)

Letras minúsculas indican nucleótidos de origen natural, letras mayúsculas indican LNA, mC se refiere a LNA metil citosina. v es un resto de adenina, un resto de guanina, o un resto de citosina y n es un resto de adenina, un resto de guanina, un resto de citosina o un resto de timina.

Cebador/Nombre de secuencia	de	Secuencia de nucleótidos (5' → 3)	SEC ID N°
<i>hsa</i> -miR-195 cebador inverso		tgacacggaggtagtactagttttttttttGccaat	98
<i>hsa</i> -miR-10a cebador directo		tAccctGtagatccgaa	99
<i>hsa</i> -miR-10a cebador inverso		tgacacggaggtagtactagttttttttttmCacaaat	100
<i>hsa</i> -pre-miR-10a cebador directo		tgtGtaaggaattttgtggt	101
<i>hsa</i> -pre-miR-10a cebador inverso		gaggtagtactagtttttttttttAttc	102
Has-miR-203 ARN		gugaaauguuuaggaccacuag	103
Pre-miR-203 ARN		agugguucuuaacaginjcaacaguucuguagcgcaauugugaaauguuuaggaccacuag	104
<i>hsa</i> -miR-203 cebador inverso		tgacacggaggtagtactagtttttttttttCtag 9	105
<i>hsa</i> -miR-203 cebador directo		gtGaaatGtttaggacca	106
<i>hsa</i> -pre-miR-203 cebador directo		cagttcaacagtctgtagc	107
<i>hsa</i> -miR-122 cebador inverso		tgacacggaggtagtactagtttttttttttCaaacac	108
<i>hsa</i> -miR-194 cebador inverso		gtactagtttttttttttCcaca	109
<i>hsa</i> -miR-122* cebador inverso		gaggtagtactatttttttttttAttag	110
<i>hsa</i> -miR-192 cebador inverso		gtactagtttttttttttGgct	111
<i>hsa</i> -miR-126 cebador inverso		gtactagtttttttttttTcgcat	112
<i>hsa</i> -miR-133b cebador inverso		tgacacggaggtagtactagtttttttttttAgctg	113
<i>hsa</i> -miR-1 cebador inverso		tgacacggaggtagtactagtttttttttttAtacata	114
<i>hsa</i> -miR-122 cebador directo		tGgaGtgtgacaatg	115
<i>hsa</i> -miR-194 cebador directo		tGtaaCagcaactcca	116
<i>hsa</i> -miR-122* cebador directo		aAcgccAtTatcacact	117
<i>hsa</i> -miR-192 cebador directo		tgactGacCtatgaattgac	118
<i>hsa</i> -miR-126 cebador directo		ctgtCgtaccgtgagta	119
<i>hsa</i> -miR-133b cebador directo		tTtGgtcccctcaa	120
<i>hsa</i> -miR-1 cebador directo		ctgtGgAatgtaaagaagt	121
<i>hsa</i> -miR-143		5'-ugagaugaagcacuguagcuc-3'	122
<i>hsa</i> -miR-155		5'-uuaaugcuaaacugugauaggggu-3'	123
<i>hsa</i> -mir-1		5'-uggaauguaaagaaguau-3'	124
<i>hsa</i> -miR-143 cebador directo		tGaGatgaagcactg	125

(continuación)

Letras minúsculas indican nucleótidos de origen natural, letras mayúsculas indican LNA, mC se refiere a LNA metil citosina. v es un resto de adenina, un resto de guanina, o un resto de citosina y n es un resto de adenina, un resto de guanina, un resto de citosina o un resto de timina.

Cebador/Nombre de secuencia	de Secuencia de nucleótidos (5' → 3)	SEC ID N°
<i>hsa-miR-143</i> cebador inverso	tgacacggagggtactagtttttttttttGagcta	126
<i>hsa-miR-155</i> cebador directo	gacttaaTgCtaatcgtgat	127
<i>hsa-miR-155</i> cebador inverso	gtactagtttttttttttAccccta	128
L6TA cebador de extensión	tcggtgacacggagggtactagtttttttttttVN	129

REIVINDICACIONES

1. Un procedimiento de amplificación de una molécula de microARN específica en una muestra, comprendiendo el procedimiento las etapas de:

- 5 a) añadir colas poli-A a una población de moléculas de ARN en una muestra;
 b) producir moléculas de ADNc de las moléculas de ARN con cola poli-A usando un cebador de extensión en una reacción de transcripción inversa; y
 c) amplificar las moléculas de ADNc por PCR usando un cebador directo y un cebador inverso, ambos de los cuales son específicos para dicha molécula de microARN específica,

en el que dicho cebador de extensión es una secuencia de nucleótidos de acuerdo con la fórmula III:

$$10 \quad R^1-(T)_y-R^2 \quad (\text{III})$$

en la que R^1 es una secuencia de nucleótidos del extremo 5', $(T)_y$ es una parte central de y restos consecutivos de timina, en la que y es un número entero de 5 - 50, y R^2 es un motivo de secuencia VN o VNN que consiste en dos o tres restos nucleotídicos 3'-terminales respectivamente, en la que V es un resto de adenina, un resto de guanina, o un resto de citosina y N bien es un resto de adenina, un resto de guanina, un resto de citosina o un resto de timina, y en el que el cebador inverso es una secuencia de nucleótidos de acuerdo con la fórmula II:

$$15 \quad R^3-(T)_x-R^4 \quad (\text{II})$$

en la que R^3 es una secuencia de nucleótidos del extremo 5', $(T)_x$ es una parte central de x restos consecutivos de timina, en la que x es un número entero de 5 - 50, y R^4 es una secuencia de nucleótidos del extremo 3' que hibrida específicamente con una secuencia de nucleótidos de una molécula de microARN diana, y en la que el cebador directo o R4 del cebador inverso comprende al menos un LNA.

20 2. El procedimiento de acuerdo con la reivindicación 1, en el que tanto el cebador directo como R4 del cebador inverso comprenden al menos un LNA.

3. El procedimiento de acuerdo con la reivindicación 1 o 2, en el que y es un número entero de 5 a 21.

25 4. El procedimiento de acuerdo con una cualquiera de las reivindicaciones 1 - 3, en el que el cebador de extensión comprende al menos un LNA.

5. El procedimiento de acuerdo con las reivindicaciones 1 - 4, en el que x de la fórmula (II) es igual a y de la fórmula (III).

6. El procedimiento de acuerdo con una cualquiera de las reivindicaciones 1 - 5, en el que el cebador directo es diseñado para hibridar específicamente con la molécula de ADN complementaria de una molécula de ARN diana.

30 7. El procedimiento de acuerdo con una cualquiera de las reivindicaciones 1 - 6, en el que R^4 es diseñado para hibridar específicamente con el extremo 3' de un ARN diana.

8. Un procedimiento para medir la cantidad de un microARN diana en una muestra de un organismo vivo, comprendiendo el procedimiento las etapas de:

- 35 a) amplificar el microARN diana de acuerdo con el procedimiento de una cualquiera de las reivindicaciones 1 a 7,
 b) medir la cantidad de las moléculas de ADN amplificadas.

9. Un kit para detectar al menos un microARN diana que comprende al menos una serie de cebadores específicos para la detección de un microARN diana, comprendiendo la serie de cebadores:

a) un cebador de extensión de fórmula III:

$$40 \quad R^1-(T)_y-R^2 \quad (\text{III})$$

en la que R^1 es una secuencia de nucleótidos del extremo 5', $(T)_y$ es una parte central de y restos consecutivos de timina, en la que y es un número entero de 5 - 50, y R^2 es un motivo de secuencia VN o VNN que consiste en dos o tres restos nucleotídicos 3'-terminales respectivamente, en la que V es un resto de adenina, un resto de guanina, o un resto de citosina y N es bien un resto de adenina, un resto de guanina, un resto de citosina o un resto de timina, y

45 b) un cebador inverso de fórmula II:

$$R^3-(T)_x-R^4 \quad (\text{II})$$

en la que R^3 es una secuencia de nucleótidos del extremo 5', $(T)_x$ es una parte central de x restos consecutivos de timina, en la que x es un número entero de 5 - 50, y R^4 es una secuencia de nucleótidos del extremo 3' que hibrida específicamente con una secuencia de nucleótidos de una molécula de ARN diana, y

c) un cebador directo;
en el que tanto el cebador directo como R4 del cebador inverso comprenden al menos un LNA, y en el que x de la fórmula (II) es igual a y de la fórmula (III).

10. El kit de acuerdo con la reivindicación 9, en el que el cebador de extensión comprende al menos un LNA.

5 11. El kit de acuerdo con las reivindicaciones 9 o 10 para detectar al menos un microARN diana de mamífero que comprende al menos una serie de cebadores específicos para la detección de un microARN diana.

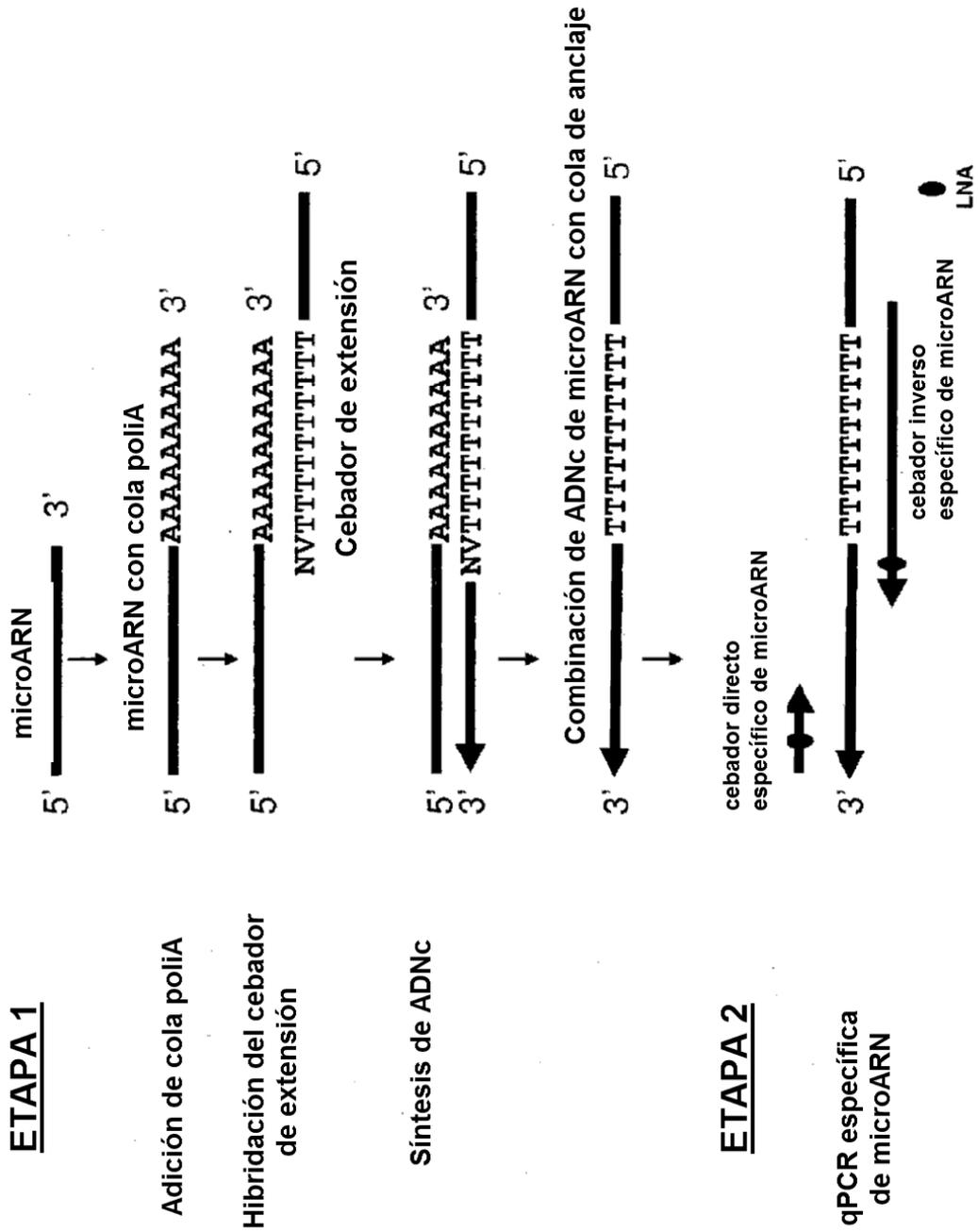


Fig. 1

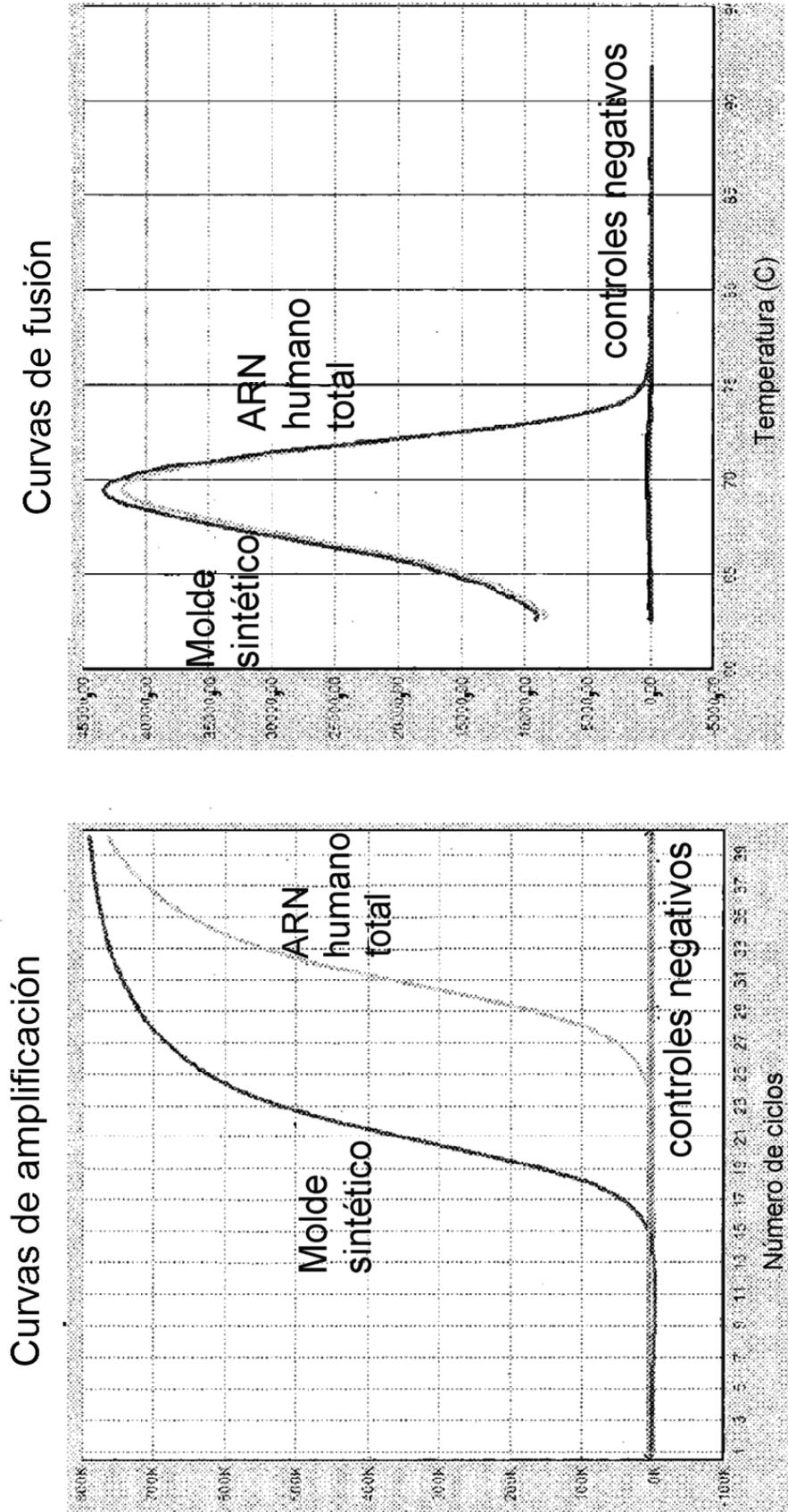


Fig. 2

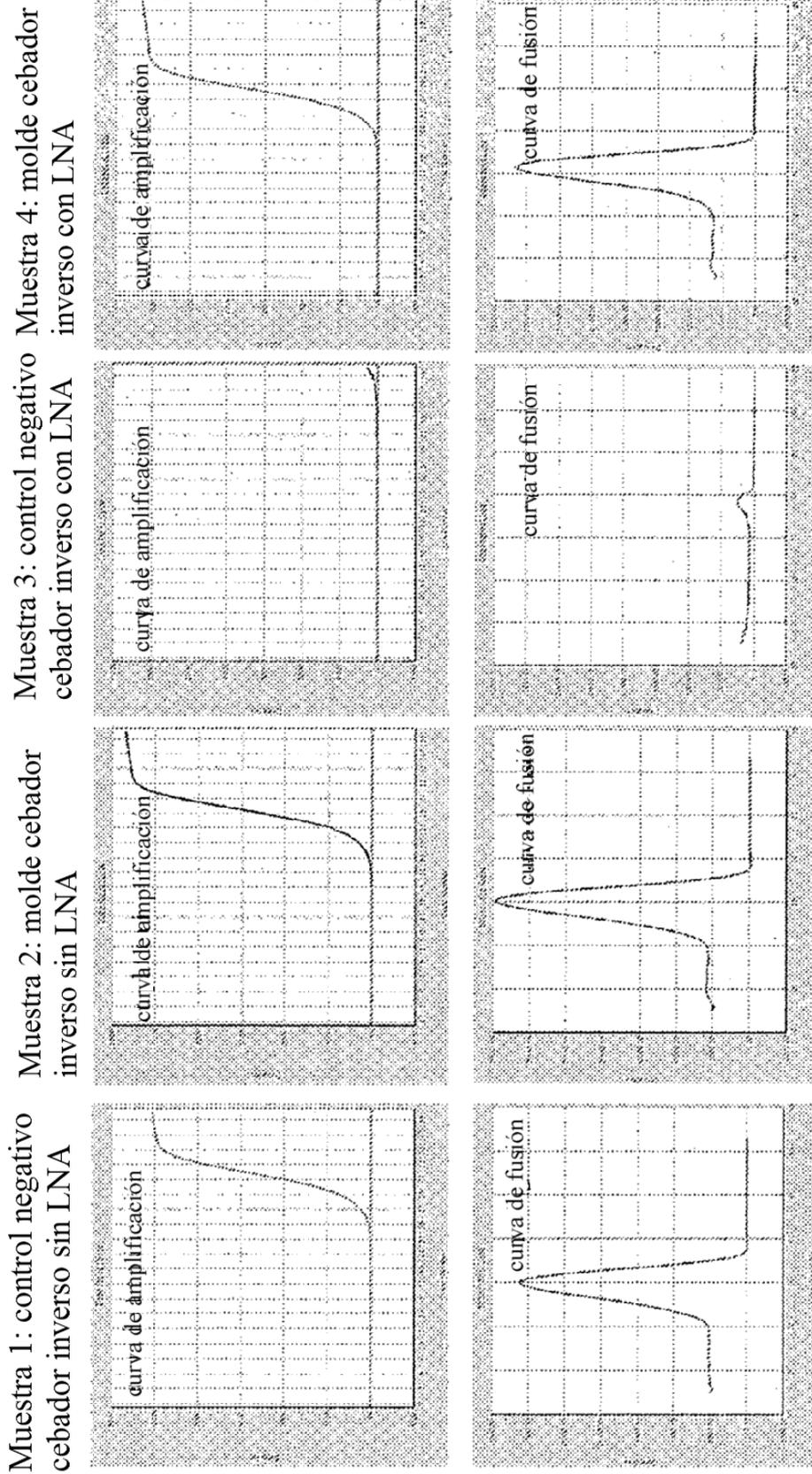


Fig. 3

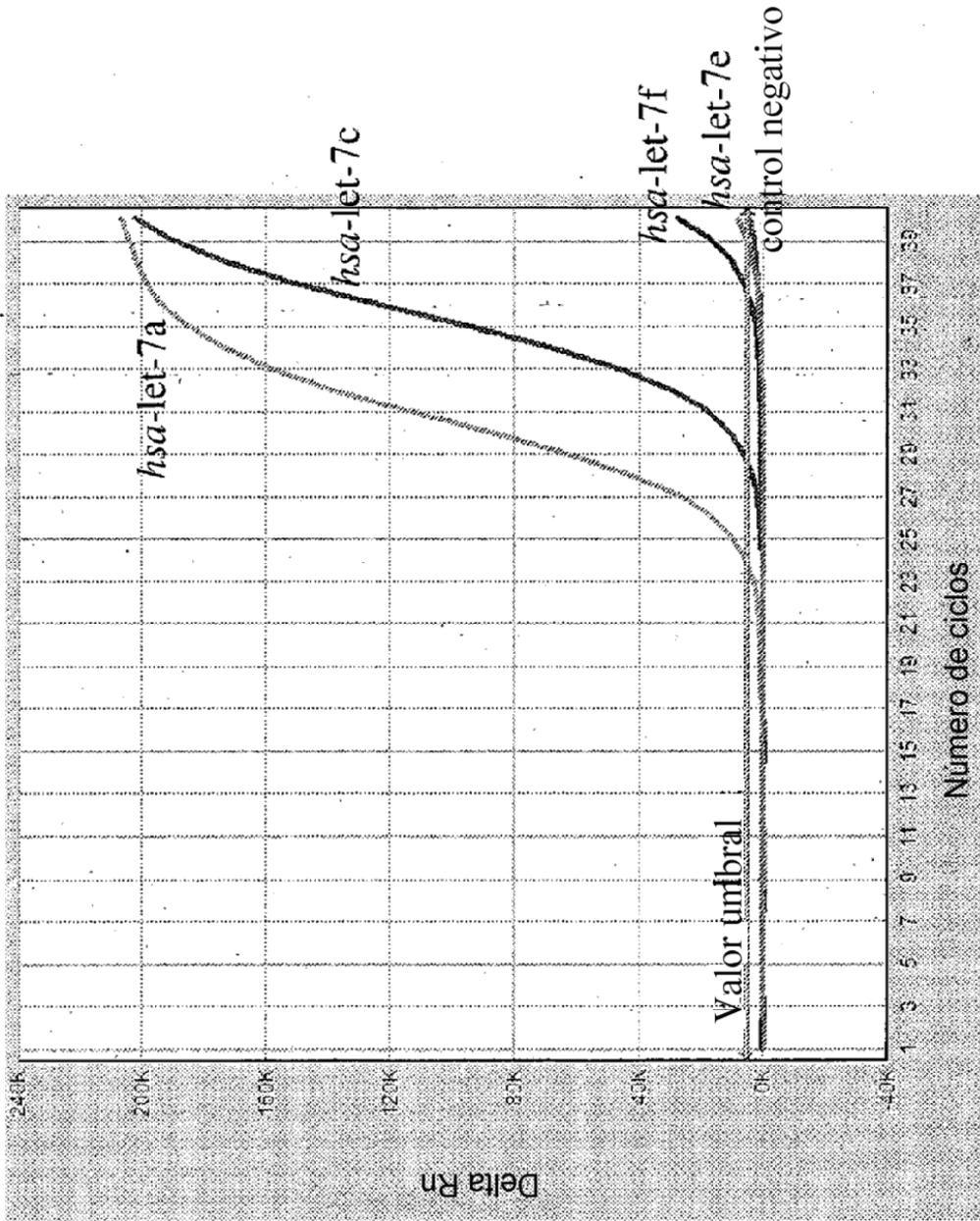
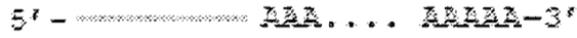


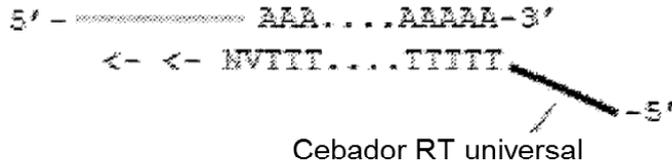
Fig. 4

Ensayo para miR maduro

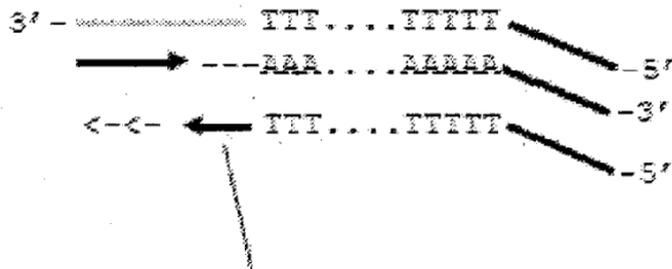
Poli-adenilación



Transcripción inversa a ADNc



PCR con cebadores específicos de gen



Cebador inverso - específico para el extremo 3' del miR maduro

Fig. 5A

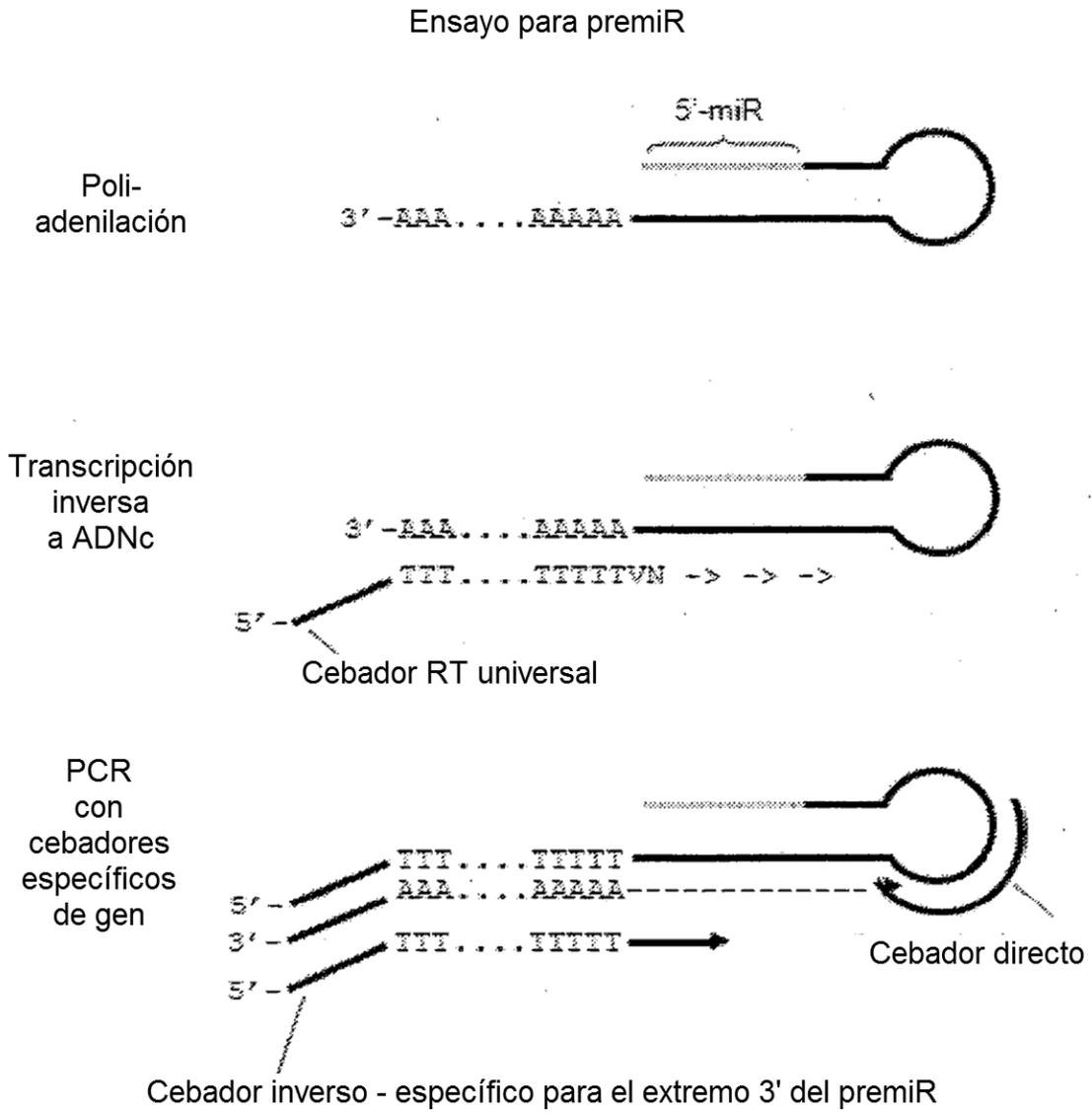


Fig. 5B

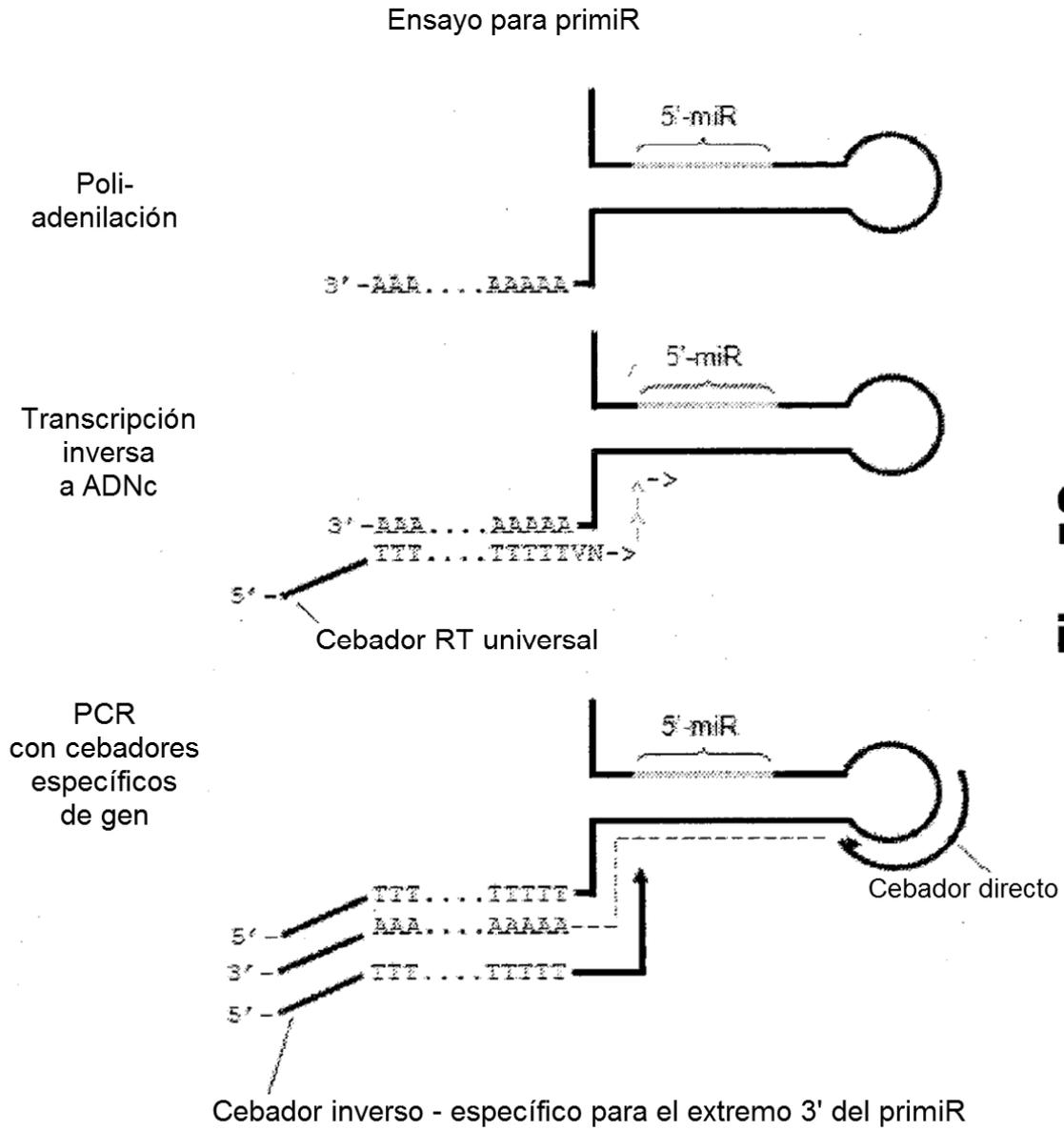


Fig. 5C

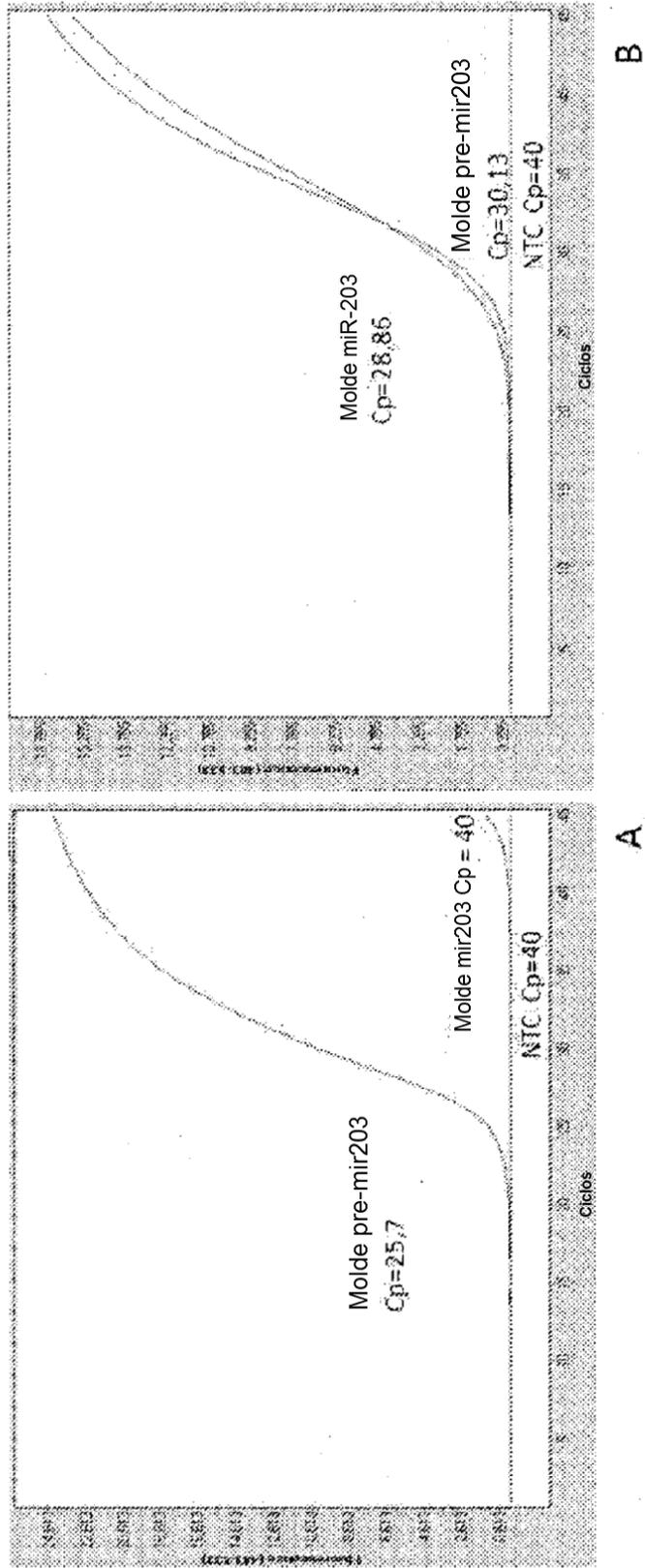


Fig. 6

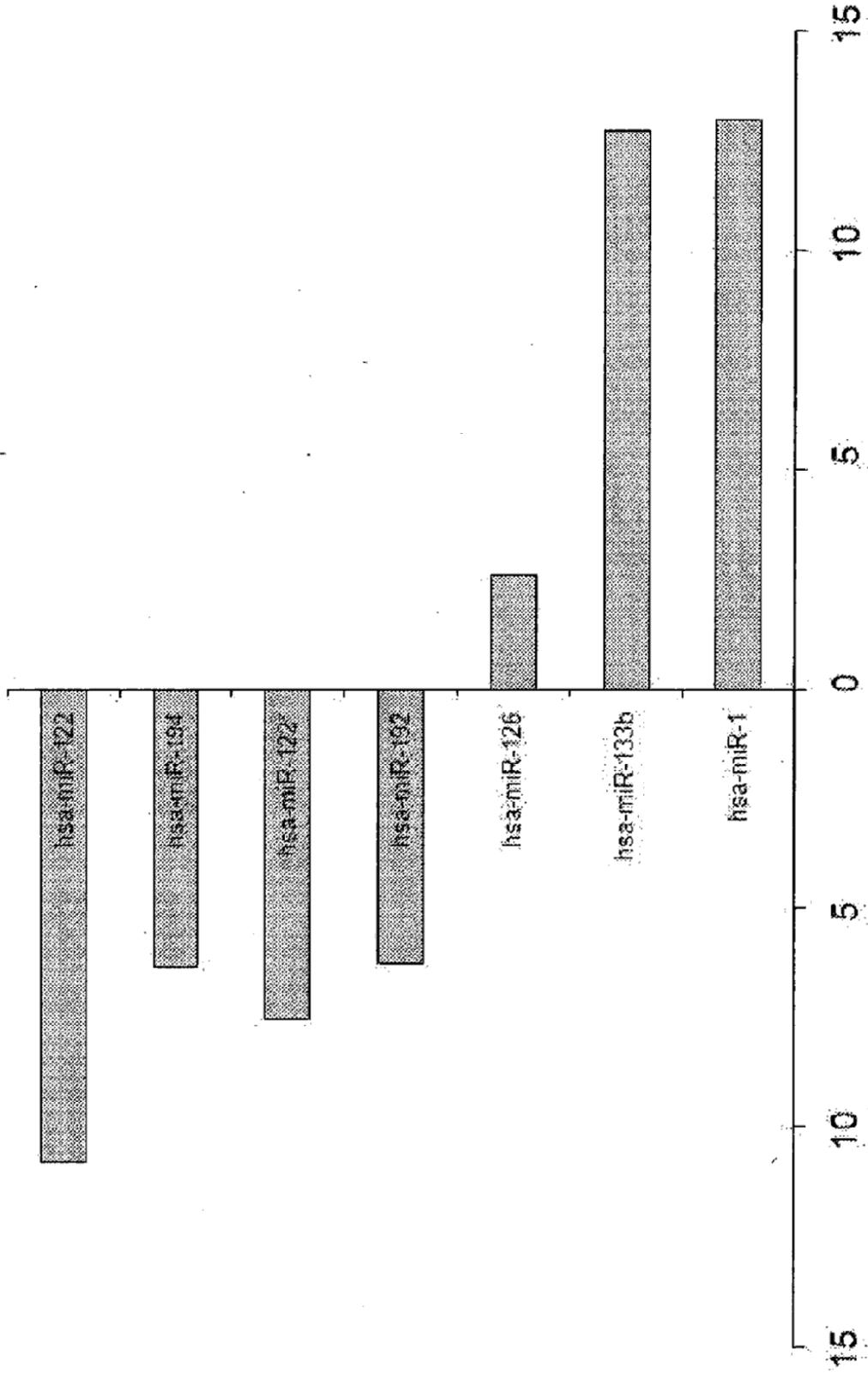


Fig. 7

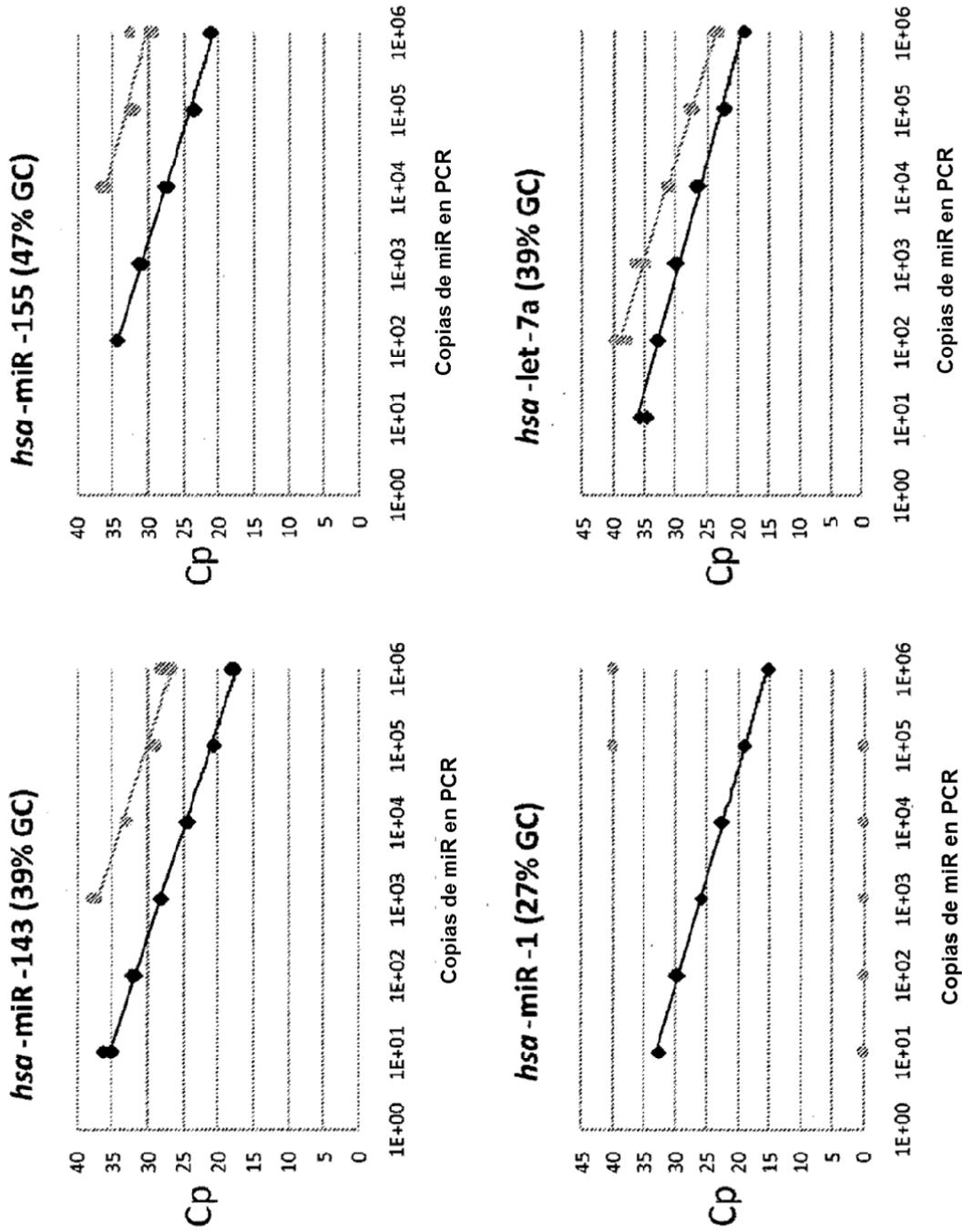


Fig. 8