

19



OFICINA ESPAÑOLA DE
PATENTES Y MARCAS

ESPAÑA



11 Número de publicación: **2 645 733**

51 Int. Cl.:

C12Q 1/68

(2006.01)

12

TRADUCCIÓN DE PATENTE EUROPEA

T3

96 Fecha de presentación y número de la solicitud europea: **13.03.2012** E 12159196 (0)

97 Fecha y número de publicación de la concesión europea: **02.08.2017** EP 2639312

54 Título: **Inmunoensayo para la detección de miARNs**

45 Fecha de publicación y mención en BOPI de la traducción de la patente:
07.12.2017

73 Titular/es:

**SIEMENS HEALTHCARE DIAGNOSTICS INC.
(25.0%)
511 Benedict Avenue
Tarrytown, NY 10591-5098 , US;
SIEMENS HEALTHCARE DIAGNOSTICS
PRODUCTS GMBH (25.0%);
SIEMENS HEALTHCARE GMBH (25.0%) y
SIEMENS HEALTHCARE DIAGNOSTICS
HOLDING GMBH (25.0%)**

72 Inventor/es:

**KAPPEL, ANDREAS;
KELLER, ANDREAS;
STÄHLER, CORD FRIEDRICH;
WRIGHT, IAN;
ANDERSON-MAUSER, LINDA MARIE;
BEDZYK, WILLIAM;
SCHWARZ, HERBERT y
WICKE, MICHAELA**

74 Agente/Representante:

CARVAJAL Y URQUIJO, Isabel

ES 2 645 733 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

Inmunoensayo para la detección de miARNs

Campo de la invención

La presente invención se relaciona con métodos para detectar un microARN en una muestra biológica.

5 Antecedentes de la invención

Muy recientemente, el diagnóstico molecular ha ganado cada vez más importancia. Ha encontrado una entrada en el diagnóstico clínico de enfermedades (entre otras, la detección de patógenos infecciosos, la detección de mutaciones del genoma, la detección de células enfermas y la identificación de factores de riesgo para la predisposición a una enfermedad). Sin embargo, entretanto los métodos de diagnóstico molecular también están encontrando sus usos en medicina veterinaria, análisis ambiental y pruebas de alimentos. En particular, a través de la determinación de la expresión génica en los tejidos, el análisis de ácidos nucleicos abre nuevas posibilidades muy prometedoras en el estudio y diagnóstico de la enfermedad. Con el fin de reducir los costes y mantener el tiempo de procesamiento desde la recepción de la muestra hasta la determinación del resultado analítico (también denominado "tiempo de resultado") tan corto como sea posible, es un objetivo prioritario hacer que los métodos para detectar ácidos nucleicos sean tan eficientes como sea posible y en la medida de lo posible realizarlas con automatización. Esto se aplica especialmente a los diagnósticos. Los procedimientos que pueden llevarse a cabo en recipientes de reacción que difieren lo menos posible y pueden llevarse a cabo en formatos estandarizados (por ejemplo, un formato de placa de microtitulación de 96 pozos) son bien adecuados para la automatización ya que en estos métodos pueden utilizarse robots de pipeteo eficientes. Por lo tanto, en el estado de la técnica existe la necesidad de un análisis de muestras simple, eficiente y automatizable.

Hoy en día, las secuencias específicas de ácido nucleico se detectan o cuantifican típicamente por, por ejemplo, ensayos de hibridación heterogénea, métodos de PCR o secuenciación directa. Ese tipo de ensayos típicamente tienen un tiempo bastante largo de dar resultados, lo que los hace difíciles de aplicar para situaciones médicas críticas, por ejemplo, en el curso de eventos cardíacos. Además, las pruebas actuales no son adaptables a los analizadores de inmunoensayo, que son las plataformas más destacadas en marcos de laboratorio clínico o de puntos de atención, tales como salas de emergencia.

Los ácidos nucleicos de interés que se han de detectar incluyen ADN genómico, ARNm expresado y otros ARNs tales como MicroARNs (abreviado como miARNs). Los miARNs son una nueva clase de ARNs pequeños con diversas funciones biológicas (A. Keller et al., Nat Methods., 2011 8(10):841-3). Son moléculas de ácido ribonucleico (ARN) cortas (promedio de 20-24 nucleótidos) encontradas en células eucariotas. Se han identificado varios cientos de especies diferentes de microARNs (es decir, varios cientos de secuencias diferentes) en mamíferos. Son importantes para la regulación de genes posttranscripcionales y se enlazan a secuencias complementarias en las transcripciones de ARN mensajero diana (mARNs), que pueden conducir a la represión traslacional o a la degradación del objetivo y al silenciamiento de genes. Como tales, también pueden utilizarse como marcadores biológicos para fines de investigación, diagnóstico y terapia. En el estado de la técnica anterior, también se detectan y cuantifican miARNs mediante ensayos de hibridación heterogénea o secuenciación directa. Es un reto particular cuantificar de manera fiable los miARNs, ya que estos son de manera intrínseca químicamente inestables y propensos a la degradación. Esto se debe a la inestabilidad química del ARN, el hecho de que los miARN están presentes como ácidos nucleicos de cadena sencilla y debido a su corta longitud.

En un enfoque diferente, Quavit et al. (Anal. Chem., 2011, 83(15), pp 5949-5956) emplean sensores gravimétricos recubiertos con oligonucleótidos para enlazar miARNs. Los híbridos resultantes están enlazados por anticuerpos anti ADN:ARN y la diferencia de masa entre híbrido e híbrido con anticuerpo enlazado se detecta gravimétricamente. Dado que las sondas de ácido nucleico son parte del sensor, este enfoque es inflexible con respecto al ácido nucleico diana de interés, ya que un sensor individual necesita configurarse para cada ácido nucleico diana de interés.

Un problema adicional es que muchas aplicaciones en la investigación y diagnóstico molecular biológico requieren la determinación de la cantidad o concentración de ácidos nucleicos particulares en una muestra. El método estándar para cuantificar ácidos nucleicos es por reacción de PCR, empleando un patrón interno de concentración conocida y/o utilizando PCR en tiempo real. De manera desventajosa, sin embargo, estos métodos tienen un intervalo dinámico limitado. El intervalo dinámico típico está entre 1 a 100 y 1 a 1.000, pero el intervalo de concentraciones de ácido nucleico a medir es a menudo claramente más grande, por ejemplo 1 a 1.000.000. Además, los métodos de PCR se han percibido como poco fiables para la cuantificación debido a la posibilidad de contaminación y cinética enzimática no lineal.

Definiciones

A menos que se defina lo contrario, los términos técnicos y científicos usados aquí tienen el mismo significado que comúnmente entiende una persona experimentada en la técnica a la que pertenece esta invención.

5 El término "anticuerpo", como se usa aquí, se refiere a una proteína de inmunoglobulina o un fragmento del mismo, siendo dicho fragmento capaz de enlazar específicamente a un antígeno. Un anticuerpo, que incluye un fragmento de anticuerpo, adecuado para la invención, puede ser monoclonal, policlonal, de cualquier fuente de organismo huésped, expresado de forma recombinante o producido artificialmente de otro modo y de cualquier tipo de inmunoglobulina. En el contexto de la invención, el anticuerpo es capaz de enlazar a un antígeno que comprende un híbrido de una molécula de ácido nucleico de interés y una sonda de ácido nucleico.

10 El término "hibridación", tal como se utiliza aquí, se refiere al proceso de combinación de ácidos nucleicos de cadena sencilla complementarios o análogos de nucleótidos en una única molécula de doble cadena, el denominado "híbrido". Los nucleótidos o análogos de nucleótidos se enlazarán a su complemento bajo condiciones normales, de modo que dos cadenas complementarias se enlazarán entre sí fácilmente. Se pueden usar sondas de cadena sencilla para encontrar secuencias diana complementarias. Si tales secuencias existen en la muestra, las sondas se hibridarán a dichas secuencias que pueden entonces ser detectadas.

15 El término "inmunoensayo", tal como se usa aquí, se refiere a la detección o cuantificación de un analito, tal como un ácido nucleico de interés, que comprende una reacción inmune entre un anticuerpo y un antígeno. En el contexto de la invención, el analito a detectar o cuantificar comprende un microARN de interés.

20 Una "unidad estructural marcadora" en el sentido de la invención, tendrá el significado corriente de este término que es bien conocido por la persona experimentada en la técnica de biología molecular. La unidad estructural marcadora puede comprender un compañero de enlace de un par de enlace específico, en el que la reacción de enlace respectiva se utiliza para acoplar la unidad estructural marcadora a un marcador detectable. Además, la propia unidad estructural marcadora puede comprender cualquier marcador detectable. La detección puede conseguirse de cualquier manera adecuada, por ejemplo, por detección óptica, detección química, detección electroquímica, detección radiactiva, detección magnética o cualquier otro modo adecuado de detección. Ejemplos de unidades estructurales marcadoras incluyen marcadores enzimáticos, marcadores cromogénicos, marcadores fluorescentes, marcadores quimioluminiscentes, marcadores radiactivos y marcadores magnéticos.

El término "marcador" o "biomarcador" se refiere a una molécula biológica, por ejemplo, un ácido nucleico, péptido, proteína, hormona, etc., cuya presencia o concentración puede detectarse y correlacionarse con una condición conocida, tal como un estado patológico.

30 El término "ácido nucleico" pretende indicar cualquier molécula de ácido nucleico y/o moléculas análogas compuestas por una secuencia de nucleótidos que incluye ADN, ADNc y/o ADN genómico, ARN, preferiblemente miARN, ácido nucleico peptídico (ANP), ácido nucleico cerrado (ANL) y/o morfolino.

35 "Ácido nucleico de interés", dentro del significado de la invención se refiere a un microARN diana que ha de ser detectado y/o cuantificado. En particular, este término se refiere a un microARN que tiene una secuencia específica predeterminada.

40 Las "sondas de ácido nucleico", en el sentido de la invención, tendrán el significado corriente de este término que es bien conocido por el experto en la materia de biología molecular. En una realización preferida de la invención se entenderá que son moléculas polinucleótidas que tienen una secuencia idéntica, complementaria u homóloga al complemento de regiones de un microARN diana de interés que ha de ser detectado o cuantificado. En otra realización más, los análogos de nucleótidos también están comprendidos para ser usados como sondas de ácido nucleico.

45 Los términos "muestra", "muestra biológica" o "muestra clínica", tal como se utilizan aquí, se refieren a cualquier muestra que contenga un ácido nucleico de interés. Se puede obtener una muestra de un paciente. La muestra puede ser de cualquier tejido o fluido biológico. Tales muestras incluyen, pero no se limitan a, esputo, sangre, suero, plasma, células sanguíneas (por ejemplo, glóbulos blancos), tejido, muestras de biopsia, muestras de frotis, muestras de lavado, muestras de hisopo, fluidos corporales que contienen células, ácidos nucleicos de flotación libre, orina, fluido peritoneal y líquido pleural, líquido cefalorraquídeo, orina, heces, fluido lagrimal o células del mismo. Las muestras biológicas también pueden incluir secciones de tejidos tales como secciones congeladas o fijas tomadas con fines histológicos o células microdisecadas o partes extracelulares de las mismas.

50 El término "fase sólida", tal como se utiliza aquí, se refiere a un objeto que consiste en un material poroso y/o no poroso que es insoluble en el sistema disolvente usado (por ejemplo, insoluble en agua). Puede tener una gran variedad de formas tales como vasos, tubos, placas, esferas, micropartículas, varillas, tiras, papel de filtro, papel de cromatografía, etc. El término "fase sólida enlazada" se refiere a un objeto, tal como un anticuerpo, estando unido a la fase sólida de tal manera que no se separe y se disuelva en solución cuando se realizan los métodos de la invención

descritos aquí. El enlace se puede conseguir, por ejemplo, por fisisorción, quimisorción, enlace covalente, como se conoce en la técnica.

Objeto de la invención

5 El problema técnico subyacente a la presente invención es proporcionar un método para la detección de microARNs que sea fácilmente adaptable a microARNs con diferentes secuencias y que sea fácilmente adaptable a plataformas de laboratorio automatizadas o marcos de tipo punto de atención.

Es otro objeto de la invención proporcionar un método para la detección de microARNs que permita obtener resultados cuantificables con un intervalo dinámico mejorado.

10 Estos objetos se cumplen con los métodos de acuerdo con las reivindicaciones independientes de la presente invención. Las reivindicaciones dependientes están relacionadas con realizaciones preferidas.

Resumen de la invención

15 La invención se relaciona con un método de detección de microARNs mediante detección por inmunoensayo. La detección de un microARN específico de interés se logra utilizando una sonda de ácido nucleico en solución que se hibrida en solución a la molécula de ácido nucleico de interés. La detección de inmunoensayo se consigue utilizando un anticuerpo específico para el híbrido formado por hibridación de la sonda de ácido nucleico al microARN de interés.

20 La detección de un microARN específico de interés se logra utilizando una sonda de ácido nucleico disuelta que se hibrida al microARN de interés. La detección de inmunoensayo se consigue mediante un anticuerpo específico para el híbrido formado por hibridación de la sonda de ácido nucleico al microARN de interés. El anticuerpo puede proporcionarse en una forma que está enlazada a una fase sólida. Alternativamente, el anticuerpo puede proporcionarse en solución y el microARN de interés puede detectarse en un inmunoensayo homogéneo. El híbrido se proporciona en solución. Esta solución se pone en contacto con el anticuerpo. El anticuerpo se enlazará al híbrido y se podrá detectar el complejo de anticuerpo e híbrido enlazado. Esto permite una fácil adaptación a microARNs con diferentes secuencias y una fácil adaptación a plataformas de laboratorio automatizadas o a marcos de tipo punto de atención y dispositivos. Tal anticuerpo puede, por ejemplo, obtenerse inmunizando un organismo huésped con el híbrido respectivo (por ejemplo, un híbrido de ARN:ADN) y recolectando anticuerpos o células productoras de anticuerpos, como es conocido en la técnica.

Los métodos de la invención permiten una detección y cuantificación rápida y homogénea de miARN específicos.

30 Como los inmunoensayos tienen típicamente tiempos cortos para dar resultado y son adaptables a analizadores de inmunoensayo, este novedoso formato de ensayo supera los problemas de los formatos de las pruebas actuales mencionadas anteriormente.

Para satisfacer la necesidad de un sistema de ensayo flexible para la detección y/o cuantificación de miARNs, por ejemplo, en un campo de laboratorio clínico, la presente invención proporciona un método para la detección de inmunoensayos de miARN específicos. Esto proporciona una alternativa a los métodos existentes. La invención se refiere a un método para detectar un microARN de interés en una muestra, que comprende las siguientes etapas:

- 35
- proporcionar una sonda de ácido nucleico en solución;
 - hibridación del microARN de interés a la sonda de ácido nucleico para obtener híbridos de dicho microARN de interés y dicha sonda de ácido nucleico;
 - enlazar dicho híbrido a un anticuerpo capaz de enlazarse específicamente a híbridos de ácido nucleico, en el que el anticuerpo está enlazado a una fase sólida; y
- 40
- detectar el híbrido enlazado al anticuerpo

45 De acuerdo con este aspecto, el enlace del anticuerpo al híbrido se consigue trayendo el anticuerpo enlazado a la fase sólida en contacto con la solución que contiene el híbrido. Debido a que uno de los compañeros de enlace que forman el complejo detectable de anticuerpo e híbrido está enlazado a la fase sólida, este aspecto de la invención se puede referir como un formato "heterogéneo". Una ventaja particular de este formato radica en la capacidad de proporcionar una fase sólida con un anticuerpo enlazado, en el que el anticuerpo sirve como una unidad estructural universal de captura para los híbridos. Esto permite formatos de ensayo convenientes, en los que el anticuerpo está prerrecubierto sobre formatos de fase comúnmente usados vendidos tales como placas de microtitulación, tiras reactivas, artículos y similares.

En un aspecto adicional, la invención se relaciona con un método para detectar un microARN de interés en una muestra, que comprende las siguientes etapas:

- proporcionar una sonda de ácido nucleico en solución;
- 5 - hibridación del microARN de interés a la sonda de ácido nucleico para obtener híbridos de dicho microARN de interés y dicha sonda de ácido nucleico;
- enlazar dicho híbrido a un anticuerpo capaz de enlazar específicamente a híbridos de ácido nucleico, en el que el anticuerpo está en solución; y
- detectar el híbrido enlazado al anticuerpo en solución.

10 De acuerdo con este aspecto alternativo, el enlace del anticuerpo al híbrido se consigue trayendo el anticuerpo en solución en contacto con la solución que contiene el híbrido. Debido a que ambos compañeros de enlace forman el complejo detectable de anticuerpo y el híbrido estando en solución, este aspecto de la invención se puede referir como un formato "homogéneo".

15 Tanto en el formato homogéneo como en el heterogéneo, la sonda de ácido nucleico se proporciona en solución y la hibridación tiene lugar en solución. Esto hace que ambos formatos sean fácilmente adaptables a la detección de diferentes microARNs de interés (por consiguiente seleccionando la sonda de ácido nucleico), y también hace que ambos formatos sean fácilmente adaptables a sistemas de análisis automatizados tales como los que se usan comúnmente en laboratorios clínicos. El anticuerpo está enlazado a un antígeno competitivo antes del enlace de dicho primer híbrido y dicho híbrido es detectado por desplazamiento del antígeno competitivo.

20 El antígeno competitivo es un híbrido competitivo de ácidos nucleicos. Además, el híbrido competitivo porta una unidad estructural marcadora. Pueden emplearse tecnologías de detección bien conocidas para inmunoensayos competitivos, tales como FRET (transferencia de energía por resonancia de fluorescencia) o EMIT (técnica de inmunoensayo multiplicado por enzimas).

25 Ventajosamente, los métodos de la invención permiten la detección de muchas especies diferentes (es decir, que tienen diferentes secuencias) de microARNs de interés con el mismo anticuerpo que actúa como una unidad estructural universal de captura. La detección específica de una especie individual se consigue utilizando una sonda de ácido nucleico que se hibrida a las especies individuales del ácido nucleico de interés. Además, ventajosamente, estos métodos ofrecen un alto intervalo dinámico. Los inmunoensayos ofrecen rutinariamente un intervalo dinámico de 1:1.000 a 1:100.000 que puede aumentarse fácilmente mediante la realización de una simple serie de dilución.

De acuerdo con un aspecto adicional de la invención, la sonda de ácido nucleico es un ADN.

30 De acuerdo con un aspecto adicional de la invención, el anticuerpo es específico para híbridos de ADN/miARN. La sonda de ácido nucleico puede marcarse con una unidad estructural marcadora. De acuerdo con una realización preferida, la unidad estructural marcadora se proporciona por biotilación de la sonda de ácido nucleico.

35 Como varios cientos de especies de miARN son conocidas en seres humanos, los métodos de la invención son particularmente adecuados para la detección y cuantificación de miARNs. Simplemente proporcionando la sonda de ácido nucleico apropiada es posible adaptar los métodos de la invención para la detección de cualquier número de miARNs.

40 De acuerdo con un aspecto adicional de la invención, la detección es una detección cuantitativa. Si se desea, la concentración se puede medir como una concentración absoluta, por ejemplo, utilizando un estándar interno (un ácido nucleico conocido con una concentración inicial conocida, que se añade a la muestra o se amplifica y se mide en paralelo). En muchos casos puede ser suficiente determinar la concentración relativa del ácido nucleico de interés en la muestra de prueba frente a una muestra de referencia, por ejemplo, comparando una muestra de un paciente con una muestra de un control sano.

45 De acuerdo con un aspecto adicional de la invención, una pluralidad de microARNs diferentes de interés se detectan usando una respectiva pluralidad de sondas de ácido nucleico. Se divulga además un kit para detectar un microARN de interés en una muestra, siendo útil dicho kit para llevar a cabo los métodos de la invención, que comprende al menos una sonda de ácido nucleico en solución o en una forma soluble y un anticuerpo capaz de enlazar a un híbrido de dicho microARN de interés a dicha sonda de ácido nucleico. La sonda de ácido nucleico puede proporcionarse en una solución, ya sea como una solución de trabajo o como una solución madre diluible. Alternativamente, puede proporcionarse en una forma soluble, por ejemplo en forma liofilizada.

- El kit puede comprender además cualquiera o todos de los siguientes: controles, estándares, calibradores desarrollando soluciones para desarrollar reacciones de marcado detectables, soluciones de parada para detener el desarrollo de reacciones de marcado, soluciones de bloqueo para bloquear enlaces o hibridación inespecífica, soluciones de lavado para la reducción de señal de fondo inespecífica, etc., como se conoce en la técnica. El kit puede comprender además el anticuerpo enlazado a una fase sólida. Una ventaja particular de este tipo de kit radica en la capacidad de proporcionar una fase sólida con un anticuerpo enlazado, en el que el anticuerpo sirve como una unidad estructural universal de captura para los híbridos. Esto permite formatos de ensayo convenientes, en los que el anticuerpo está prerrecubierto sobre formatos de fase vendidos, usados comúnmente tales como placas de microtitulación, tiras reactivas, artículos y similares. El kit puede comprender además un soporte para soportar la fase sólida a la que está enlazado el anticuerpo. La fase sólida puede tener una muy amplia variedad de formas, por ejemplo las de recipientes, tubos, placas de microtitulación, esferas, micropartículas, barras, tiras, papel de filtro, papel de cromatografía, etc. Como regla, la superficie de la fase sólida es hidrófila o puede hacerse hidrófila. La fase sólida puede consistir en una gran variedad de materiales, por ejemplo de materiales inorgánicos y/u orgánicos, de materiales sintéticos, de materiales de origen natural y/o de materiales de origen natural modificados. Ejemplos de materiales en fase sólida son polímeros, tales como celulosa, nitrocelulosa, acetato de celulosa, cloruro de polivinilo, poli(acrilamida), moléculas de dextrano entrecruzadas, agarosa, poliestireno, polietileno, polipropileno, polimetacrilato o nailon; cerámica, vidrio o metales, en particular metales preciosos tales como oro y plata; magnetita; mezclas o combinaciones de los mismos; etc. Las células, liposomas y vesículas de fosfolípidos también están cubiertas por el término fase sólida.
- La fase sólida también puede poseer un recubrimiento que consiste en una o más capas, por ejemplo de proteínas, carbohidratos, sustancias lipofílicas, biopolímeros o polímeros orgánicos, o mezclas de los mismos, para, por ejemplo, suprimir o prevenir el enlace no específico de los constituyentes de la muestra a la fase sólida o, para, por ejemplo, conseguir mejoras con respecto a la estabilidad de la suspensión de fases sólidas particulares, con respecto a la estabilidad de almacenamiento, con respecto a la estabilidad dimensional o con respecto a la resistencia a la luz UV, microbios u otros agentes que tengan un efecto destructivo. El soporte puede comprender una placa de microtitulación. El soporte puede comprender una tira de prueba. La tira de prueba puede tener un formato de inmersión simple, en el que la tira se sumerge en un fluido de muestra. También puede estar incrustado en un casete, en el que una gota de fluido de muestra es transferida a una abertura apropiada del casete.
- Debe entenderse que el propio soporte o una porción del mismo puede servir como fase sólida a la que está enlazado el anticuerpo. En el caso de que el soporte sea una placa de microtitulación con al menos uno o una pluralidad de pozos, el anticuerpo puede recubrirse sobre la superficie interior (o sobre una parte de la misma) del pozo o pozos. En el caso de que el soporte sea una tira de prueba, el anticuerpo puede recubrirse sobre una porción de la tira de prueba, por ejemplo, en una o varias bandas distintas de la tira, produciendo así un patrón correspondiente de bandas marcadas cuando se realiza la prueba.
- El soporte puede tener porciones distintas dedicadas a controles, como se conoce en la técnica. El kit puede comprender el anticuerpo en una forma de fase sólida enlazada sobre placas de microtitulación prerrecubiertas, perlas recubiertas, tiras de prueba y similares. De esta manera, el ensayo multiplex es fácilmente posible, donde una combinación del anticuerpo enlazado a fase sólida con una pluralidad de sondas de ácido nucleico puede usarse para detectar una pluralidad correspondiente de microARNs de interés. Por ejemplo, en una placa de microtitulación, tal como una placa de 96 pozos, se puede prerrecubrir con el anticuerpo y se pueden usar diferentes sondas de ácido nucleico en diferentes pozos para detectar diferentes microARNs de interés.
- Mediante el uso de un anticuerpo enlazado a una fase sólida como una unidad estructural universal de captura para híbridos que comprende diferentes combinaciones de microARNs de interés y sondas de ácido nucleico respectivas, se puede realizar una pluralidad de ensayos en paralelo, por ejemplo, usando la misma fase sólida, tal como una placa de microtitulación recubierta de anticuerpo. La hibridación puede ser por ejemplo, realizada en una máquina de PCR o dispositivo de calentamiento similar que permite seleccionar una temperatura predeterminada para la hibridación. Si tal dispositivo de calentamiento permite la aplicación de un gradiente de temperatura a través del campo de la placa de microtitulación, se puede determinar rápidamente una temperatura óptima de hibridación. Además, utilizando un anticuerpo enlazado a una fase sólida como una unidad estructural universal de captura, entonces se hace posible realizar hibridaciones con una pluralidad de sondas de ácido nucleico a una correspondiente pluralidad de diferentes temperaturas de hibridación óptimas. Esto se puede hacer, por ejemplo, en pozos separados de la misma placa de microtitulación.
- El método de la invención, en el que el anticuerpo como unidad estructural universal de captura para híbridos se proporciona en una forma enlazada a una fase sólida y el híbrido (que comprende la sonda de ácido nucleico) como diana de captura se añade en solución, ofrece por lo tanto muchas ventajas en términos tanto de adaptar el método a ensayos multiplex y adaptando el método a los sistemas, dispositivos y flujos de trabajo existentes del analizador.
- De acuerdo con una realización preferida de la invención, el anticuerpo está enlazado a una fase sólida y la sonda de ácido nucleico está marcada con una unidad estructural marcadora. Esta realización proporciona un protocolo de ensayo directo y un tiempo corto para dar resultados.

Los métodos de la invención proporcionan una manera simple, específica y sensible para detectar un microARN de interés que es fácilmente adaptable a sistemas de analizador automatizados existentes, tales como los que se usan en el laboratorio central de hospitales o consultorios médicos.

5 Los métodos de la invención han demostrado ser particularmente útiles para la detección de miARNs. Permiten una detección rápida y precisa que puede llevarse a cabo en sistemas de analizadores automatizados.

Breve descripción de los ejemplos

10 Detalles adicionales, cualidades, características y ventajas se describen adicionalmente en la siguiente descripción de los ejemplos respectivos. Brevemente, en una primera etapa, una cantidad definida de oligonucleótido de ADN específico de secuencia marcado con biotina se hibrida al miARN a partir de, por ejemplo, una muestra de pacientes bajo condiciones que sólo una sola especie de miARN puede hibridar. La cantidad de híbridos de ARN:ADN generados durante esta etapa es proporcional a la cantidad de las especies de miARN específicas presentes en esa muestra. En una segunda etapa, la mezcla de hibridación se transfiere a una fase sólida recubierta con un mAb a híbridos de ARN:ADN; cualquier híbrido presente se enlazarará a la fase sólida. El enlace de híbridos de ARN:ADN se detecta mediante un sistema de marcado adecuado, por ejemplo, Estreptavidina peroxidasa (Estreptavidina-POD). La cantidad de POD enlazada es proporcional a la cantidad de híbridos de ARN:ADN presentes en la muestra original.

15 La detección y cuantificación de miARN es inherentemente difícil. Sorprendentemente e inesperadamente, se ha encontrado que este método permite una detección altamente específica, sensible y reproducible de miARNs. Sin desear estar ligados a esta teoría, los inventores sospechan que esto puede ser debido a la estabilización de miARNs en un híbrido de doble cadena en solución, en particular en heterodúplexes de ARN:ADN. Se puede mostrar que los híbridos en solución se pueden congelar, almacenar durante largos períodos de tiempo y posteriormente todavía pueden detectarse con una alta sensibilidad en el método de la invención.

20 En un experimento, los miARNs miR-7, miR-380 o miR-1254 se hibridaron con oligonucleótidos de ADN complementarios, o con un oligonucleótido de ADN no específico como control. Después de la hibridación, las soluciones híbridas de ADN:ARN se transfirieron a los pozos de una placa de ELISA que estaba prerrecubierta con un anticuerpo de híbridos de ADN:ARN. Después de los pasos de lavado y la detección de híbridos ADN:ARN enlazados a anticuerpo por Estreptavidina peroxidasa, se probó la actividad de peroxidasa de cada pozo.

25 Los miARNs miR-7, miR-380 y miR-1254 se utilizaron como los ácidos nucleicos diana de interés. Cada miARN se hibridó con tres sondas de ácido nucleico diferentes específicas a los respectivos miARN de interés. La hibridación se realizó a temperaturas variables como se indica en la tabla 2 a continuación. Como control, el miARN también se incubó con una sonda de ácido nucleico no específica bajo condiciones idénticas de hibridación. Las sondas de ácido nucleico se marcaron con biotina.

30 Los miARNs se diluyeron a 100 pmol/μl en un regulador de almacenamiento adecuado (tal como regulador Tris HCl/EDTA (TE)) y los oligonucleótidos de ADN sintéticos se diluyeron a 100 pmol/μl en solución salina reguladora de TrisHCl 1x (TBS). Se incubaron 30μl de solución de ARN y 30μl de solución de ADN durante 2 minutos a 95 °C para disolver estructuras secundarias y luego se hibridaron a 40-65°C. Después de eso, los híbridos podrían ser usados inmediatamente o congelados (por ejemplo, a -20 °C) y almacenados para uso posterior.

Las secuencias para las sondas de ácidos nucleicos y miARNs se dan en la siguiente tabla 1:

Tabla 1: Secuencias de sondas de ácidos nucleicos y miARNs

SEQ ID NO	Ácido Nucleico	Secuencia (5'-3')
1	miR-7	UGGAAGACUAGUGAUUUUGUUGU
2	miR7 Oligo 1	AACAAAATCACTAGTCTTCCA
3	miR7 Oligo 2	AAAATCACTAGTCTTCCA
4	miR7 Oligo 3	ATCACTAGTCTTCCA

ES 2 645 733 T3

SEQ ID NO	Ácido Nucleico	Secuencia (5'-3')
5	miR-380	UAUGUAAUAUGGUCCACAUCUU
6	miR380 Oligo 1	AGATGTGGACCATATTACATA
7	miR380 Oligo 2	TGTGGACCATATTACATA
8	miR380 Oligo 3	GGACCATATTACATA
9	miR-1254	AGCCUGGAAGCUGGAGCCUGCAGU
10	miR1254 Oligo 1	GCAGGCTCCAGCTTCCAGGCT
11	miR1254 Oligo 2	GGCTCCAGCTTCCAGGCT
12	miR1254 Oligo 3	TCCAGCTTCCAGGCT

Las placas de ELISA se prereducieron con un anticuerpo anti-ADN:ARN-Híbrido bajo condiciones estándar (5 µg/ml en solución salina regulada con fosfato (PBS)). Después del recubrimiento, las placas de ELISA se lavaron con una solución de lavado comercialmente disponible o con un regulador TRIS/ácido cítrico.

- 5 Los híbridos se diluyeron 1:100, 1:1.000, 1:10.000 y 1:100.000 en
- PBS, -
 - PBS con 1 µg/ml de BSA y 0,1 µg/ml de Tween 20,
 - PBS con 0,5 µg/ml de BSA y 0,05 µg/ml de Tween 20, o
 - PBS con 0,25 µg/ml de BSA y 0,025 µg/ml de Tween 20 respectivamente y se incubaron sobre placas ELISA recubiertas durante 1 hora a 37 °C. Después de la incubación, las placas se lavaron e incubaron con un conjugado de Estreptavidina POD comercialmente disponible. Las placas se lavaron y se añadió una solución de sustrato cromogénico (tetrametilbencidina) a las placas. El desarrollo del color se paró mediante la adición de una solución de parada de ácido sulfúrico y se leyó la densidad óptica (OD) a 450 nm. Los resultados para las diluciones 1:100.000 de los híbridos 1 a 12 se dan en la tabla 2, a continuación.

15 Tabla 2: Valores de OD

Composición del Híbrido	Híbrido No.	Diluyente			
		1xPBS	1xPBS, 1g/l BSA, 0,1g/l Tween 20	1xPBS 0,5g/l BSA, 0,05g/l Tween 20	1xPBS 0,25g/l BSA, 0,025g/l Tween 20
1. ARN miR-7 con ADN miR7 Oligo 1, temperatura de hibridación 52,0 °C	Híbrido 1	3,094	3,289	3,275	3,325

ES 2 645 733 T3

Composición del Híbrido	Híbrido No.	Diluyente			
		1xPBS	1xPBS, 1g/l BSA, 0,1g/l Tween 20	1xPBS 0,5g/l BSA, 0,05g/l Tween 20	1xPBS 0,25g/l BSA, 0,025g/l Tween 20
2. ARN miR-7 con ADN miR7Oligo 2, temperatura de hibridación 46,9 °C	Híbrido 2	3,079	3,306	3,259	3,259
3. ARN miR-7 con ADN miR7 Oligo 3, temperatura de hibridación 42,4 °C	Híbrido 3	2,517	3,164	3,004	2,980
4. ARN miR-7 con ADN miR380 Oligo 1, temperatura de hibridación 52,0 °C	Híbrido 4 (no específico)	0,021	0,028	0,022	0,022
5. ARN miR-380 con ADN miR380 Oligo 1, temperatura de hibridación 52,0 °C	Híbrido 5	2,952	3,104	3,104	3,074
6. ARN miR-380 con ADN miR380 Oligo 2, temperatura de hibridación 46,9 °C	Híbrido 6	2,912	3,254	3,173	3,138
7. ARN miR-380 con ADN miR380 Oligo 3, temperatura de hibridación 39,6 °C	Híbrido 7	1,046	2,109	2,128	1,817
8. ARN miR-380 con ADN miR7 Oligo 1, temperatura de hibridación 52,0 °C	Híbrido 8 (no-específico)	0,023	0,029	0,031	0,030
9. ARN miR-380 con ADN miR1254 Oligo 1, temperatura de hibridación 65,7 °C	Híbrido 9	3,139	3,244	3,270	3,215
10. ARN miR-1254 con ADN miR1254 Oligo 2, temperatura de hibridación 60,5 °C	Híbrido 10	3,003	3,230	3,259	3,217
11. ARN miR-1254 con ADN miR1254 Oligo 3, temperatura de hibridación 50,6 °C	Híbrido 11	2,554	3,164	3,106	3,067

ES 2 645 733 T3

Composición del Híbrido	Híbrido No.	Diluyente			
		1xPBS	1xPBS, 1g/l BSA, 0,1g/l Tween 20	1xPBS 0,5g/l BSA, 0,05g/l Tween 20	1xPBS 0,25g/l BSA, 0,025g/l Tween 20
12. ARN miR-1254 con ADN miR7 Oligo 1, temperatura de hibridación 52,0 °C	Híbrido 12 (no-específico)	0,027	0,033	0,030	0,030
1xPBS	(fondo)	0,028	0,032	0,031	0,030

Como puede verse fácilmente a partir de los resultados mostrados en la tabla 2, el método permite una detección precisa, sensible, específica y reproducible de miARNs.

5 Todos los híbridos complementarios de ADN:ARN probados resultaron en $ODs \gg 1$, mientras que híbridos inespecíficos de ADN:ARN o sólo regulador dieron como resultado $ODs \ll 0,1$. Los valores de OD para controles no específicos (es decir, híbridos 4, 8 y 12) estaban en el mismo orden de magnitud que los valores cero obtenidos con sólo PBS en lugar de una muestra híbrida. Por tanto, se ha demostrado por primera vez que los miARN pueden detectarse con alta sensibilidad y especificidad mediante un método de inmunoensayo. El ensayo descrito en el ejemplo anterior se ha realizado repetidamente con diversas combinaciones de reguladores y soluciones de lavado, todos con resultados comparables, demostrando así un método robusto y reproducible para detectar miARNs. Las series de dilución muestran una buena detección en varios órdenes de magnitud con alta linealidad y reproducibilidad.

El formato de ensayo ELISA tal como se utiliza, por ejemplo, en el ejemplo anterior es conocido por ser bien adecuado también para una detección cuantitativa de analitos.

Listado de secuencias

15 <110> Siemens AG

<120> Inmunoensayo para la detección de secuencias específicas de ácidos nucleicos tales como miARNs

<130> 201204166

<160> 12

20 <170> BiSSAP 1.0

<210> 1

<211> 23

<212> ARN

<213> Homo sapiens

25 <220>

<221> fuente

<222> 1..23

<223> /mol_tipo="ARN"

/organismo="Homo sapiens"

<400> 1
 uggaagacua gugauuuugu ugu 23
 <210> 2
 <211> 21
 5 <212> ADN
 <213> Artificial
 <220>
 <221>fuente
 <222> 1..21
 10 <223> /mol_tipo="ADN"
 /nota="oligonucleótido"
 /organismo="Artificial"
 <400> 2
 aacaaaatca ctagtcttc a 21
 15 <210> 3
 <211> 18
 <212> ADN
 <213> Artificial
 <220>
 20 <221> fuente
 <222> 1..18
 <223> /mol_tipo="ADN"
 /nota="oligonucleótido"
 /organismo="Artificial"
 25 <400> 3
 aaaatcacta gtctcca 18
 <210> 4
 <211> 15
 <212> ADN
 30 <213> Artificial
 <220>

<221> fuente
<222> 1..15
<223> /mol_tipo="ADN"
/nota="oligonucleótido"
5 /organismo="Artificial"
<400> 4
atcactagtc ttcca 15
<210> 5
<211> 22
10 <212> ARN
<213> Homo sapiens
<220>
<221> fuente
<222> 1..22
15 <223> /mol_tipo="ARN"
/organismo="Homo sapiens"
<400> 5
uauguaauau gguccacauc uu 22
<210> 6
20 <211> 21
<212> ADN
<213> Artificial
<220>
<221> fuente
25 <222> 1..21
<223> /mol_tipo="ADN"
/nota="oligonucleótido"
/organismo="Artificial"
<400> 6
30 agatgtggac catattacat a 21
<210> 7

<211> 18
 <212> ADN
 <213> Artificial
 <220>
 5 <221> fuente
 <222> 1..18
 <223> /mol_tipo="ADN"
 /nota="oligonucleótido"
 /organismo="Artificial"
 10 <400> 7
 tgtggacat atacata 18
 <210> 8
 <211> 15
 <212> ADN
 15 <213> Artificial
 <220>
 <221> fuente
 <222> 1..15
 <223> /mol_tipo="ADN"
 20 /nota="oligonucleótido"
 /organismo="Artificial"
 <400> 8
 ggacatatt acata 15
 <210> 9
 25 <211> 24
 <212> ARN
 <213> Homo sapiens
 <220>
 <221> fuente
 30 <222> 1..24
 <223> /mol_tipo="ARN"

/nota="miR-1254"
 /organismo="Homo sapiens"
 <400> 9
 agccuggaag cuggagccug cagu 24
 5 <210> 10
 <211> 21
 <212> ADN
 <213> Artificial
 <220>
 10 <221> fuente
 <222> 1..21
 <223> /mol_tipo="ADN"
 /nota="oligonucleótido"
 /organismo="Artificial"
 15 <400> 10
 gcaggctcca gctccaggc t 21
 <210> 11
 <211> 18
 <212> ADN
 20 <213> Artificial
 <220>
 <221> fuente
 <222> 1..18
 <223> /mol_tipo="ADN"
 25 /nota="oligonucleótido"
 /organismo="Artificial"
 <400> 11
 ggctccagct tccaggct 18
 <210> 12
 30 <211> 15
 <212> ADN

<213> Artificial

<220>

<221> fuente

<222> 1..15

5 <223> /mol_tipo="ADN"

/nota="oligonucleótido"

/organismo="Artificial"

<400> 12

tccagcttcc aggct 15

REIVINDICACIONES

1. Un método para detectar una molécula de ácido nucleico de interés en una muestra, en el que la molécula de ácido nucleico de interés es un microARN, que comprende las siguientes etapas:
- proporcionar una sonda de ácido nucleico en solución;
- 5 - hibridación de la molécula de ácido nucleico de interés a la sonda de ácido nucleico para obtener un híbrido de dicha molécula de ácido nucleico de interés y dicha sonda de ácido nucleico;
- enlazar dicho híbrido a un anticuerpo capaz de enlazar específicamente a híbridos de ácido nucleico, en el que el anticuerpo está enlazado a una fase sólida; y
 - detectar el híbrido enlazado a anticuerpo,
- 10 en el que el anticuerpo está enlazado a un antígeno competitivo antes del enlace de dicho primer híbrido y dicho híbrido es detectado por desplazamiento del antígeno competitivo, en el que el antígeno competitivo es un híbrido competitivo de ácidos nucleicos, portando dicho híbrido competitivo una unidad estructural marcadora.
2. Un método para detectar una molécula de ácido nucleico de interés en una muestra, en el que la molécula de ácido nucleico de interés es un microARN, que comprende las siguientes etapas:
- 15 - proporcionar una sonda de ácido nucleico en solución;
- hibridación de la molécula de ácido nucleico de interés a la sonda de ácido nucleico para obtener híbridos de dicha molécula de ácido nucleico de interés y dicha sonda de ácido nucleico;
 - enlazar dicho híbrido a un anticuerpo capaz de enlazar específicamente a híbridos de ácido nucleico, en el que el anticuerpo está en solución; y
- 20 - detectar el híbrido enlazado a anticuerpo en solución,
- en el que el anticuerpo está enlazado a un antígeno competitivo antes del enlace de dicho primer híbrido y dicho híbrido es detectado por desplazamiento del antígeno competitivo, en el que el antígeno competitivo es un híbrido competitivo de ácidos nucleicos, portando dicho híbrido competitivo una unidad estructural marcadora.
- 25 3. El método de acuerdo con cualquiera de las reivindicaciones anteriormente mencionadas, en el que la sonda de ácido nucleico es un ADN.
4. El método de acuerdo con cualquiera de las reivindicaciones anteriormente mencionadas, en el que el anticuerpo es específico para híbridos de ADN:ARN.
5. El método de acuerdo con una cualquiera de las reivindicaciones anteriormente mencionadas, en el que la sonda de ácido nucleico está marcada con una unidad estructural marcadora.
- 30 6. El método de acuerdo con una cualquiera de las reivindicaciones anteriormente mencionadas, en el que la detección es una detección cuantitativa.
7. El método de acuerdo con una cualquiera de las reivindicaciones anteriormente mencionadas, en el que una pluralidad de diferentes ácidos nucleicos de interés se detecta utilizando una respectiva pluralidad de sondas de ácido nucleico.