

19



OFICINA ESPAÑOLA DE
PATENTES Y MARCAS

ESPAÑA



11 Número de publicación: **2 588 253**

51 Int. Cl.:

C12Q 1/68 (2006.01)

12

TRADUCCIÓN DE PATENTE EUROPEA

T3

86 Fecha de presentación y número de la solicitud internacional: **06.10.2009 PCT/EP2009/062926**

87 Fecha y número de publicación internacional: **22.04.2010 WO10043512**

96 Fecha de presentación y número de la solicitud europea: **06.10.2009 E 09783760 (3)**

97 Fecha y número de publicación de la concesión europea: **25.05.2016 EP 2337860**

54 Título: **Método de detección de oligonucleótidos**

30 Prioridad:

15.10.2008 EP 08166721

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

31.10.2016

73 Titular/es:

**AXOLABS GMBH (100.0%)
Fritz-Hornschuch-Strasse 9
95326 Kulmbach, DE**

72 Inventor/es:

**ROEHL, INGO;
SCHUSTER, MARKUS y
SEIFFERT, STEPHAN**

74 Agente/Representante:

CARVAJAL Y URQUIJO, Isabel

ES 2 588 253 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

Método de detección de oligonucleótidos

Descripción

5 La presente invención se refiere a un nuevo método simplificado para la detección de un oligonucleótido y sus metabolitos de oligonucleótido, en el que el oligonucleótido es un oligonucleótido de ARN seleccionado del grupo de ARN de interferencia corto (ARNic) y microARN (miARN). Además, la presente invención se refiere a un método la detección simultánea de ambas hebras de un oligonucleótido bicatenario en una única medición, por ejemplo, para ARNic.

10 Se usan comúnmente oligonucleótidos de secuencias conocidas en una amplia variedad de aplicaciones químicas y biológicas, y también han alcanzado alta importancia en el diagnóstico y tratamiento de enfermedades. En particular, oligonucleótidos antisentido, ARN de interferencia corto (ARNic) y aptámeros son herramientas farmacológicas y agentes terapéuticos prometedores. La detección cualitativa y cuantitativa de estos oligonucleótidos en muestras como células, tejido, sangre o plasma es un requisito previo para evaluar su uso terapéutico y para monitorizar su estabilidad *in vivo*.

15 En la bibliografía se mencionan diferentes métodos para la detección de oligonucleótidos y se dan a conocer en solicitudes de patente publicadas, por ejemplo, WO/2008/046645. La mayoría de los procedimientos establecidos para la detección cuantitativa y cualitativa de oligonucleótidos se basan en hibridación con oligonucleótidos complementarios por medio de apareamiento de bases de Watson-Crick. Los ácidos nucleicos peptídicos (PNA) son miméticos de oligonucleótido en los que la estructura principal de azúcar se reemplaza por una cadena pseudopeptídica de monómeros de N-aminoetilglicina. Se usan a menudo en métodos de detección de oligonucleótidos basados en sonda ya que se unen a secuencias de ADN o ARN complementarias con alta afinidad, especificidad y estabilidad (patente estadounidense 6.395.474). El documento WO/2008/046645 menciona el uso de sondas de PNA en un ensayo de detección de oligonucleótidos basado en RT-PCR. La patente estadounidense 6.045.995 describe la detección cualitativa y cuantitativa de oligonucleótidos mediante electroforesis en gel capilar. Rossi *et al* describen la identificación de oligonucleótidos amplificados por PCR mediante sondas de PNA en cromatografía de líquidos de alto rendimiento de intercambio aniónico (HPLC) (J. Agric. Food Chem. 2007, 55, 2509-2516).

30 Sin embargo, la mayoría de los ensayos existentes para determinar oligonucleótidos en muestras biológicas no pueden detectar metabolitos o separar las señales de metabolitos de la señal generada por el oligonucleótido intacto. Por ejemplo, en métodos basados en PCR, se generan habitualmente señales del fármaco intacto sólo o como la suma de diversos metabolitos junto con el fármaco intacto. La electroforesis en gel capilar con detección de fluorescencia conduce a una separación cuantitativa de oligonucleótido intacto de sus metabolitos, pero esta metodología necesita etapas de extracción y desalación durante la preparación de la muestra. Además, las recuperaciones de las moléculas de analito son variables y es necesario un patrón interno para la normalización. Otra limitación importante de los métodos de detección de oligonucleótidos usados actualmente es que sólo puede detectarse una de las dos hebras en una medición, los que es particularmente desventajoso para la determinación de dúplex de oligonucleótidos (por ejemplo, ARNic).

40 Por tanto, sería de gran ventaja disponer de un método reproducible y rápido para la detección de oligonucleótidos en muestras que pueda analizar oligonucleótidos y sus metabolitos en una muestra. Además, en vista de la importancia creciente de ARNic y sus derivados en terapia y diagnósticos, existe la necesidad de un método reproducible y rápido que pueda detectar ambas hebras del oligonucleótido y sus metabolitos en una medición. Se da a conocer un método para la detección cuantitativa de un oligonucleótido y sus metabolitos de oligonucleótido, que comprende las etapas de seleccionar una muestra que contiene o se sospecha que contiene dicho oligonucleótido, formar una mezcla de hibridación poniendo en contacto la muestra con una sonda de ácido nucleico peptídico (PNA) marcada fluorescentemente que es completamente complementaria a al menos 10 o más nucleótidos de dicho oligonucleótido, separar los restos hibridados formados entre dicho oligonucleótido y dicha sonda de PNA de los restos no hibridados mediante cromatografía de líquidos de alto rendimiento de intercambio aniónico (aLEX-HPLC), y detectar cualitativa y/o cuantitativamente dichos restos hibridados mediante espectroscopía de fluorescencia. Una ventaja importante de la presente invención con respecto a otros métodos de detección de oligonucleótidos es la preparación sencilla de la muestra antes de la detección, por ejemplo, sin que se requieran procedimientos de limpieza, etapas de amplificación o extracción. Por tanto, se evita cualquier variabilidad con respecto a la recuperación del analito. En realizaciones preferidas la muestra se trata con proteinasa K en un tampón que contiene SDS, seguido por precipitación del SDS con una disolución de KCl saturada. De ese modo se evita eficazmente la degradación de los oligonucleótidos en la muestra.

55 La sonda de PNA no hibridada en exceso se eluye en el volumen inicial de la HPLC y no se espera que la sonda produzca señales de interferencia durante la separación en gradiente. Por tanto, puede usarse un gran exceso de la sonda de PNA para controlar cinéticamente el proceso de hibridación sin establecer una etapa para extraer la sonda

en exceso de la muestra. El uso de la sonda de PNA también elimina la fluorescencia de fondo completa de la matriz biológica, ya que se eluye con el volumen inicial de la aIEX-HPLC. También las señales generadas a partir de la hibridación no específica de la sonda de PNA con ARN procedente de la matriz biológica se eluye por separado en la etapa de lavado del gradiente de HPLC. Por tanto sólo pueden detectarse señales específicas del analito durante el gradiente de HPLC con alta selectividad. Por tanto, el sistema de aIEX-HPLX funciona de manera muy robusta incluso si se carga con alto fondo biológico.

Debido a la estructura principal no cargada del PNA, muestra alta afinidad con la hebra de oligonucleótido correspondiente (sin repulsión electrostática como para dúplex de ADN/ADN, ADN/ARN y ARN/ARN) lo que conduce a una hibridación controlada termodinámicamente incluso en presencia de una hebra de ARN competidora como en el caso de dúplex de ARN_{Nic}. Otra mejora importante de este método con respecto a otros métodos es la capacidad de detectar metabolitos y separar las señales de metabolitos de la señal generada por el oligonucleótido intacto. El mayor poder de separación para los metabolitos es otro resultado de la estructura principal no cargada de la sonda de PNA. La elución depende fuertemente de la longitud del metabolito, cuanto más corto es el metabolito, más fácilmente se eluye de la columna de HPLC dentro del gradiente. Además, puede separarse un oligonucleótido fosforilado en 5' de la secuencia idéntica no fosforilada de la misma longitud. Puesto que la fosforilación en 5' se produce sólo tras el suministro del ARN_{Nic} a la célula, puede usarse esto para distinguir el ARN_{Nic} extracelular del suministrado intracelularmente en tejidos. Entonces el ARN_{Nic} fosforilado en 5' intracelular puede servir como marcador para la cantidad de fármaco activo en tejido en comparación con la cantidad global de fármaco administrado al órgano.

Sensibilidad y reproducibilidad del método de detección de oligonucleótidos descrito en el presente documento: Para una secuencia modelo (RD-1003) el límite de cuantificación inferior (LLOQ) en plasma es de aproximadamente 250 amol del oligonucleótido con el enfoque de calibración de reserva. El ensayo funciona con alta reproducibilidad (variación <5%).

Las principales ventajas de la presente invención con respecto a otros métodos de cuantificación de oligonucleótidos basados en HPLC publicados son la preparación de la muestra rápida y sencilla, la falta de etapas de amplificación antes de la detección, la alta sensibilidad y reproducibilidad, la robustez del ensayo, la capacidad de alto rendimiento y la capacidad de detectar ambas hebras del oligonucleótido y sus metabolitos en una medición. Rossi *et al*/ describen la identificación de oligonucleótidos en HPLC de intercambio aniónico (J. Agric. Food Chem. 2007, 55, 2509-2516). En contraposición a la presente invención, son necesarias etapas de preparación de la muestra adicionales y amplificación de los oligonucleótidos mediante PCR antes de la detección. Además, es imposible una detección simultánea de ambas hebras, ya que el protocolo de hibridación requiere la escisión nucleolítica de una de las hebras.

La mayoría de los ensayos descritos anteriormente requieren curvas de calibración individuales debido al fondo inespecífico variable de diferentes tejidos o plasma. En cambio, las señales de fondo inespecífico no interfieren con el ensayo de la presente invención. Por tanto, en realizaciones preferidas de la invención, pueden usarse curvas de calibración generadas a partir de una serie de dilución en tampón para muestras de tejido y plasma.

En otro aspecto de la invención se proporcionan métodos para la detección cuantitativa de ambas hebras de un dúplex de oligonucleótido de ARN_{Nic} en paralelo a partir de una muestra, que comprende las etapas de seleccionar una muestra que contiene o se sospecha que contiene dicho dúplex de oligonucleótido de ARN_{Nic}; formar una mezcla de hibridación poniendo en contacto la muestra con una sonda de ácido nucleico peptídico (PNA) marcada fluorescentemente que es completamente complementaria a al menos 10 o más nucleótidos de la hebra sentido de dicho oligonucleótido, poner en contacto la mezcla de hibridación con una segunda sonda de PNA marcada fluorescentemente, que es completamente complementaria a al menos 10 o más nucleótidos de la hebra antisentido de dicho oligonucleótido, separar los restos hibridados formados entre dichas hebras de oligonucleótido y dichas sondas de PNA de los restos no hibridados mediante aIEX-HPLC, detectar cualitativa y/o cuantitativamente dichos restos hibridados mediante espectroscopía de fluorescencia. Éste es el primer procedimiento que permite la detección de ambas hebras de un dúplex de oligonucleótido de ARN_{Nic} en paralelo a partir de una muestra.

En la realización más preferida, se usan dos sondas de PNA marcadas fluorescentemente para la detección de dúplex de oligonucleótido. Cada sonda se hibrida específicamente con la hebra o bien sentido o bien antisentido del oligonucleótido. En una realización, se usa el mismo marcador de fluorescencia para la detección de ambas hebras. El dúplex se diseña de dos hebras con diferente longitud o las dos sondas se diseñan de modo que la hibridación conduzca a diferentes tiempos de retención de las dos hebras individuales en el análisis de aIEX-HPLC. En otra realización, se usan dos marcadores de fluorescencia diferentes para la detección de ambas hebras con dos detectores de fluorescencia en un sistema de HPLC.

Esto abre nuevas posibilidades no sólo para la cuantificación de muestras biológicas sino también para la caracterización CMC de dúplex de oligonucleótidos, por ejemplo, para caracterizar directamente la razón de las dos hebras individuales en un dúplex de ARN_{Nic} como la razón de áreas de pico para las hebras individuales. La intensidad de la señal depende sólo de la señal de fluorescencia tras el procedimiento de hibridación y es

independiente de los coeficientes de extinción UV específicos de las hebras individuales.

En una realización preferida, se añade una concentración conocida del oligonucleótido que debe detectarse a la muestra desconocida, y también se añade a la muestra de calibración y blanco. Este denominado enfoque de calibración de reserva mejora la sensibilidad del ensayo tal como se detalla en la sección de ejemplos.

5 En otra realización preferida la muestra es plasma, en aún otra realización preferida la muestra es tejido.

En otra realización preferida, el método se usa para la detección cualitativa de ARNic y derivados. En aún otra realización el método puede usarse para la detección cualitativa del metabolismo *in vivo* de ARNic terapéutico o de diagnóstico.

10 En una realización dicho ARNic se detecta a partir de cultivos celulares *in vitro* que se han transfectado con dicho ARNic

En una realización el método se usa para la detección cualitativa de microARN y derivados. Preferiblemente dichos microARN se detectan a partir de lisados tisulares.

15 En otra realización el método se describe para la detección cualitativa de aptámeros. Preferiblemente, dichos aptámeros son espejelmeros con L-ribosa (L-ARN) o L-desoxirribosa (L-ADN). En una realización, dicho aptámero está pegilado.

En aún otra realización el método puede usarse para distinguir el ARNic extracelular del suministrado intracelularmente en tejidos.

20 Se han descrito varios colorantes para marcar fluorescentemente oligonucleótidos. Los marcadores de fluorescencia preferidos incluyen Atto 610, Atto 425 y Atto 520, pero puede usarse en el método cualquier otro marcador de fluorescencia conocido por un experto en la técnica.

25 Se describen kits adecuados para realizar un ensayo que detecta la presencia, la ausencia o el número de una o dos hebras de un oligonucleótido y sus metabolitos en una muestra. Los kits comprenden una preparación de placa lista para usar que comprende una o más sondas de PNA y todos los demás reactivos o composiciones necesarios para realizar el ensayo. El uso del kit simplifica el rendimiento del ensayo y mejora la reproducibilidad del ensayo. Los kits preferidos hacen uso de un sistema robótico completamente automatizado para la detección de oligonucleótidos, en donde se añaden todos los reactivos mediante un robot pipeteador. Por tanto la reproducibilidad del ensayo se mejora adicionalmente. Además, este sistema puede usarse para análisis de alto rendimiento de oligonucleótidos en diferentes muestras. En una realización preferida, los kits comprenden una preparación de placa de 96 pocillos, en aún otra realización los kits comprenden una preparación de placa de 384 pocillos.

30 Por conveniencia, a continuación se proporciona el significado de determinados términos y frases usados en la memoria descriptiva, los ejemplos y las reivindicaciones. Si hay una aparente discrepancia entre el uso de un término en otras partes de esta memoria descriptiva y su definición proporcionada en esta sección, prevalecerá la definición proporcionada en esta sección.

35 El término "oligonucleótido" tal como se usa en el presente documento se refiere a un oligómero o polímero de o bien ácido ribonucleico (ARN) o ácido desoxirribonucleico (ADN), así como a oligonucleótidos que no se producen de manera natural. Oligonucleótidos que no se producen de manera natural son oligómeros o polímeros que contienen secuencias de nucleobases que no se producen en la naturaleza, o especies que contienen equivalentes funcionales de nucleobases, azúcares o enlaces entre azúcares que se producen de manera natural, como aptámeros, espejelmeros, ácidos nucleicos peptídicos (PNA), ácidos nucleicos de treosa (TNA), ácidos nucleicos bloqueados (LNA) o ácidos nucleicos de glicerol (GNA). Este término incluye oligómeros que contienen las nucleobases de ácido nucleico que se producen de manera natural, adenina (A), guanina (G), timina (T), citosina (C) y uracilo (U), así como oligómeros que contienen análogos de bases o nucleobases modificadas. Por tanto, el experto en la técnica entiende que el término "oligonucleótido" comprende pero no se limita a ARN, ADN y oligonucleótidos mixtos, oligonucleótidos antisentido, ARN de interferencia corto (ARNic), microARN (miARN), aptámeros y también espejelmeros.

40

45

Los oligonucleótidos pueden derivarse de una variedad de fuentes naturales tales como ADN y ARN virales, bacterianos y eucariotas. Otros oligonucleótidos pueden derivarse de fuentes sintéticas, e incluyen cualquiera de los múltiples oligonucleótidos que están fabricándose para su uso como reactivos de investigación, agentes de diagnóstico o agentes terapéuticos posibles y definidos. El término incluye oligómeros que comprenden un ácido nucleico monocatenario o un ácido nucleico bicatenario. Las dos hebras de un ácido nucleico bicatenario se definen como "hebra sentido" y "hebra antisentido".

50

Tal como se usa en el presente documento, el término “hebra que comprende una secuencia” se refiere a un oligonucleótido que comprende una cadena de nucleótidos que se describe mediante la secuencia a la que se hace referencia usando la nomenclatura de nucleótidos convencional. Sin embargo, tal como se detalla en el presente documento, una “hebra que comprende una secuencia” de este tipo también puede comprender modificaciones, como nucleótidos modificados. Tal como se usa en el presente documento, y a menos que se indique otra cosa, el término “complementario”, cuando se usa para describir una primera secuencia de nucleótidos en relación con una segunda secuencia de nucleótidos, se refiere a la capacidad de un oligonucleótido o polinucleótido que comprende la primera secuencia de nucleótidos para hibridarse y formar una estructura de dúplex en determinadas condiciones con un oligonucleótido o polinucleótido que comprende la segunda secuencia de nucleótidos, tal como entenderá el experto en la técnica. Las secuencias “complementarias”, tal como se usa en el presente documento, pueden incluir también, o estar formadas completamente por pares de bases distintas de Watson-Crick y/o pares de bases formadas a partir de nucleótidos no naturales y modificados, siempre que se satisfagan los requisitos anteriores con respecto a su capacidad para hibridarse.

Esto incluye el apareamiento de bases del oligonucleótido o polinucleótido que comprende la primera secuencia de nucleótidos con el oligonucleótido o polinucleótido que comprende la segunda secuencia de nucleótidos a lo largo de toda la longitud de la secuencia de nucleótidos primera y segunda. Tales secuencias pueden considerarse “completamente complementarias” entre sí en el presente documento.

El término “restos hibridados” se refiere a cualquier oligonucleótido o cualquiera de sus metabolitos que se hibridan con las sondas de PNA mientras que “restos no hibridados” se refiere a cualquier oligonucleótido o cualquiera de sus metabolitos que no se hibridan con la sonda de PNA. El término “ARNic” se refiere a una molécula de ARN bicatenaria que puede bloquear la expresión génica en un mecanismo regulador altamente conservado conocido como interferencia de ARN (iARN).

Por tanto el término “ARNic terapéutico” se refiere a una molécula de ARN bicatenaria usada como compuesto para tratar, prevenir o gestionar trastornos y enfermedades de un sujeto bloqueando la expresión de genes relacionados con trastornos o enfermedades específicos. Preferiblemente, tal sujeto es un mamífero, lo más preferiblemente un paciente humano.

El término “metabolito de oligonucleótido” incluye oligonucleótidos de los cuales se delecionan 1 o más nucleótidos del extremo 3’ y/o 5’. El término “metabolito de oligonucleótido” incluye además cualquier oligonucleótido modificado de manera natural o de manera sintética, por ejemplo, oligonucleótidos que comprenden extremos 3’ o 5’ fosforilados.

También se reivindican los métodos tal como se describieron anteriormente en el presente documento, especialmente con referencia a los ejemplos a continuación. Los siguientes ejemplos, referencias, listas de secuencias y figuras se proporcionan para ayudar el entendimiento de la presente invención, cuyo alcance verdadero se expone en las reivindicaciones adjuntas.

35 Breve descripción de las figuras

La figura 1 muestra un cromatograma para la detección de una hebra del ARNic,

la figura 2 muestra un análisis simultáneo de ambas hebras usando dos sondas de PNA con el mismo colorante,

la figura 3 muestra curvas de calibración para el análisis simultáneo de ambas hebras usando dos sondas de PNA con el mismo colorante,

40 la figura 4 muestra el análisis simultáneo de ambas hebras usando dos sondas de PNA con diferentes marcadores de fluorescencia, detección con dos detectores de fluorescencia,

la figura 5 muestra la separación de metabolitos de fármaco,

la figura 6 muestra un cromatograma para la detección de miARN,

la figura 7 muestra un cromatograma para detección de espiegelmero en tejido pulmonar,

45 la figura 8 muestra cambio del tiempo de retención mediante secuencias de hebra alargadas en 3’,

la figura 9 muestra el aumento en la sensibilidad mediante una carga tisular superior.

Ejemplos

Ejemplo 1: Detección de ARNic para GFP mediante HPLC de sonda de PNA

Esta sección de materiales y métodos describe el procedimiento de ensayo para determinar un GFP-ARNic a partir de muestras biológicas. Adicionalmente este procedimiento también puede usarse con pequeñas variaciones para todos los demás oligonucleótidos que pueden formar pares de bases de Watson-crick. El procedimiento permite la determinación de sólo una hebra en el caso de oligonucleótidos mono y bicatenarios y la cuantificación de ambas hebras en paralelo a partir de oligonucleótidos bicatenarios, por ejemplo, ARNic. El colorante-sonda es una hebra de PNA (ácido nucleico peptídico) marcada fluorescentemente que es completamente complementaria a al menos 10 o más nucleótidos del oligonucleótido que debe cuantificarse (complementaria se define como apareamiento perfecto de bases de Watson-Crick).

- 5
- 10
- 15
- 20

Para la hibridación, se mezclan 100 µl del sobrenadante diluido que contiene entre 0,5 y 250 fmol de ARNic, en placas de PCR de 96 pocillos, con 5 µl de una disolución de sonda de PNA-Atto610 1 µM que selecciona como diana la hebra antisentido. Se añade tampón de hibridación hasta un volumen final de 200 µl (hasta 190 µl si la hebra sentido del dúplex de ARNic también debe detectarse). Se sella la placa y se incuba a 95°C durante 15 min en un instrumento de PCR.

- 25

La temperatura del instrumento de PCR se reduce hasta 50°C. Si debe detectarse la hebra sentido del dúplex de ARNic, se añaden 10 µl de una sonda de PNA-Atto425 1 mM (o de la sonda de PNA-Atto610) que selecciona como diana la hebra sentido a cada pocillo para un volumen final de 200 µl. Tras agitar durante 15 min adicionales a 50°C, se enfría hasta temperatura ambiente y se ponen las muestras en el inyector automático de HPLC.

- 30

Se generan curvas de calibración a partir de una serie de dilución de ARNic en condiciones idénticas. En la figura 3 se proporciona un cromatograma representativo de la curva de calibración usada en el análisis de ambas hebras de un oligonucleótido.

- 35

Conjunto de sondas de ARNic para GFP		
Seq.Id. No. 1	5'-Atto425-(OO)-TC TGC TGC TTC ATG-3'	Sentido
Seq.Id. No. 2	5'-Atto610-(OO)-TC TGC TGC TTC ATG-3'	Sentido
Seq.Id. No. 3	5'-Atto610-(OO)-ACA TGA AGC AGC ACG-3'	Antisentido

Análisis de HPLC con detección de fluorescencia del dúplex de sonda/hebra antisentido

Se inyectan 100 µl de cada muestra hibridada (1/2) en el sistema de HPLC conectado a un detector de fluorescencia Dionex RF2000. Para la detección de ambas hebras de ARNic con los dos colorantes de fluorescencia diferentes, se usa un segundo detector de fluorescencia Dionex RF2000 conectado en una fila tras el primer detector. Se realiza la cromatografía a 50°C en condiciones nativas con NaClO₄ como sal de eluyente en una columna Dionex DNA Pac PA100.

- 40

En la figura 1 se muestra un cromatograma típico para la detección de una hebra, en la figura 2 se proporciona un cromatograma típico para el análisis simultáneo de ambas hebras usando dos sondas de PNA con el mismo colorante. En la figura 3 se proporciona un cromatograma representativo de la curva de calibración usada en el análisis de ambas hebras de un oligonucleótido. En la figura 4 se muestra un cromatograma típico del análisis simultáneo de ambas hebras usando dos sondas de PNA con diferentes marcadores de fluorescencia y su detección con dos detectores de fluorescencia.

- 45

ES 2 588 253 T3

Condiciones de HPLC

Columna: Dionex DNAPac PA100 (columna analítica de 4x250 mm)

Temp.: 50°C

Flujo: 1 ml/min

5 Inyección: 100 ul

Detección: Excitación: 612 nm; emisión: 642 nm (primer detector), excitación: 436 nm; emisión: 484 nm (segundo detector si es necesario)

Tabla 2: Tabla de gradiente de HPLC

Tiempo	% de A	% de B
-1,00 min	91	9
1,00 min	91	9
9,0 min	80	20
9,5 min	0	100
12,5 min	0	100
13,0 min	91	9
16,0 min	91	9

10 Se determinan las concentraciones del ARNic para GFP en muestras de plasma y tejido usando HPLC de intercambio iónico para separar los analitos y cuantificar el área bajo el pico con detección de fluorescencia. En las condiciones de IEX-HPLC nativa usadas, los compuestos de la matriz de interferencia así como el exceso de las sondas marcadas con fluorescencia se eluyen en el volumen inicial de la columna. No se producen cambios de señales no específicas a partir de la hibridación de las sondas marcadas con fluorescencia con ARN/ADN de la matriz a tiempos de retención superiores, lo que permite una buena resolución de la señal con poco fondo que eluye conjuntamente. Las señales específicas generadas por los dúplex que consisten en sondas marcadas con fluorescencia y la hebra de ARNic intacta correspondiente eluye normalmente entre 5 y 7 min.

15 La cuantificación se realiza basándose en una curva de calibración externa generada a partir de una serie de dilución de ARNic patrón (desde 0,5 hasta 250 fmol de ARNic) que se hibrida y se analiza tal como se describió anteriormente. El intervalo lineal de este ensayo es de desde 0,5 hasta 250 fmol de ARNic en la columna con un LLOQ de ~0,6 ng de ARNic en 1 ml de plasma y ~5 ng de ARNic en tejido.

Reactivos

- Disolución madre de ARNic para GFP patrón 50 µM (prep. internamente)
- Tampón de hibridación: TRIS-Cl 50 mM; ACN al 10% (prep. internamente)
- Proteinasa K (20 mg/ml): Peqlab n.º 04-1075; lote: 11024
- 25 • Tampón de lisis: Disolución de lisis celular y tisular Epicentre (n.º MTC096H)
- Agua MilliQ: 18,2 MΩ
- Sondas de PNA: véase la tabla 1
- KCl: Disolución 3 M en H₂O (prep. internamente)
- Sistema de HPLC A para la detección de fluorescencia:
- 30 • Eluyente A de HPLC: TRIS-HCl 25 mM; EDTA 1 mM; ACN al 50%; pH=8
- Eluyente B de HPLC: NaClO₄ 800 mM en A

Material:

- Varilla ultrasónica, Bandelin Sonoplus (Berlín), HD 2070 MS72 con UW 2070
- Tubos Eppendorf de 1,5 ml
- Placa de PCR Eppendorf twin.tec 96 (n.º 951020389)
- Gradiente Eppendorf Mastercycler

- 5
- Ultra Clear cap-Stripes, Peqlab (n.1 82-0866-A)
 - HPLC Dionex Ultimate3000: Rejilla de disolvente

Bomba doble Ultimate 3000

Inyector automático Ultimate 3000

Horno de columna Ultimate 3000 con válvula de cambio de 10 orificios

- 10
- Detector UV VWD 3000

Detector de fluorescencia RF2000

Alternativamente, se usaron las siguientes condiciones de HPLC para la detección de oligonucleótidos, especialmente para la detección de miARN y ARNic:

- Columna: Dionex DNA Pac PA100 (250 x 4mm)

- 15
- Temperatura: 50°C
 - Eluyente A: Fosfato de sodio 10 mM; NaCl 100 mM; ACN al 5%
 - Eluyente B: Fosfato de sodio 10 mM; NaCl 1 M; ACN al 5%
 - Eluyente C: ACN al 90%

20

Tabla 3: Tabla de gradiente de HPLC - protocolo alternativo (condiciones convencionales para la detección de miARN y ARNic)

Tiempo [min]	Flujo [ml/min]	Eluyente A [%]	Eluyente B [%]	Eluyente C [%]
0,00	1,00	40	20	37
1,00	1,00	40	20	37
10,00	1,00	8	55	37
10,50	1,00	0	90	10
13,50	1,00	0	90	10
14,00	1,00	40	20	37
17,00	1,00	40	20	37

Ejemplo 2: Preparación de placa de 96 pocillos automatizada

25

Esta sección describe un nuevo protocolo de preparación de la muestra que hace uso de placas de microtitulación. En el mismo, se reducen las etapas de manipulación manual hasta un mínimo para mejorar la reproducibilidad del ensayo. Todos los componentes de la mezcla incluyendo el tampón de hibridación, el colorante-sonda y la adición conocida de ARNic se añaden mediante un robot pipeteador a una placa de 96 pocillos. También la precipitación con SDS anterior de las muestras puede realizarse en un sistema basado en placa de microtitulación.

30

Con este procedimiento es posible preparar placas de 96 pocillos en reserva para un oligonucleótido definido, en el que sólo tiene que añadirse la disolución de la muestra. Por consiguiente, esta preparación lista para usar funciona como un kit y puede usarse para un análisis de alto rendimiento rápido de muestras que contienen o se sospecha que contienen oligonucleótidos definidos.

Preparación de la placa

5 En una placa de microtitulación de 96 pocillos, los pocillos forman una cuadrícula rectangular de 8 filas (marcadas A a H) y 12 columnas (marcadas 1 a 12). Para una preparación de placa de 96 pocillos automatizada, se prepara manualmente una mezcla maestra según la tabla 4 y se añaden 100 µl a cada pocillo de la placa mediante un robot pipeteador. A los pocillos en la fila 1-10, se les añaden 50 µl de agua. La fila 1-9 sirve para el análisis de muestras, la fila 10 sirve como control para la adición conocida de 1 fmol y las filas 1-12 para las curvas de calibración. A los pocillos 11-12, se les añaden 50 µl de medio y 50 µl de una dilución de ARNic. Las diluciones de ARNic se preparan mediante el robot pipeteador partiendo de una disolución de ARNic 100 nM y se enumeran a continuación. Esta placa de 96 pocillos se denomina adicionalmente "placa preparada".

Tabla 4: Mezcla maestra para la preparación de la placa

Sustancia	Por vial	Mezcla maestra (=x500)
Agua	31 µl	15500 µl
Sonda de PNA 1 pmol/µl	5 µl	2500 µl
Adición conocida de ARNic 1 fmol: 0,5 fmol/µl	4 µl	2000 µl
Acetonitrilo	20 µl	10000 µl
Tris 1 M pH 8,0	40 µl	20000 µl

10 Diluciones de ARNic para las curvas de calibración

20 nM (500 fmol)

10 nM (250 fmol)

4 nM (100 fmol)

2 nM (50 fmol)

15 1 nM (25 fmol)

0,4 nM (10 fmol)

0,2 nM (5 fmol)

0,1 nM (2,5 fmol)

0,02 nM (0,5 fmol)

20 0,01 nM (0,25 fmol)

Adición de muestras a placa preparada / etapa de precipitación con SDS

25 Se pipetea alícuotas de 100 µl a los pocillos en las filas (A-H) de las columnas 1 a 9 de una placa de microtitulación de 96 pocillos previamente enfriada, y a estos pocillos se les añaden 10 µl de KCl 3 M mediante un robot pipeteador. Tras 15 minutos de centrifugación a 3800 U/min y 4°C, se transfieren 50 µl del sobrenadante mediante el robot pipeteador a las columnas acordes de una placa preparada.

Para el control, se precipita medio o tampón de lisis con KCl 3 M y 50 µl del sobrenadante añadido a la columna 10 - 12 de la placa preparada. Se inyectan 100 µl de cada pocillo en aIEX-HPLC.

Ejemplo 3: Separación de metabolitos de fármaco

30 Para la separación de diferentes metabolitos de fármaco, se analizaron metabolitos del extremo 3' (3' n-2, 3' n-4, 3' n-5, 3' n-6) y del extremo 5' (5' n-1, 5' n-2, 5' n-3) purificados de la hebra as de ARNic para GFP, de los cuales se delecionaron de 1 a 6 nucleótidos del extremo 3' o 5', respectivamente, según el procedimiento de ensayo descrito en el ejemplo 1. Se facilitan los metabolitos en la tabla 5, en la figura 5 se proporciona un cromatograma típico para la separación de metabolitos.

Tabla 5: Metabolitos representativos de ARNic para GFP

ARNic para GFP		
Sentido		
Nombre	Secuencia	Seq.Id
ARNic para GFP-hebra s	5'-CCACAUGAAGCAGCAGCAGACUU-3'	4
Antisentido		
Nombre	Secuencia	Seq.Id
ARNic para GFP-hebra as	5'-AAGUCGUGCUGCUUCAUGUGGUC-3'	5
ARNic para GFP-hebra as-5'-(n-1)	5'-AGUCGUGCUGCUUCAUGUGGUC-3'	6
ARNic para GFP-hebra as-5'-(n-2)	5'-GUCGUGCUGCUUCAUGUGGUC-3'	7
ARNic para GFP-hebra as-5'-(n-3)	5'-UCGUGCUGCUUCAUGUGGUC-3'	8
ARNic para GFP-hebra as-3'-(n-2)	5'-AAGUCGUGCUGCUUCAUGUGG-3'	9
ARNic para GFP-hebra as-3'-(n-4)	5'-AAGUCGUGCUGCUUCAUGU-3'	10
ARNic para GFP-hebra as-3'-(n-5)	5'-AAGUCGUGCUGCUUCAUG-3'	11
ARNic para GFP-hebra as-3'-(n-6)	5'-AAGUCGUGCUGCUUCAU-3'	12

Ejemplo 4: Detección de miARN

Se usó el ensayo en condiciones convencionales para evaluar la posibilidad de detectar miARN a partir de lisados tisulares. Como ejemplo, se detectó el miARN-122 específico de hígado de ratón a partir de lisado tisular de ratón (control positivo), yeyuno (control negativo) y a partir de lisado con adiciones conocidas con hebras de miARN-122 generadas de manera sintética (Lagos-Quintana, *et al.* Current Biology, Vol. 12, 735-739.). A partir de la bibliografía se sabe que en el hígado de los ratones se expresan tres tipos diferentes de secuencias de miARN-122:

miARN-122a: 5'-UGGAGUGUGACAAUGGUGUUUG-3' (Seq. ID. No. 13)

miARN-122b: 5'-UGGAGUGUGACAAUGGUGUUUGU-3' (Seq. ID. No. 14)

10 miARN-122c: 5'-UGGAGUGUGACAAUGGUGUUUGA-3' (Seq. ID. No. 15)

Se sintetizaron todos los patrones sintéticos como secuencia de 5'-OH y de 5'-fosfato. Puesto que las tres especies mostraban pequeñas variaciones en el extremo 3', se diseñó la sonda de PNA de modo que coincidiera completamente con las tres secuencias de miARN-122, comenzando en la tercera base del extremo 5' del miARN-122 con 17 bases de longitud:

15 Sonda de PNA: 5'-Atto425-OO-AACACCATTGTCACT-3' (Seq. ID. No. 16)

Se realizó la HPLC con las condiciones que se describieron en el protocolo alternativo detallado en el ejemplo 1 y mostrado en la tabla 3. Los perfiles de HPLC generados a partir de lisado de pulmón de ratón (tejido negativo para miARN122) con adiciones conocidas con miARN-122 generado de manera sintética mostraron tres picos separados. El tiempo de retención de este pico coincide completamente con las señales que se encontraron en lisados de hígado (1 mg de hígado inyectado). La cuantificación del área de pico total y el cálculo de la concentración de miARN-122 total en el hígado condujo a aproximadamente ~35 ng/g. El control negativo de miARN-122 de muestras de yeyuno o tejido pulmonar no mostró señal para miARN-122 tal como se esperaba (figura 6).

Ejemplo 5: Detección de espiegelmero-ADN (L-ADN) con y sin pegilación

Los espiegelmeros son moléculas de aptámero con estructura principal de azúcar de L-ribosa (L-ARN) o L-desoxirribosa (L-ADN) no natural que no muestran interacción de pares de bases de Watson-Crick con los D-oligonucleótidos naturales. Puesto que el PNA es un mimético no quiral de oligonucleótidos con propiedades de pares de bases de Watson-Crick, se esperaba que las sondas de PNA también pudiesen usarse para detectar esta especie de oligonucleótido no natural. Para aumentar la semivida de circulación de espiegelmeros o aptámeros, estas moléculas se pegilan a menudo con PEG de 40 kDa ramificado, que dificulta habitualmente el análisis de estas moléculas complejas. Como prueba de concepto para la detección de esta clase de moléculas terapéuticamente interesantes, se sintetizaron una versión pegilada y una no pegilada de la siguiente secuencia de L-ADN con el ensayo descrito en el presente documento tras la administración orotraqueal en ratones:

Espiegelmero sin PEG:

(NH₂C6)-CCAGCCACCTACTCCACCAGTGCCAGGACTGCTTGAGGGT (Seq. ID. No. 17)

35 Espiegelmero con PEG:

PEG(40kDa)-(NHC6)-CAGCCACCTACTCCACCAGTGCCAGGACTGCTTGAGGGT (Seq. ID. No. 18)

Se usó la siguiente sonda de PNA de 17 meros para la hibridación y detección del espejelmero a partir de muestras de plasma, pulmón, hígado y riñón:

5'-Atto425-00-GTCCTGGCACTGGTGGGA-3' (Seq. ID. No. 19)

- 5 Se ajustaron las condiciones de gradiente a las secuencias de oligonucleótido más largas en comparación con las hebras de ARNic para eluir el dúplex de espejelmero-PNA dentro del gradiente del método de HPLC.

Se aplicaron las siguientes condiciones de HPLC:

- Columna: Dionex DNA Pac PA100 (250 x 4mm)
 - Temperatura: 50°C
- 10
- Eluyente A: Fosfato de sodio; NaCl 100 mM; CAN al 5%
 - Eluyente B: Fosfato de sodio 10 mM; NaCl 1 M; ACN al 5%
 - Eluyente C: ACN al 90%.

Tabla 6: Condiciones de gradiente de HPLC para espejelmero pegilado

Tiempo [min]	Flujo [ml/min]	Eluyente A [%]	Eluyente B [%]	Eluyente C [%]
0,00	1,00	40	20	40
1,00	1,00	40	20	40
10,00	1,00	5	55	40
10,50	1,00	0	60	40
13,50	1,00	0	60	40
14,00	1,00	40	20	40
17,00	1,00	40	20	40

Tabla 7: Condiciones de gradiente de HPLC para espejelmero

Tiempo [min]	Flujo [ml/min]	Eluyente A [%]	Eluyente B [%]	Eluyente C [%]
0,00	1,00	35	25	40
1,00	1,00	35	25	40
10,00	1,00	0	60	40
10,50	1,00	0	60	40
13,50	1,00	0	60	40
14,00	1,00	35	25	40
17,00	1,00	35	25	40

- 15 La sensibilidad del método estaba un poco comprometida para el espejelmero pegilado debido a un ensanchamiento del pico inducido por la polidispersidad del resto de PEG de 40 kDa. El límite de detección inferior aumentó hasta ~ 1 fmol de L-ADN en la columna. No se sometió a prueba la resolución de impurezas más cortas, pero se esperaba que fuese inferior en comparación con las hebras de miARN o ARNic más cortas.

- 20 Se realizó la preparación de las muestras según el protocolo convencional. Los espejelmeros pudieron detectarse fácilmente mediante este procedimiento a partir de plasma y todo el tejido sometido a prueba, como picos individuales nítidos sin casi interferencia de fondo biológico tal como se muestra en la figura 7.

Ejemplo 6: Detección de ARNic a partir de experimentos de transfección *in vitro*

- 25 La detección de ARNic no marcado a partir de experimentos de cultivo celular *in vitro* estaba limitada por el hecho de la alta sensibilidad necesaria y por tanto, sólo fueron satisfactorios enfoques con una etapa de amplificación como PCR para moléculas no modificadas.

La sensibilidad del ensayo de PNA-HPLC estaba en el intervalo para medir ARNic a partir de experimentos de cultivo celular. Se usó un ARNic de 19 pares de bases con una proyección de 2 nt en el extremo 3' de ambas hebras para la transfección de hepatocitos primarios a una concentración de ARNic de 30 nM. Se transfectaron diversas

versiones de este dúplex con secuencias idénticas, que diferían sólo en su extremo 5' de la hebra antisentido. Tras la transfección, se lavaron las células con PBS y luego se lisaron mediante un tratamiento con proteinasa K con una concentración de ~ 2500 células por µl de lisado.

5 Se usó el lisado de cultivo celular para el procedimiento del ensayo de PNA-HPLC y se inyectaron ~ 50000 células por tanda de HPLC en la columna tras la hibridación con la sonda de PNA de hebra antisentido complementaria. En estas condiciones de ensayo, la hebra as intacta y también la especie fosforilada en 5' de la hebra antisentido pudieron detectarse hasta aproximadamente 8000 copias de ARNic por célula (datos no mostrados).

Ejemplo 7: Uso de patrones internos para la normalización (exactitud superior)

10 Para aumentar adicionalmente la exactitud del método, especialmente cuando se usa en un experimento de GxP, puede ser necesario implementar un patrón interno para la normalización. Como prueba de concepto, se alargó una hebra de ARN de 21 meros con de 3 hasta 8 nucleótidos desoxi-T en su extremo 3'. Estos patrones de normalización, junto con la especie de 21 meros y su especie fosforilada en 5', se utilizaron como adiciones conocidas en el plasma y luego se analizaron en condiciones de HPLC y ensayo convencionales (véase el ejemplo 1, especialmente el protocolo alternativo para HPLC y la tabla 3) para detectar ARNic.

15 Todos los patrones alargados eluidos se resolvieron completamente hasta la línea base a partir del 21 mero así como a partir del 21 mero fosforilado en 5' con tiempos de retención superiores. Se observaron algunas interferencias de picos con la secuencia alargada con 3 nucleótidos dT y el 21 mero fosforilado en 5', así como algunas impurezas de síntesis de la hebra alargada eluida conjuntamente con el 21 mero fosforilado en 5'.

20 El ejemplo mostrado en el presente documento es una superposición de cromatogramas de muestras que contienen la hebra as y la hebra fosforilada en 5' mezcladas con la hebra as alargada en 3' con 3, 4 y 5 nucleótidos de desoxitimidina en su extremo 5' (véase la figura 8). Se usaron las siguientes secuencias para los cromatogramas de ejemplo (las letras en mayúscula representan nucleótidos de ARN, las letras en minúscula "c", "g", "a" y "u" representan nucleótidos modificados con O-metilo en 2', "s" representa fosforotioato y "dT" desoxitimidina):

hebra as: 5'-UCGAAGuACUcAGCGuAAGdTsdT-3' (Seq. ID. No. 20)

25 hebra as - 5'-PO₄: 5'-pUCGAAGuACUcAGCGuAAGdTsdT-3' (Seq. ID. No. 21)

hebra as - (dT)_n: 5'-UCGAAGuACUcAGCGuAAGdTdT - (dT)_n-3' con n = 3, 4, 5 (Seq. ID. No. 22, Seq. ID. No. 23, Seq. ID. No. 24)

Sonda de PNA: 5'-Atto425-OO-CTT ACG CTG AGT ACT TC-3' (Seq. ID. No. 25)

Tabla 8: Resolución de picos calculada según la USP

Secuencia	Tiempo de retención [min]	Resolución frente a 5'-PO ₄ (USP)
hebra as	6,23	1,70
hebra as -5'-PO ₄	6,54	-
hebra as +3x 3'-dT	6,68	< 1
hebra as +4x 3'-dT	6,88	2,25
hebra as +5x 3'-dT	7,04	2,75

30 Con este experimento también se demostró que en condiciones de ensayo de ARNic y miARN convencionales puede lograrse una resolución hasta la línea base para oligonucleótidos de hasta 29 meros, que difieren sólo en un nucleótido de longitud.

Ejemplo 8: Aumento de la sensibilidad del ensayo en tejidos

35 La sensibilidad del ensayo tal como se describió anteriormente estaba restringida a ~2 ng de ARNic por g de tejido. Esta limitación venía dada por el hecho de que la cantidad máxima de tejido cargado en la columna era de 2-3 mg por inyección, ya que el ruido de la línea base aumentaba a cargas de tejido superiores. El cambio del colorante Atto610 al colorante Atto425 permite cargas en la columna mucho más altas de hasta 11 mg sin pérdida de sensibilidad de la señal y potencia de resolución cromatográfica. La cantidad absoluta de ARNic en el LOD es todavía de 250 amol de oligonucleótido en la columna. Esto conduce a un límite de detección inferior con respecto a
40 la concentración tisular de ARNic de ~ 400 pg/g (figura 9).

En la tabla 9 a continuación se muestra una comparación entre dos tandas cromatográficas de la misma muestra de tejido, aunque dos preparaciones de tejido separadas. En el cromatograma superior se cargaron 3 mg de hígado en

la columna de HPLC, en el cromatograma inferior se cargaron 11,2 mg.

Aunque los resultados se generaron a partir de dos lisados tisulares diferentes, las concentraciones de metabolito y ARN_i tisular calculadas muestran sólo una variación menor:

Tabla 9: Valores de señal/ruido de muestra de tejido idéntica; diferentes cantidades de tejido cargadas sobre la columna de HPLC

5

N.º de pico	3 mg de tejido cargado en HPLC			11 mg de tejido cargado en HPLC			Conc. de tejido
	Tiempo de ret.	Conc. de tejido	S/R	Tiempo de ret.	Conc. de tejido	S/R	
1	4,67	17,1	67	4,59	13,5	26,8	3,5
2	5,10	4,8	18	5,02	4,3	8,3	0,6
3	5,55	20,6	87	5,47	17,5	22,8	3,1
4	5,86	19,4	81	5,80	16,3	17,9	3,0
5	6,16	10,4	44	6,09	9,0	8,7	1,3
6	6,47	14,3	61	6,42	12,5	15,7	1,8
7	6,88	7,7	33	6,83	6,8	9,8	0,9

Lista de secuencias

<110> F. Hoffmann - La Roche AG

<120> Método de detección de oligonucleótidos

10

<130> 25305

<160> 25

15

<170> PatentIn versión 3.5

<210> 1

<211> 15

<212> ADN

20

<213> Secuencia artificial

<220>

<223> estructura principal: ácido nucleico peptídico

25

<400> 1

tcgtgctgct tcatg 15

<210> 2

<211> 15

30

<212> ADN

<213> Secuencia artificial

<220>

<223> estructura principal: ácido nucleico peptídico

35

<400> 2

tcgtgctgct tcatg 15

<210> 3

40

<211> 15

<212> ADN

<213> Secuencia artificial

<220>

45

<223> estructura principal: ácido nucleico peptídico

<400> 3

acatgaagca gcacg 15

50

<210> 4

<211> 21
 <212> ADN
 <213> Secuencia artificial

5 <220>
 <223> ARNic para GFP-hebra s

<400> 4
 ccacaugaag cagcacgacu u 21

10 <210> 5
 <211> 23
 <212> ADN
 <213> Secuencia artificial

15 <220>
 <223> ARNic para GFP-hebra as

<400> 5
 aagucgugcu gcucaugug guc 23

<210> 6
 <211> 22
 <212> ADN
 25 <213> Secuencia artificial

<220>
 <223> metabolito de ARNic para GFP-hebra as-5'-(n-1)

30 <400> 6
 agucgugcug cucaugugg uc 22

<210> 7
 <211> 21
 35 <212> ADN
 <213> Secuencia artificial

<220>
 <223> metabolito de ARNic para GFP-hebra as-5'-(n-2)

40 <400> 7
 gucgugcugc uucauguggu c 21

<210> 8
 45 <211> 20
 <212> ADN
 <213> Secuencia artificial

<220>
 50 <223> metabolito de ARNic para GFP-hebra as-5'-(n-3)

<400> 8
 ucgugcugcu ucaugugguc 20

55 <210> 9
 <211> 21
 <212> ADN
 <213> Secuencia artificial

60 <220>
 <223> metabolito de ARNic para GFP-hebra as-3'-(n-2)

<400> 9
 aagucgugcu gcucaugug g 21

65 <210> 10

<211> 19
 <212> ADN
 <213> Secuencia artificial

5 <220>
 <223> metabolito de ARNic para GFP-hebra as-3'-(n-4)

<400> 10
 aagucgugcu gcuucaugu 19

10 <210> 11
 <211> 18
 <212> ADN
 <213> Secuencia artificial

15 <220>
 <223> metabolito de ARNic para GFP-hebra as-3'-(n-5)

<400> 11
 aagucgugcu gcuucaug 18

<210> 12
 <211> 17
 <212> ADN
 25 <213> Secuencia artificial

<220>
 <223> metabolito de ARNic para GFP-hebra as-3'-(n-6)

30 <400> 12
 aagucgugcu gcuucau 17

<210> 13
 <211> 22
 35 <212> ARN
 <213> *Mus musculus*

<400> 13
 uggaguguga caaugguguu ug 22

40 <210> 14
 <211> 23
 <212> ARN
 <213> *Mus musculus*

45 <400> 14
 uggaguguga caaugguguu ugu 23

<210> 15
 50 <211> 23
 <212> ARN
 <213> *Mus musculus*

<400> 15
 55 uggaguguga caaugguguu uga 23

<210> 16
 <211> 17
 <212> ADN
 60 <213> Secuencia artificial

<220>
 <223> estructura principal: ácido nucleico peptídico

65 <400> 16
 aacaccattg tcacact 17

<210> 17
 <211> 40
 <212> ADN
 5 <213> Secuencia artificial

 <220>
 <223> Espieglmero con estructura principal de L-desoxirribosa

 10 <400> 17
 ccagccacct actccaccag tgccaggact gcttgagggt 40

 <210> 18
 <211> 40
 15 <212> ADN
 <213> Secuencia artificial

 <220>
 <223> Espieglmero con estructura principal de L-desoxirribosa
 20
 <220>
 <221> misc_feature
 <222> (1)..(1)
 <223> Nucleótido conjugado con PEG
 25
 <400> 18
 ccagccacct actccaccag tgccaggact gcttgagggt 40

 <210> 19
 <211> 17
 30 <212> ADN
 <213> Secuencia artificial

 <220>
 35 <223> estructura principal de ácido nucleico peptídico

 <400> 19
 gtcctggcac tgggtga 17

 40 <210> 20
 <211> 21
 <212> ADN
 <213> Secuencia artificial

 45 <220>
 <223> hebra antisentido de ARNic patrón interno

 <400> 20
 ucgaaguacu cagcguaagt t 21
 50
 <210> 21
 <211> 21
 <212> ADN
 <213> Secuencia artificial
 55
 <220>
 <223> hebra antisentido de ARNic patrón interno

 <400> 21
 60 ucgaaguacu cagcguaagt t 21

 <210> 22
 <211> 27
 <212> ADN
 65 <213> Secuencia artificial

<220>
<223> hebra antisentido de ARN ic patrón interno
<400> 22
tttucgaagu acucagcgua agtttt 27
5
<210> 23
<211> 29
<212> ADN
<213> Secuencia artificial
10
<220>
<223> hebra antisentido de ARN ic patrón interno

<400> 23
15 tttucgaag uacucagcgu aagttttt 29

<210> 24
<211> 31
<212> ADN
20 <213> Secuencia artificial

<220>
<223> hebra antisentido de ARN ic patrón interno
25 <400> 24
ttttucgaa guacucagcg uaagttttt t 31

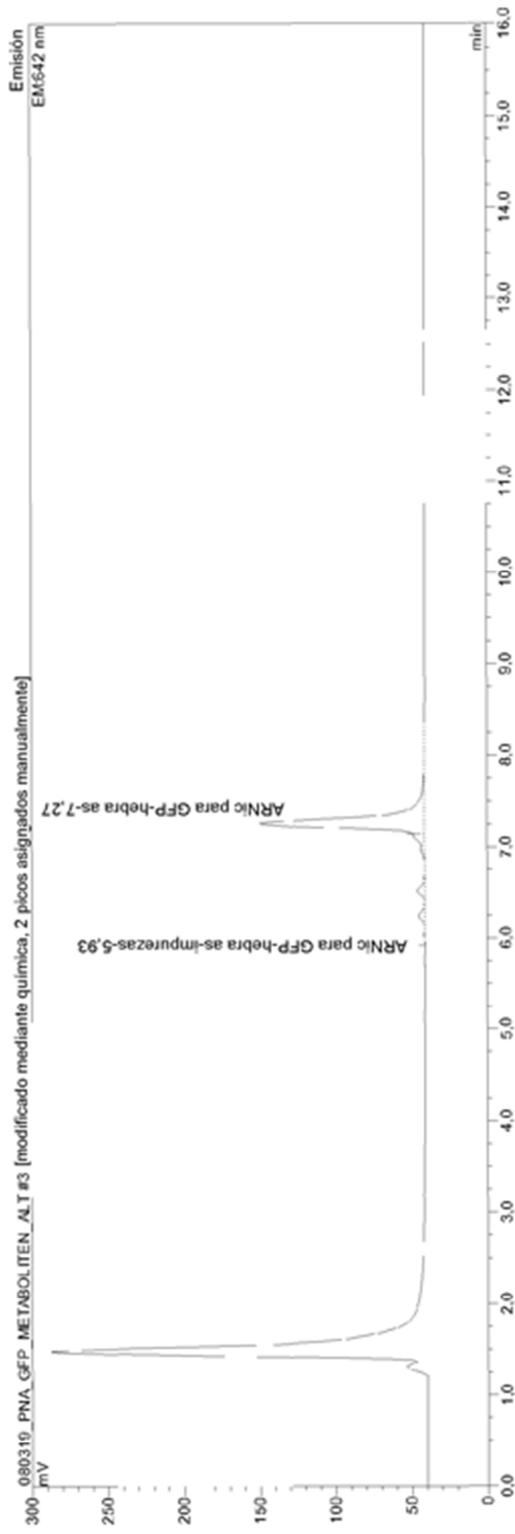
<210> 25
<211> 17
30 <212> ADN
<213> Secuencia artificial

<220>
<223> estructura principal de ácido nucleico peptídico
35 <400> 25
cttacgctga gtacttc 17

REIVINDICACIONES

1. Método para detectar un oligonucleótido y sus metabolitos de oligonucleótido, en el que el oligonucleótido es un oligonucleótido de ARN seleccionado del grupo que consiste en ARN de interferencia cortos (ARNic) y microARN (miARN), que comprende las etapas de
- 5 (a) seleccionar una muestra biológica que contiene o se sospecha que contiene dicho oligonucleótido de ARN, en el que la muestra es lisado tisular o plasma,
- (b) combinar dicha muestra biológica con una sonda de ácido nucleico peptídico (PNA) marcada fluorescentemente que es completamente complementaria a al menos 10 nucleótidos de dicho oligonucleótido de ARN formando de ese modo restos hibridados entre dicha secuencia de oligonucleótido de ARN y dicha sonda de PNA,
- 10 (c) separar dichos restos hibridados de los restos no hibridados mediante cromatografía de líquidos de alto rendimiento de intercambio aniónico (HPLC) en condiciones en las que la sonda de PNA no hibridada se eluye en el volumen inicial, y
- (d) detectar cuantitativamente dichos restos hibridados mediante espectroscopía de fluorescencia.
- 15 2. Método según la reivindicación 1 para detectar ambas hebras de un dúplex de oligonucleótido de ARNic en paralelo a partir de una muestra, en el que dicha muestra se pone en contacto con una sonda de PNA marcada fluorescentemente complementaria completamente a al menos 10 nucleótidos de la hebra sentido de dicho oligonucleótido de ARN y una sonda de PNA marcada fluorescentemente complementaria completamente a al menos 10 nucleótidos de la hebra antisentido de dicho oligonucleótido de ARN en la etapa (b) y luego se realizan las etapas (c) a (d), en el que (i) las dos sondas de PNA se diseñan de manera que la hibridación conduce a diferentes
- 20 tiempos de retención de las dos hebras individuales, o (ii) se usan dos marcadores de fluorescencia diferentes.
3. Método según la reivindicación 1 ó 2, para el análisis cuantitativo del metabolismo *in vivo* de ARNic terapéutico y sus derivados.
4. Método según la reivindicación 1 ó 2, para el análisis cuantitativo de ARNic extracelular y suministrado intracelularmente.
- 25 5. Método según la reivindicación 1 ó 2, en el que se añade a la muestra una concentración conocida del oligonucleótido de ARN que debe detectarse.
6. Método según las reivindicaciones 1 a 5, en el que la sonda de PNA se marca con Atto 610, Atto 425 o Atto 520.

Fig. 1



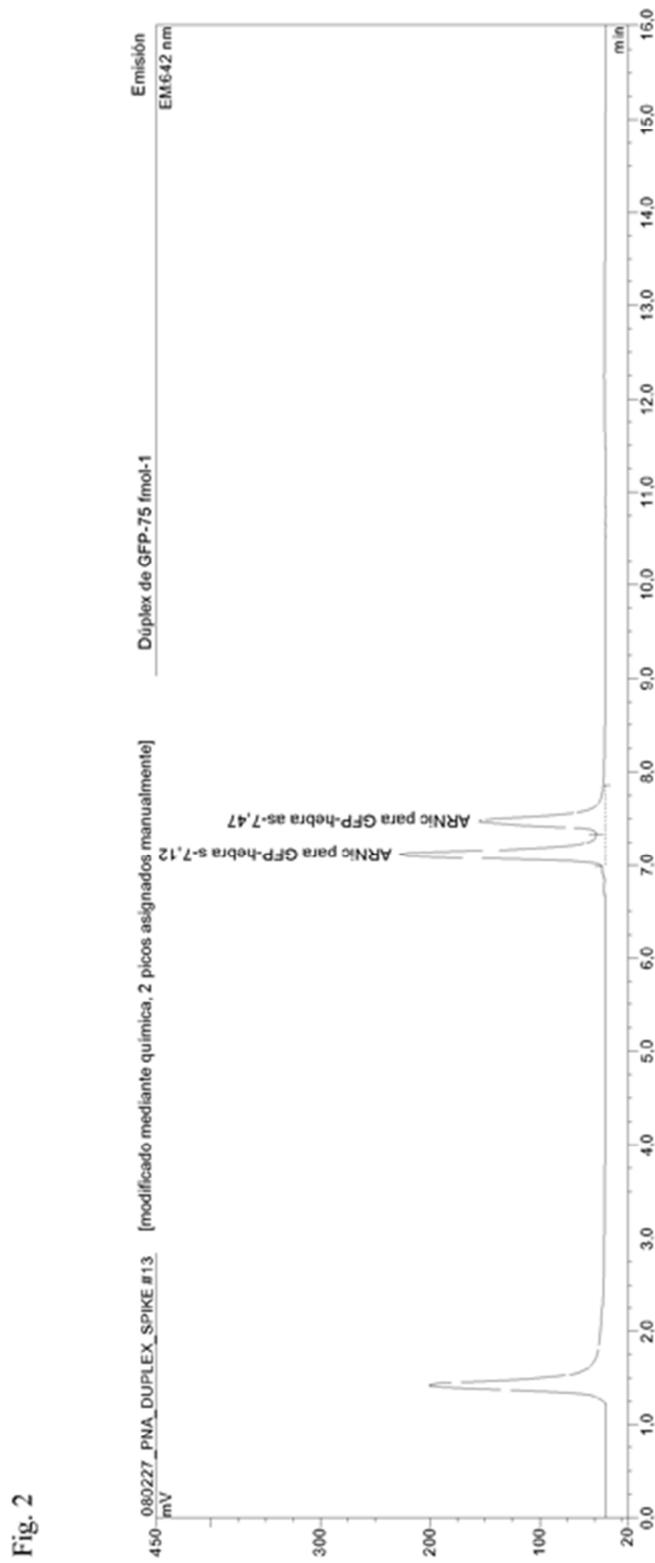
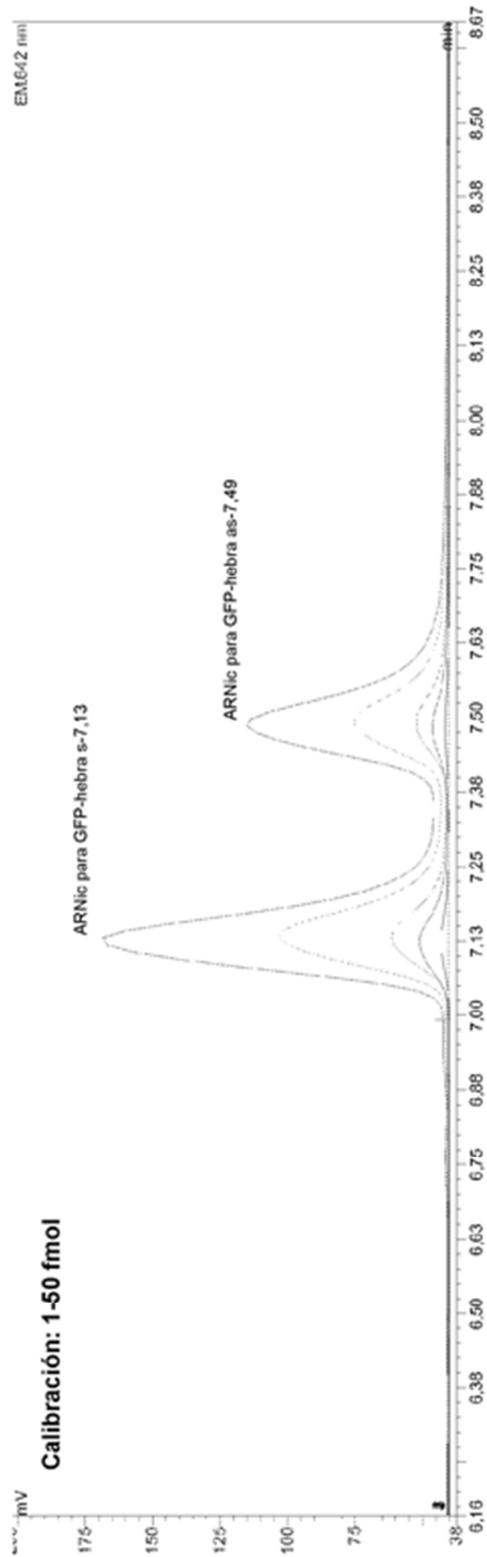


Fig. 2

Fig. 3



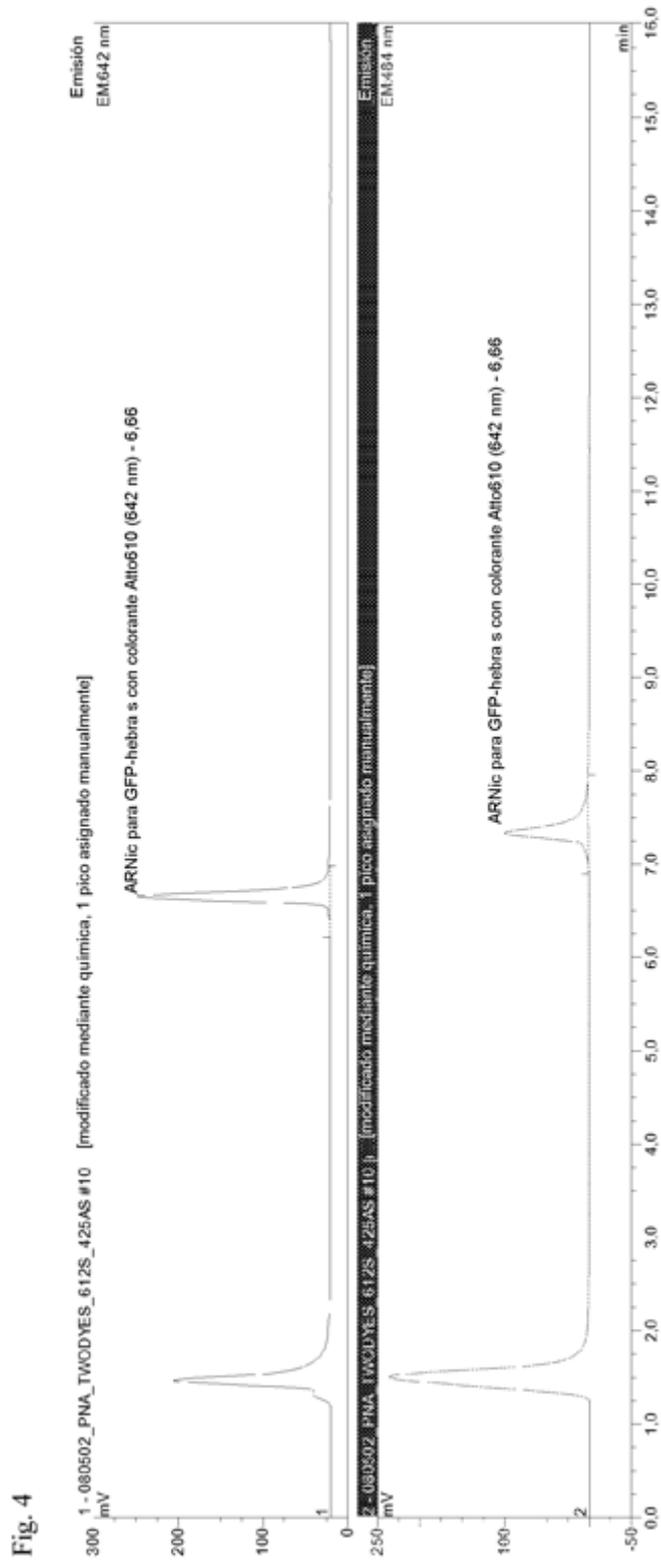
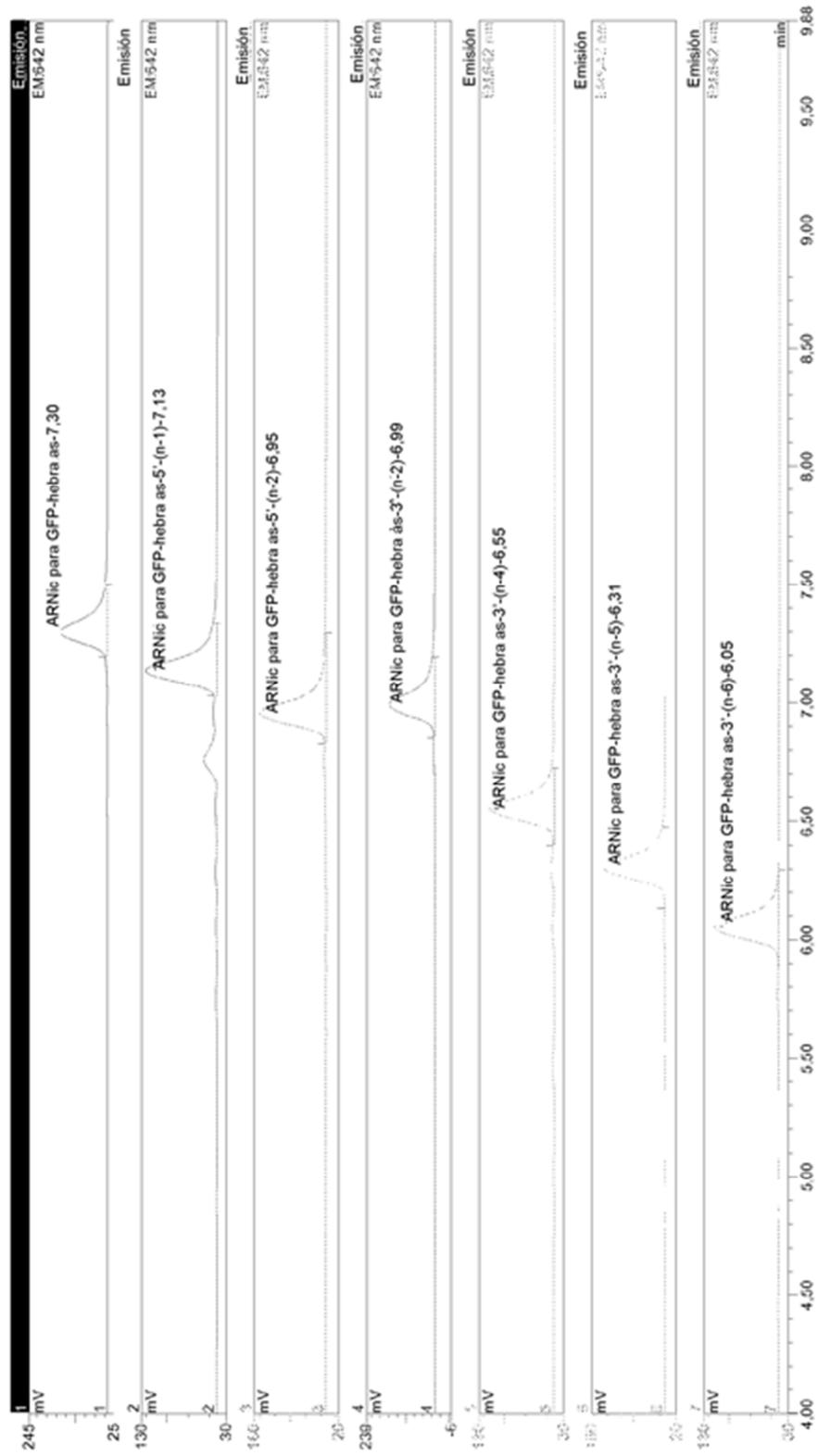


Fig. 5



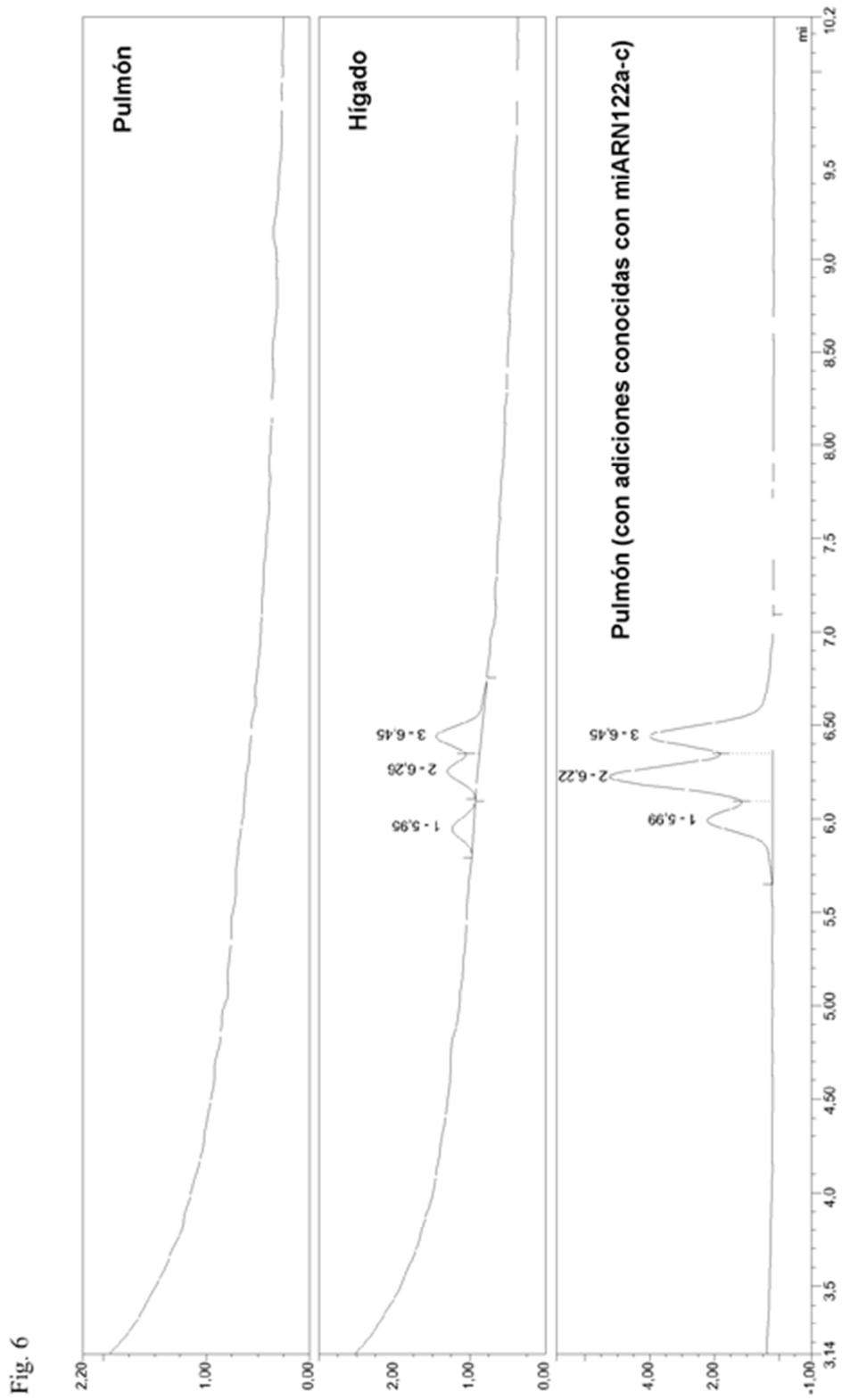


Fig. 6

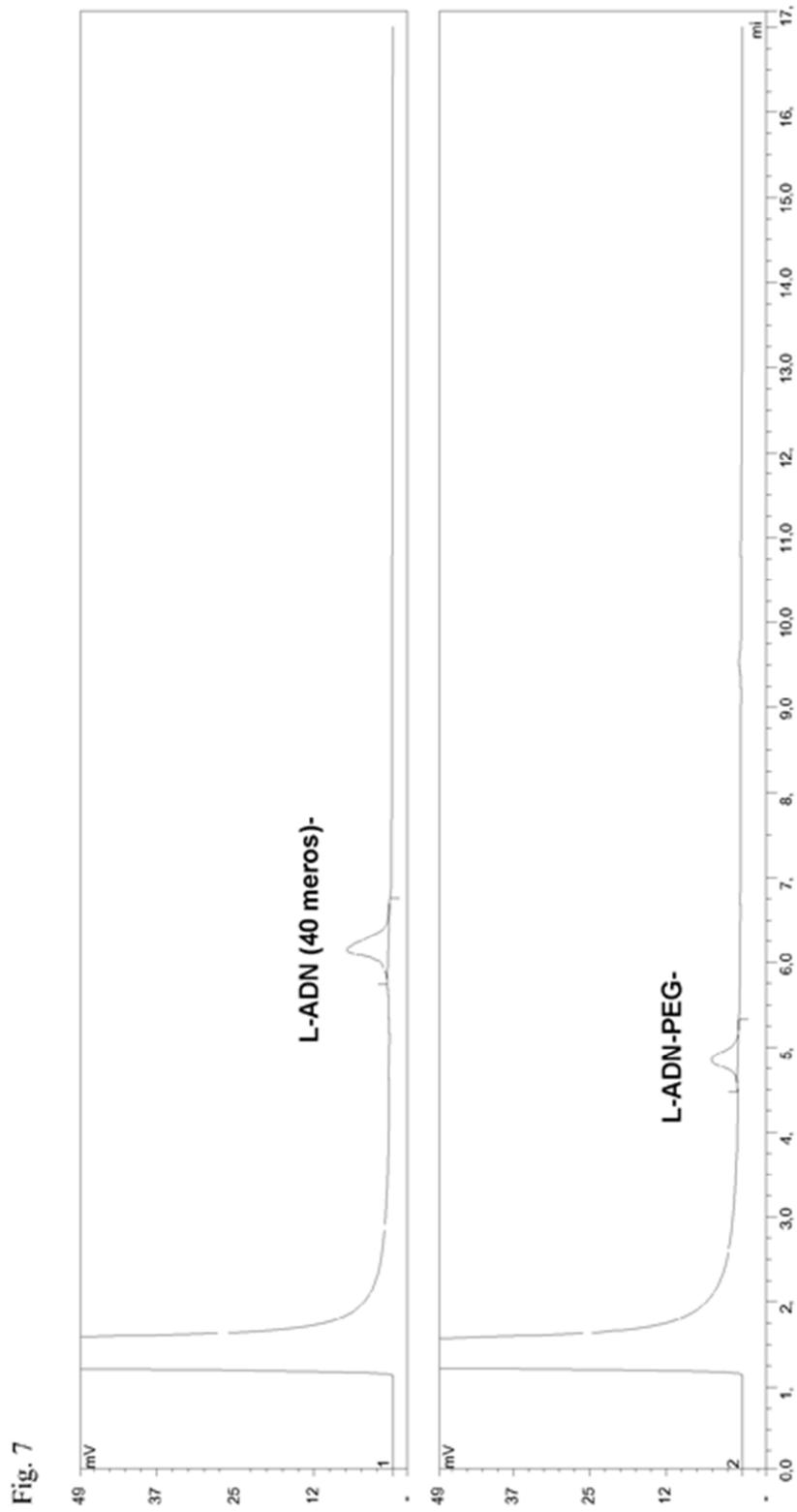


Fig. 7

