

19



OFICINA ESPAÑOLA DE
PATENTES Y MARCAS

ESPAÑA



11 Número de publicación: **2 647 390**

51 Int. Cl.:

C12Q 1/68 (2006.01)

C12N 15/113 (2010.01)

12

TRADUCCIÓN DE PATENTE EUROPEA

T3

86 Fecha de presentación y número de la solicitud internacional: **11.02.2011 PCT/US2011/024519**

87 Fecha y número de publicación internacional: **18.08.2011 WO11100541**

96 Fecha de presentación y número de la solicitud europea: **11.02.2011 E 11742859 (9)**

97 Fecha y número de publicación de la concesión europea: **18.10.2017 EP 2516681**

54 Título: **Composiciones y métodos para la detección preferencial de ARN pequeños mediante hibridación con puente y ligación**

30 Prioridad:

11.02.2010 US 303517 P

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

21.12.2017

73 Titular/es:

**NANOSTRING TECHNOLOGIES, INC (100.0%)
530 Fairview Ave N, Ste 2000
Seattle, WA 98109, US**

72 Inventor/es:

**WEBSTER, PHILIPPA, JANE;
DENNIS, LUCAS, MICHAEL y
BOYKIN, RICHARD, KEMBLE**

74 Agente/Representante:

SÁEZ MAESO, Ana

ES 2 647 390 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

Composiciones y métodos para la detección preferencial de ARN pequeños mediante hibridación con puente y ligación

5 Campo de la invención

Esta invención en general se refiere al campo de la biología molecular, y específicamente a los campos de detección, identificación y cuantificación de moléculas de ácido nucleico objetivo en mezclas.

10 Antecedentes de la invención

15 Aunque todas las células en el cuerpo humano contienen el mismo material genético, los mismos genes no están activos en todas esas células. Las alteraciones en los patrones de expresión génica pueden tener profundos efectos sobre las funciones biológicas. Estas variaciones en la expresión génica se encuentran en el centro de los procesos fisiológicos y patológicos alterados. Por lo tanto, identificar y cuantificar la expresión de genes en células normales en comparación con células enfermas puede ayudar al descubrimiento de nuevos blancos de fármacos y para el diagnóstico.

20 Los ácidos nucleicos pueden detectarse y cuantificarse en base a sus secuencias polinucleotídicas específicas. El principio básico subyacente de los métodos de detección y cuantificación existentes es la hibridación de una secuencia sonda complementaria marcada, con una secuencia objetivo de interés, en una muestra. La formación de un dúplex indica la presencia de la secuencia objetivo en la muestra.

25 Esta técnica, llamada hibridación molecular, ha sido una herramienta útil para identificar y analizar secuencias de ácido nucleico específicas en mezclas complejas. Esta técnica se ha usado en diagnósticos, por ejemplo, para detectar secuencias de ácidos nucleicos de diversos microorganismos en muestras biológicas. Además, las técnicas de hibridación se han usado para mapear diferencias genéticas o polimorfismos entre individuos. También, estas técnicas se han usado para monitorear los cambios en la expresión génica en diferentes poblaciones de células o células tratadas con diferentes agentes.

30 La identificación de moléculas de ARN pequeños, moléculas de microARN (miRNA), con técnicas de hibridación, presenta varios desafíos particulares. La hibridación de una sonda de detección a una molécula de ARN de longitud corta de un miRNA objetivo típico, se produce a bajas temperaturas de fusión y previene la unión simultánea a múltiples motivos de detección. Las hibridaciones a baja temperatura de fusión son desfavorables para la unión específica de múltiples sondas a las secuencias de miRNA objetivo que pueden diferir en un único ácido nucleico. Además, las secuencias de miRNA muestran una gran variedad a pesar de tener longitudes constantes o conservadas, lo cual genera una amplia variedad de temperaturas de fusión para la hibridación.

35 Maroney, P. A. y otros: "A rapid, quantitative assay for direct detection of microRNAs and other small RNAs using splinted ligation", RNA., vol. 13(6), 2007, páginas 930-936 describe un método de detección múltiple para miRNA en el que se usan una sonda puente y una sonda etiqueta radiomarcada.

40 En consecuencia, se necesita la detección, identificación y cuantificación exacta y sensible de moléculas de ácido nucleico objetivo en mezclas complejas. Particularmente, se necesita la detección específica de moléculas de ARN pequeños, tales como moléculas de miRNA, en mezclas complejas o reacciones múltiples.

Resumen de la invención

45 Las composiciones y métodos de la invención proporcionan una solución para la necesidad que se presenta desde hace mucho tiempo, de detectar de manera específica moléculas de ARN pequeños, tales como moléculas de miRNA, en mezclas complejas o reacciones multiplexadas. Esto puede lograrse mediante la ligación de cualquier molécula de ARN pequeño a una única molécula etiqueta secuencia específica, a una temperatura única, al normalizar la temperatura de fusión de la hibridación entre el ARN pequeño objetivo y una molécula puente que dirige la unión específica a una etiqueta única. Las etiquetas ligadas subsecuentemente normalizan las temperaturas de fusión de la población mixta de ARN pequeños marcados, lo que les permite someterse a un ensayo de hibridación multiplexado a la misma temperatura, en el que es posible distinguir ARN pequeños de manera secuencia específica.

50 Específicamente, la invención proporciona una composición que incluye: (a) una etiqueta, en donde la etiqueta incluye una primera secuencia de ADN y una región reportera de unión, a la que se unen una o más moléculas reporteras que producen una señal y en donde la primera secuencia de ADN incluye una secuencia de ADN exógeno; y (b) un puente, en donde el puente incluye una segunda secuencia de ADN que es complementaria a una molécula de ARN y una tercera secuencia de ADN que es complementaria a la primera secuencia de ADN de la etiqueta.

55 En un aspecto de esta composición la segunda secuencia de ADN es complementaria a una molécula de ARN o una porción de esta. Una porción de la molécula de ARN es más pequeña que la longitud total de la molécula de ARN. En

algunos aspectos la porción es del 10 %, 20 %, 30 %, 40 %, 50 %, 60 %, 70 %, 80 %, 90 %, 99 % o cualquier punto porcentual intermedio, de la longitud completa de la molécula de ARN. Además, la porción puede ser continua o discontinua.

5 En otro aspecto de la composición, la primera secuencia de ADN de la etiqueta incluye un ADN exógeno, en donde la secuencia de ADN exógeno no se hibrida de manera cruzada con ninguna otra molécula de ADN o ARN en la composición que no sea la tercera secuencia de ADN del puente. La etiqueta contiene una primera secuencia de ADN compuesta de ADN exógeno, que tiene una identidad no mayor al 85% a lo largo de 35 bases, con una homología máxima continua de 15 bases o menor, con cualquier secuencia conocida de ADN genómico o ARN. Además, el ADN
10 exógeno tiene una identidad no mayor al 85% a lo largo de 35 bases, con una homología continua máxima de 15 bases o menor, con cualquier secuencia conocida de ADN o ARN de un genoma o que se transcribe a partir de un genoma a partir del cual la molécula de ARN objetivo se transcribe. Las moléculas de ARN objetivo provienen de o se transcriben a partir de los genomas de cualquier especie, que incluyen, pero no se limitan a, animales, plantas, bacterias, hongos y virus. Las especies que se prefieren son mamíferos, incluyendo primates, preferentemente humanos y roedores
15 incluyendo conejo, rata y ratón.

En ciertos aspectos de la etiqueta, la primera secuencia de ADN y la región reportera de unión son tangenciales o superpuestas. La primera secuencia de ADN y la región reportera de unión pueden superponerse en una serie de nucleótidos de ADN desde 1-5, 5-10, 10-15, 15-20, 20-25, 25-30, 30-35, 35-40, 40-45, 45-50, 50-55, 55-60, 60-65, 65-
20 70, 75-80, 80-85, 85-90, 90-95, 95-100, o cualquier número intermedio de nucleótidos. Además, la primera secuencia de ADN y la región reportera de unión pueden superponerse en un porcentaje del número total de nucleótidos presentes en la primera secuencia de ADN que varía entre 1-5 %, 5-10 %, 10-15 %, 15-20 %, 20-25 %, 25-30 %, 30-35 %, 35-40 %, 40-45 %, 45-50 %, 50-55 %, 55-60 %, 60-65 %, 65-70 %, 75-80 %, 80-85 %, 85-90 %, 90-95 %, 95-100 %, o cualquier porcentaje intermedio de nucleótidos de la primera secuencia de ADN. En un aspecto particular, la región reportera de
25 unión puede estar contenida completamente dentro de la primera secuencia de ADN.

En una modalidad de la composición, la segunda y tercera secuencias de ADN del puente son contiguas. Alternativamente, la segunda y tercera secuencias de ADN se conectan a través de una molécula de enlace que contiene al menos dos desoxirribonucleótidos. En ciertos aspectos de la composición, la molécula de enlace contiene
30 entre 2-100 desoxirribonucleótidos, y específicamente, entre 2-10 desoxirribonucleótidos, 10-20 desoxirribonucleótidos, 20-30 desoxirribonucleótidos, 30-40 desoxirribonucleótidos, 40-50 desoxirribonucleótidos, 50-60 desoxirribonucleótidos, 60-70 desoxirribonucleótidos, 70-80 desoxirribonucleótidos, 80-90 desoxirribonucleótidos, 90-100 desoxirribonucleótidos, o cualquier número intermedio de desoxirribonucleótidos. La molécula de enlace puede contener una secuencia de desoxirribonucleótido (ADN) obtenida o derivada de cualquier especie, incluyendo secuencias
35 exógenas o sintéticas.

En ciertos aspectos de la composición, la segunda secuencia de ADN del puente y la molécula de ARN forman un heterodúplex ADN/ARN que tiene una temperatura de fusión de entre 37-95 °C. Alternativamente, la segunda secuencia de ADN del puente y la molécula de ARN forman un heterodúplex ADN/ARN que tiene una temperatura de fusión de
40 entre 44-53 °C. En otros aspectos, la tercera secuencia de ADN del puente y la primera secuencia de la etiqueta forman un dúplex ADN/ADN que tiene una temperatura de fusión de entre 37-95 °C. Alternativamente, la tercera secuencia de ADN del puente y la primera secuencia de la etiqueta forman un dúplex ADN/ADN que tiene una temperatura de fusión de entre 44-53 °C.

45 En una modalidad preferida de la composición, la segunda y tercera secuencias de ADN del puente forman un dúplex de ácido nucleico que tienen sustancialmente la misma temperatura de fusión. En ciertos aspectos, la segunda y tercera secuencias de ADN del puente forman dúplex de ácido nucleico que tienen temperaturas de fusión dentro de 1 °C, 2 °C, 5 °C, 10 °C, 15 °C, 20 °C o cualquier grado en medio de estos. Preferentemente, la segunda y tercera secuencias de ADN del puente forman dúplex de ácido nucleico que tienen temperaturas de fusión dentro de 1 °C, 2 °C o 5 °C, o un
50 grado entre estos.

En otra modalidad de la composición, la tercera secuencia de ADN incluye una secuencia de ADN exógeno. En un aspecto de esta modalidad, la tercera secuencia de ADN incluye una porción de una secuencia de ADN exógeno.

55 En otra modalidad de la composición, el ARN comprende un ARN no codificante. ARN no codificantes ilustrativos incluyen, pero no se limitan a, un ARN de transferencia (tRNA), un ARN pequeño nucleolar (snoRNA), un microARN (miRNA), un ARN pequeño interferente (siRNA), un ARN pequeño en horquilla (shRNA), un ARN pequeño interferente asociado a repeticiones (rasiRNA) y ARN asociado a piwi (piRNA). En un aspecto preferido, el ARN no codificante es un miRNA. Alternativamente o de manera adicional, la molécula de ARN incluye entre 10-300 ribonucleótidos.

60 En ciertas modalidades de la composición, la molécula de ARN y la etiqueta contienen secuencias que se hibridan de manera específica con el puente con complementariedad completa. Alternativamente o de manera adicional, la molécula de ARN y/o la etiqueta contienen secuencias que se hibridan específicamente con el puente con complementariedad parcial. En ciertos aspectos, la complementariedad parcial se define como menor que la complementariedad completa o
65 menor que el 100 % de complementariedad. Alternativamente, la complementariedad parcial se define como la unión

con menos del 100 %, 90 %, 80 %, 70 %, 60 %, 50 %, 40 %, 30 %, 20 %, 10 %, o cualquier valor de porcentaje intermedio.

5 La invención proporciona además un estuche, como se define en la reivindicación 11, que contiene: (a) una composición que incluye: (1) una etiqueta, en donde la etiqueta incluye una primera secuencia de ADN y una región reportera de unión a la cual se unen una o más moléculas reporteras que producen una señal; y (2) un puente, en donde el puente incluye una segunda secuencia de ADN que es complementaria a una molécula de ARN y una tercera molécula de ADN que es complementaria a la primera secuencia de ADN de la etiqueta; y (b) una sustancia seleccionada del grupo que consiste en un excluidor de volumen y una nucleasa. Opcionalmente, el estuche incluye además una ligasa.

10 En una modalidad del estuche, la sustancia que se selecciona es un excluidor de volumen. Un ejemplo no limitante de un excluidor de volumen preferido es el polietilenglicol (PEG).

15 En otra modalidad del estuche, la sustancia que se selecciona es una nucleasa. La nucleasa es preferentemente una exonucleasa específica de ADN. Un ejemplo no limitante de una exonucleasa específica de ADN es una exonucleasa lambda.

20 En ciertas modalidades del estuche, la segunda y tercera secuencias de ADN del puente son contiguas. Alternativamente, la segunda y tercera secuencias de ADN se conectan a través de una molécula de enlace. En ciertos aspectos del estuche, la molécula de enlace contiene entre 2-100 desoxirribonucleótidos, y específicamente, entre 2-10 desoxirribonucleótidos, 10-20 desoxirribonucleótidos, 20-30 desoxirribonucleótidos, 30-40 desoxirribonucleótidos, 40-50 desoxirribonucleótidos, 50-60 desoxirribonucleótidos, 60-70 desoxirribonucleótidos, 70-80 desoxirribonucleótidos, 80-90 desoxirribonucleótidos, 90-100 desoxirribonucleótidos, o cualquier número intermedio de desoxirribonucleótidos. La molécula de enlace puede contener una secuencia de desoxirribonucleótido (ADN) obtenida o derivada de cualquier especie, incluyendo secuencias exógenas.

25 En otra modalidad del estuche, la segunda secuencia de ADN del puente y la molécula de ARN forman un heterodúplex de ADN/ARN que tiene una temperatura de fusión de entre 37-95 °C. Alternativamente, la segunda secuencia de ADN del puente y la molécula de ARN forman un heterodúplex de ADN/ARN que tiene una temperatura de fusión de entre 44-53 °C. En una modalidad adicional, la tercera secuencia de ADN del puente y la primera secuencia de la etiqueta forman un dúplex de ADN/ADN que tiene una temperatura de fusión de entre 37-95 °C. Alternativamente, la tercera secuencia de ADN del puente y la primera secuencia de la etiqueta forman un dúplex de ADN/ADN que tiene una temperatura de fusión de entre 44-53 °C.

30 En una modalidad preferida, la segunda y tercera secuencias de ADN del puente forman dúplex de ácido nucleico que tienen sustancialmente la misma temperatura de fusión. En ciertos aspectos, la segunda y tercera secuencias de ADN del puente forman dúplex de ácido nucleico que tienen temperaturas de fusión dentro de 1 °C, 2 °C, 5 °C, 10 °C, 15 °C, 20 °C o cualquier grado en medio de estos. Preferentemente, la segunda y tercera secuencias de ADN del puente forman dúplex de ácido nucleico que tienen temperaturas de fusión dentro de 1 °C, 2 °C o 5 °C, o un grado entre estos.

35 En otra modalidad preferida, la tercera secuencia de ADN incluye una secuencia de ADN exógeno.

40 En ciertas modalidades del estuche, la molécula de ARN y/o la etiqueta contienen las secuencias que se hibridan específicamente con el puente con complementación completa. Alternativamente o de manera adicional, la molécula de ARN y/o la etiqueta contienen secuencias que se hibridan específicamente con el puente con complementariedad parcial. En ciertos aspectos, la complementariedad parcial se define como menor que la complementariedad completa o menor que el 100 % de complementariedad. Alternativamente, la complementariedad parcial se define como la unión con menos del 100 %, 90 %, 80 %, 70 %, 60 %, 50 %, 40 %, 30 %, 20 %, o 10 % de complementariedad o cualquier valor de porcentaje intermedio.

45 La invención también proporciona un método para la detección de una molécula de ARN, como se define en la reivindicación 12, que incluye: (a) proporcionar una muestra que contiene al menos una molécula de ARN; (b) proporcionar una etiqueta, en donde la etiqueta incluye una primera secuencia de ADN y una región reportera de unión a la cual se unen una o más moléculas reporteras que producen una señal; (c) proporcionar un puente, en donde el puente incluye una segunda secuencia de ADN que es complementaria a la molécula de ARN y una tercera secuencia de ADN que es complementaria a la primera secuencia de ADN de la etiqueta; y (d) proporcionar un tampón; (e) hibridar específicamente la molécula de ARN, el puente y la etiqueta entre 37-95 °C; (f) mantener la reacción de hibridación entre 37-95 °C; (g) proporcionar un tampón para la ligasa; (h) proporcionar una ligasa directamente a la reacción de hibridación entre 37-95 °C; (i) ligar la molécula de ARN a la etiqueta a una o más temperaturas entre 37-95 °C; y (j) detectar la señal.

50 En ciertas modalidades, este método de detección de una molécula de ARN incluye además la etapa de desnaturalización de la molécula de ARN, el puente, y la etiqueta antes de la hibridación específica de la molécula de ARN, el puente y la etiqueta entre 37-95 °C.

En otra modalidad de este método, las etapas (e), (f), (h) e (i) se realizan a entre 43-52 °C.

5 En otras modalidades, este método de detección de una molécula de ARN incluye además proporciona un excluidor de volumen después de mantener la reacción de hibridación entre 37-95 °C. Un ejemplo no limitante de un excluidor de volumen es el polietilenglicol (PEG).

10 En otras modalidades, el método proporciona además una nucleasa para la reacción de ligación después de ligar la molécula de ARN a la etiqueta entre 37-95 °C. En un aspecto, la nucleasa es una exonucleasa específica de ADN. Un ejemplo no limitante de la exonucleasa específica de ADN es una exonucleasa lambda.

15 En una modalidad preferida de este método para la detección de una molécula de ARN, la segunda y tercera secuencias de ADN del puente son contiguas. Alternativamente, la segunda y tercera secuencias de ADN se conectan a través de una molécula de enlace. En ciertos aspectos de este método, la molécula de enlace contiene entre 2-100 desoxirribonucleótidos, y específicamente, entre 2-10 desoxirribonucleótidos, 10-20 desoxirribonucleótidos, 20-30 desoxirribonucleótidos, 30-40 desoxirribonucleótidos, 40-50 desoxirribonucleótidos, 50-60 desoxirribonucleótidos, 60-70 desoxirribonucleótidos, 70-80 desoxirribonucleótidos, 80-90 desoxirribonucleótidos, 90-100 desoxirribonucleótidos, o cualquier número intermedio de desoxirribonucleótidos. La molécula de enlace puede contener una secuencia de desoxirribonucleótido (ADN) obtenida o derivada de cualquier especie, incluyendo secuencias exógenas.

20 En otra modalidad de este método para la detección de una molécula de ARN, el ARN comprende un ARN no codificante. ARN no codificantes ilustrativos incluyen, pero no se limitan a, un ARN de transferencia (tRNA), un ARN pequeño nucleolar (snoRNA), un microARN (miRNA), un ARN pequeño interferente (siRNA), un ARN pequeño en horquilla (shRNA), un ARN pequeño interferente asociado a repeticiones (rasiRNA) y ARN asociado a piwi (piRNA). En un aspecto preferido de este método, el ARN no codificante es un miRNA.

25 En ciertas modalidades de este método para la detección de una molécula de ARN, la segunda secuencia de ADN del puente y la molécula de ARN forman un heterodúplex de ADN/ARN que tiene una temperatura de fusión de entre 37-95 °C. Alternativamente, la segunda secuencia de ADN del puente y la molécula de ARN forman un heterodúplex de ADN/ARN que tiene una temperatura de fusión de entre 44-53 °C. En otras modalidades, la tercera secuencia de ADN del puente y la primera secuencia de la etiqueta forman un dúplex de ADN/ADN que tiene una temperatura de fusión de entre 37-95 °C. Alternativamente, la tercera secuencia de ADN del puente y la primera secuencia de la etiqueta forman un dúplex de ADN/ADN que tiene una temperatura de fusión de entre 44-53 °C.

35 En una modalidad preferida de este método para la detección de una molécula de ARN, la segunda y tercera secuencias de ADN del puente forman dúplex de ácido nucleico que tienen sustancialmente la misma temperatura de fusión. En ciertos aspectos, la segunda y tercera secuencias de ADN del puente forman dúplex de ácido nucleico que tienen temperaturas de fusión dentro de 1 °C, 2 °C, 5 °C, 10 °C, 15 °C, 20 °C o cualquier grado en medio de estos. Preferentemente, la segunda y tercera secuencias de ADN del puente forman dúplex de ácido nucleico que tienen temperaturas de fusión dentro de 1 °C, 2 °C o 5 °C, o un grado entre estos.

40 En una modalidad de este método para la detección de una molécula de ARN, la tercera secuencia de ADN comprende una secuencia de ADN exógeno.

45 En ciertos aspectos de este método para la detección de una molécula de ARN, la molécula de ARN y/o la etiqueta contienen secuencias que se hibridan específicamente con el puente con complementariedad completa. Alternativamente o de manera adicional, la molécula de ARN y/o la etiqueta contienen secuencias que se hibridan específicamente con el puente con complementariedad parcial. En ciertos aspectos, la complementariedad parcial se define como menor que la complementariedad completa o menor que el 100 % de complementariedad. Alternativamente, la complementariedad parcial se define como la unión con menos del 100 %, 90 %, 80 %, 70 %, 60 %, 50 %, 40 %, 30 %, 20 %, 10 % de complementariedad, o cualquier valor de porcentaje intermedio.

55 La invención proporciona además un método de detección múltiple de una pluralidad de moléculas de ARN, como se define en la reivindicación 13, que incluye: (a) proporcionar una muestra que contiene una pluralidad de moléculas de ARN; (b) proporcionar una pluralidad de etiquetas, en donde cada etiqueta contiene una primera secuencia de ADN y al menos una región reportera de unión a la cual se unen una o más moléculas reporteras que producen una señal; (c) proporcionar una pluralidad de puentes, en donde cada puente incluye una segunda secuencia de ADN que es complementaria a la molécula de ARN y una tercera secuencia de ADN que es complementaria a la primera secuencia de ADN de la etiqueta, en donde cada puente se hibrida específicamente a una especie de molécula de ARN y una especie de etiqueta, en donde una especie de etiqueta produce una señal que marca de manera diferencial una especie de molécula de ARN en comparación con la otras especies de moléculas de ARN, cuando se une a la etiqueta; (d) proporcionar un tampón; (e) hibridación específica de las moléculas de ARN, los puentes y las etiquetas entre 37-95 °C; (f) mantener la reacción de hibridación entre 37-95 °C; (g) proporcionar un tampón para la ligasa; (h) proporcionar una ligasa directamente a la reacción de hibridación entre 37-95 °C; (i) ligar las moléculas de ARN, los puentes y las etiquetas a una o más temperaturas entre 37-95 °C; y (j) detectar una o más señales.

65

En una modalidad, este método de detección múltiple de una pluralidad de moléculas de ARN incluye además la etapa de desnaturalización de las moléculas de ARN, los puentes, y las etiquetas antes de la hibridación específica de las moléculas de ARN, los puentes y las etiquetas entre 37-95 °C.

5 En otra modalidad de este método de detección múltiple de una pluralidad de moléculas de ARN, las etapas (e), (f), (h) e (i) se realizan a entre 43-52 °C.

10 En ciertas modalidades, este método de detección múltiple de una pluralidad de moléculas de ARN incluye proporciona un excluidor de volumen después de mantener la reacción de hibridación entre 37-95 °C. Un ejemplo no limitante de un excluidor de volumen es el polietilenglicol (PEG). Alternativamente o de manera adicional, el método incluye además proporcionar una nucleasa para la reacción de ligación después de ligar la molécula de ARN a la etiqueta entre 37-95°C. En un aspecto, la nucleasa es una exonucleasa específica de ADN. Un ejemplo no limitante de la exonucleasa específica de ADN es una exonucleasa lambda.

15 En una modalidad preferida de este método de detección múltiple de una pluralidad de moléculas de ARN, la segunda y tercera secuencias de ADN de los puentes es contigua. Alternativamente, la segunda y tercera secuencias de ADN se conectan a través de una molécula de enlace. En ciertos aspectos de este método, la molécula de enlace contiene entre 2-100 desoxirribonucleótidos, y específicamente, entre 2-10 desoxirribonucleótidos, 10-20 desoxirribonucleótidos, 20-30 desoxirribonucleótidos, 30-40 desoxirribonucleótidos, 40-50 desoxirribonucleótidos, 50-60 desoxirribonucleótidos, 60-70 desoxirribonucleótidos, 70-80 desoxirribonucleótidos, 80-90 desoxirribonucleótidos, 90-100 desoxirribonucleótidos, o cualquier número intermedio de desoxirribonucleótidos. La molécula de enlace puede contener una secuencia de desoxirribonucleótido (ADN) obtenida o derivada de cualquier especie, incluyendo secuencias exógenas.

25 En otra modalidad preferida, la tercera secuencia de ADN incluye una secuencia de ADN exógeno.

30 En otra modalidad de este método de detección múltiple de una pluralidad de moléculas de ARN, las moléculas de ARN comprenden un ARN no codificante. Los ejemplo no limitantes de ARN no codificantes ilustrativos incluyen, pero no se limitan a, un ARN de transferencia (tRNA), un ARN pequeño nucleolar (snoRNA), un microARN (miRNA), un ARN pequeño interferente (siRNA), un ARN pequeño en horquilla (shRNA), un ARN pequeño interferente asociado a repeticiones (rasiRNA), o ARN asociado a piwi (piRNA). Preferentemente, el ARN no codificante es un miRNA.

35 En ciertas modalidades de este método de detección múltiple de una pluralidad de moléculas de ARN, la segunda secuencia de ADN de los puentes y las moléculas de ARN forman un heterodúplex de ADN/ARN que tiene una temperatura de fusión de entre 37-95 °C. Alternativamente, la segunda secuencia de ADN de los puentes y las moléculas de ARN forman un heterodúplex de ADN/ARN que tiene una temperatura de fusión de entre 44-53 °C. En otras modalidades, la tercera secuencia de ADN de los puentes y la primera secuencia de las etiquetas forman un dúplex de ADN/ADN que tiene una temperatura de fusión de entre 37-95 °C. Alternativamente, la tercera secuencia de ADN de los puentes y la primera secuencia de las etiquetas forman un dúplex de ADN/ADN que tiene una temperatura de fusión de entre 44-53 °C.

40 En una modalidad preferida de este método de detección múltiple de una pluralidad de moléculas de ARN, la segunda y tercera secuencias de ADN del puente forman dúplex de ácido nucleico que tienen sustancialmente la misma temperatura de fusión. En ciertos aspectos, la segunda y tercera secuencias de ADN del puente forman dúplex de ácido nucleico que tienen temperaturas de fusión dentro de 1 °C, 2 °C, 5 °C, 10 °C, 15 °C, 20 °C o cualquier grado en medio de estos. Preferentemente, la segunda y tercera secuencias de ADN del puente forman dúplex de ácido nucleico que tienen temperaturas de fusión dentro de 1 °C, 2 °C o 5 °C, o un grado entre estos.

45 En una modalidad de este método de detección múltiple de una pluralidad de moléculas de ARN, las moléculas de ARN y/o las etiquetas contienen secuencias que se hibridan específicamente con el puente con complementariedad completa. Alternativamente o de manera adicional, las moléculas de ARN y/o las etiquetas contienen secuencias que se hibridan específicamente con el puente con complementariedad parcial. En ciertos aspectos, la complementariedad parcial se define como menor que la complementariedad completa o menor que el 100 % de complementariedad. Alternativamente, la complementariedad parcial se define como la unión con menos del 100 %, 90 %, 80 %, 70 %, 60 %, 50 %, 40 %, 30 %, 20 %, 10 %, o cualquier valor de porcentaje intermedio.

50 Se describe un método de fabricación de una molécula puente de ácido nucleico, que incluye: (a) seleccionar una molécula de ARN; (b) seleccionar un segmento de la molécula de ARN que forma un heterodúplex de ADN/ARN con una molécula de ADN que se hibrida específicamente con el segmento de la molécula de ARN con una temperatura de fusión de entre 37-95 °C; (c) generar una primera molécula puente de ADN que se hibrida específicamente con el segmento de la molécula de ARN con una temperatura de fusión de entre 37-95 °C; (d) seleccionar una etiqueta, en donde la etiqueta incluye una secuencia de ADN que es una secuencia exógena; (e) seleccionar un segmento de la etiqueta que forme un dúplex ADN/ADN con una molécula de ADN que se hibrida específicamente con el segmento de la etiqueta con una temperatura de fusión de entre 37-95 °C; (f) generar una segunda molécula puente de ADN que se hibrida específicamente con el segmento de la etiqueta con una temperatura de fusión de entre 37-95 °C; y (g) unir la primera molécula puente de ADN con la segunda molécula puente de ADN, formando de esta manera la molécula

puente de ácido nucleico ADN que se hibrida específicamente con el segmento de la molécula de ARN objetivo con una temperatura de fusión de entre 37-95 °C y el segmento de la etiqueta que tiene una temperatura de fusión de entre 37-95°C.

5 En ciertos casos de este método de fabricación de una molécula puente de ácido nucleico, la etapa de unión incluye ligar la primera molécula puente de ADN a la segunda molécula puente de ADN. Alternativamente, la etapa de unión incluye la síntesis de una molécula puente de ácido nucleico ADN que contiene la secuencia de la primera molécula puente de ADN y la secuencia de la segunda molécula puente de ADN.

10 En un caso preferido de este método de fabricación de una molécula puente de ácido nucleico, la primera molécula puente de ADN y la segunda molécula puente de ADN tienen sustancialmente la misma temperatura de fusión. En ciertos aspectos, la segunda y tercera secuencias de ADN del puente forman dúplex de ácido nucleico que tienen temperaturas de fusión dentro de 1 °C, 2 °C, 5 °C, 10 °C, 15 °C, 20 °C o cualquier grado en medio de estos. Preferentemente, la segunda y tercera secuencias de ADN del puente forman dúplex de ácido nucleico que tienen
15 temperaturas de fusión dentro de 1 °C, 2 °C o 5 °C, o un grado entre estos.

En otro caso preferido de este método para fabricar una molécula puente de ácido nucleico, la segunda molécula puente de ADN se selecciona del extremo 5' de la primera secuencia de ADN de la etiqueta. Específicamente, la segunda molécula de ADN se selecciona de una porción de la primera secuencia de ADN de la etiqueta que incluye entre 2-5
20 nucleótidos, 2-10 nucleótidos, 2-20 nucleótidos, 2-30 nucleótidos, 2-40 nucleótidos, 2-50 nucleótidos, 2-60 nucleótidos, 2-70 nucleótidos, 2-80 nucleótidos, 2-90 nucleótidos, 2-100 nucleótidos o cualquier intervalo intermedio de nucleótidos a partir del extremo 5' de la primera secuencia de ADN de la etiqueta. Preferentemente, la segunda molécula de ADN se selecciona de una porción de la primera secuencia de ADN de la etiqueta que incluye entre 2-10 nucleótidos o entre 2-20 nucleótidos a partir del extremo 5' de la primera secuencia de ADN de la etiqueta.

25 En casos particulares de este método de fabricación de una molécula puente de ácido nucleico, el heterodúplex ADN/ARN tiene una temperatura de fusión de entre 43-52 °C. Alternativamente o de manera adicional, el dúplex ADN/ADN tiene una temperatura de fusión de entre 43-52 °C.

30 En un caso preferido de estos métodos de fabricación de una molécula puente de ácido nucleico, la primera molécula puente de ADN y la segunda molécula puente de ADN son contiguas. Alternativamente, la segunda y tercera secuencias de ADN se conectan a través de una molécula de enlace. En ciertos aspectos de este método, la molécula de enlace contiene entre 2-100 desoxirribonucleótidos, y específicamente, entre 2-10 desoxirribonucleótidos, 10-20
35 desoxirribonucleótidos, 20-30 desoxirribonucleótidos, 30-40 desoxirribonucleótidos, 40-50 desoxirribonucleótidos, 50-60 desoxirribonucleótidos, 60-70 desoxirribonucleótidos, 70-80 desoxirribonucleótidos, 80-90 desoxirribonucleótidos, 90-100 desoxirribonucleótidos, o cualquier número intermedio de desoxirribonucleótidos. La molécula de enlace puede contener una secuencia de desoxirribonucleótido (ADN) obtenida o derivada de cualquier especie, incluyendo secuencias exógenas.

40 En otros casos de este método de fabricación de una molécula puente de ácido nucleico, la molécula de ARN es un miRNA. Alternativamente, la molécula de ARN incluye un ARN no codificante. Preferentemente, el ARN no codificante es un miRNA.

45 Particularmente en estos casos de este método de fabricación de una molécula puente de ácido nucleico en donde la molécula de ARN es un miRNA, pero con respecto a todos los casos que se presentan en la presente descripción, la primera molécula puente de ADN se hibrida con la molécula de ARN con complementariedad completa. Alternativamente, la primera molécula puente de ADN se hibrida con la molécula de ARN con complementariedad parcial. Con respecto a todos los casos que se presentan en la presente descripción, la segunda molécula puente de
50 ADN se hibrida con la etiqueta con complementariedad completa. Alternativamente, la segunda molécula puente de ADN se hibrida con la etiqueta con complementariedad parcial. En algunos casos, la complementariedad parcial se define como menor que la complementariedad completa o menor que el 100 % de complementariedad. Alternativamente, la complementariedad parcial se define como la unión con menos del 100 %, 90 %, 80 %, 70 %, 60 %, 50 %, 40 %, 30 %, 20 %, 10 %, o cualquier valor de porcentaje intermedio.

55 Breve descripción de las figuras

La Figura 1 es un gráfico que representa la distribución de la temperatura de fusión de miRNA de humano (T_m) como el porcentaje (%) de miRNA de humano contra la T_m, en grados Celsius (°C).

60 La Figura 2 es una representación esquemática del heterodúplex ARN:ADN quimérico, donde la región reportera de unión (A) comprende la etiqueta de ADN, y las secuencias de ADN (C) y (D) comprenden el puente.

La Figura 3 es una representación esquemática del heterodúplex ARN:ADN quimérico, donde la región de unión reportera (A) y una secuencia adicional (B) comprenden la etiqueta de ADN, y las secuencias de ADN (C) y (D)
65 comprenden el puente.

La Figura 4 es una fotografía de un ensayo de electroforesis en gel. Se muestran los resultados de reacciones de ligación exitosas que se completaron a temperaturas de fusión de entre 45-52 °C y que contienen los miRNA, las etiquetas y los puentes correspondientes.

5

La Figura 5A es un gráfico que representa los niveles de expresión de miRNA en el ARN total aislado de músculo esquelético contra el ARN total aislado de tejido pulmonar. Las muestras se midieron mediante el uso del estuche para el ensayo de expresión de miRNA nCounter®.

10

La Figura 5B es un gráfico que representa los niveles de expresión de miRNA en el ARN total aislado de tejido cardíaco contra el ARN total aislado de tejido de colon. Las muestras se midieron mediante el uso del estuche para el ensayo de expresión de miRNA nCounter®.

15

La Figura 5C es un gráfico que representa los niveles de expresión de miRNA en el ARN total aislado de tejido cardíaco contra el ARN total aislado de tejido pulmonar. Las muestras se midieron mediante el uso del estuche para el ensayo de expresión de miRNA nCounter®.

20

La Figura 5D es un gráfico que representa los niveles de expresión de miRNA en el ARN total aislado de tejido de colon contra el ARN total aislado de músculo esquelético. Las muestras se midieron mediante el uso del estuche para el ensayo de expresión de miRNA nCounter®.

25

La Figura 6A es un gráfico que representa los niveles de expresión de miRNA de humano miR-133a, miR-143, miR-16, miR-21, miR-29a y miR-30 en el ARN total aislado de músculo esquelético, pulmón, colon y tejido cardíaco. Las muestras se midieron mediante el uso del estuche para el ensayo de expresión de miRNA nCounter®.

30

La Figura 6B es un gráfico que representa los niveles de expresión del miRNA de humano miR-1 en el ARN total aislado de músculo esquelético, pulmón, colon y tejido cardíaco. Las muestras se midieron mediante el uso del estuche para el ensayo de expresión de miRNA nCounter®.

35

La Figura 7 es un gráfico que representa los resultados de los ensayos multiplexados de expresión de miRNA nCounter®, para 55 miRNA de humano en 100 ng de ARN total purificado a partir de muestras de hígado humano congelado o fijado en formalina o embebido en parafina (FFPE), colectadas a partir de la misma fuente de tejido. Los resultados se representan como conteos en el ARN hepático FFPE correspondiente, contra conteos en el control de hígado congelado correspondiente.

40

La Figura 8 es un gráfico que representa la correlación de dos réplicas técnicas en las que se realizaron Ensayos multiplexados de Expresión de miRNA nCounter® para 676 miRNA de humano en 100 ng de ARN total de cerebro humano. Los datos se muestran como conteos de nCounter® (Réplica técnica #2) contra conteos nCounter® (Réplica técnica #1).

45

La Figura 9A es una serie de gráficos que representan mezclas de cinco miRNA sintéticos, canónicos (izquierda), variante 1 (centro) o variante 2 (derecha), que se ensayaron con los grupos de puentes canónicos y variantes en Ensayos multiplexados de Expresión de miRNA nCounter®. Los gráficos muestran los conteos que resultaron al probar cada una de las tres mezclas con los grupos de puentes canónicos (barras negras), variante 1 (barras blancas) y variante 2 (barras grises).

50

La Figura 9B es un gráfico que representa los resultados de los Ensayos de Expresión de miRNA nCounter® usados para medir una mezcla de 5 miRNA que contiene 60% de canónicos (negro), 30% de variante 1 (objetivo) y 10% de variante 2 (gris) para cada uno. La abundancia relativa de cada especie medida en el ensayo se indica como un porcentaje de la señal total para cada miRNA.

55

Descripción detallada

60

La invención proporciona una tecnología sensible que se basa en la hibridación para el análisis multiplexado de la expresión génica de ARNm y miRNA. En ciertas modalidades de la invención, se usa el sistema de análisis nCounter®. En los experimentos de detección de ARNm que usan el sistema de análisis nCounter®, altas temperaturas de la reacción de hibridación (típicamente 65 °C) promueven la interacción específica objetivo/reportero de una región objetivo de 70-100 bases. Tales ensayos no permiten la detección de pequeñas especies de ácidos nucleicos, por ejemplo miRNA, debido a la baja temperatura de fusión (T_m) de tales secuencias cortas. Por lo tanto, la invención resuelve este problema al proporcionar un ensayo novedoso, que puede usarse en el estuche para el ensayo de expresión de miRNA nCounter®, el cual es compatible con el sistema de análisis nCounter® que se describe en la presente descripción y permite la detección específica y sensible de ARN cortos, mediante el uso de microARN (miRNA) como un sistema modelo. El ensayo involucra unir una etiqueta específica de ADN a cada especie discreta de ARN pequeño, creando de esta manera un objetivo quimérico de ARN-ADN con una T_m que es lo suficientemente alta como para ser compatible con las condiciones de hibridación estándar del Sistema de Análisis nCounter®. La adición de la

65

etiqueta puede realizarse de una manera multiplexada, de manera que una sola muestra puede analizarse simultáneamente para cientos de especies de ARN pequeños. Una característica clave de esta invención es la unión altamente específica de cada etiqueta bajo condiciones de reacción definidas estrechamente, de modo que la especificidad y eficacia de la reacción de unión de la etiqueta se mantiene en un formato múltiplex, donde todas las interacciones separadas tienen lugar simultáneamente y bajo las mismas condiciones de reacción.

Los microARN (miRNA) son moléculas pequeñas de ARN, endógenas, no codificantes, reguladoras, monocatenarias, de aproximadamente 21-23 nucleótidos de longitud. Mientras que los miRNA en general muestran una gran diversidad de secuencias, existen pequeños grupos de miRNA (familias de miRNA) con >90 % de identidad de secuencia. Los ensayos que se basan en la hibridación para la detección sensible de especies casi idénticas son más sensibles cuando la hibridación ocurre cercana a la T_m de las especies objetivo. Dichas condiciones reducen considerablemente la hibridación cruzada entre las secuencias casi idénticas, al maximizar la desestabilización termodinámica entre especies objetivo y las mal apareadas. La diversidad de secuencia general de los miRNA y otros ARN pequeños complica la detección multiplexada de su expresión mediante hibridación ya que significa que la temperatura de hibridación óptima (es decir la T_m del objetivo) varía de objetivo a objetivo (Figura 1). Una segunda característica clave del estuche para el ensayo de expresión de miRNA nCounter® es el diseño objetivo específico de cada etiqueta de ADN sintético que permite la normalización de las diversas T_m de las secuencias de ARN pequeños que ocurren de manera natural; en otras palabras, las etiquetas individuales se diseñan para hacer equivalentes las T_m finales de las quimeras de ARN-ADN, independientemente de la T_m de la secuencia biológica de ARN subyacente. Esto permite que en ensayo de detección de hibridación subsecuente se realice a una temperatura única para todas las especies, y de esta manera permite realizar la reacción de detección multiplexada.

MicroARN

Los microARN (miRNA) son ARN pequeños, no codificantes, reguladores que actúan de manera hipotética inhibiendo la traducción del ARN mensajero (ARNm) en proteína, al unirse a la región 3' no traducible (UTR) de sus ARNm objetivo. Los miRNA inhiben la traducción del ARNm ya sea al causar la degradación del ARNm o al inhibir la traducción en sí.

Los miRNA son moléculas de ARN monocatenario de aproximadamente 21-23 nucleótidos de longitud. Los miRNA están codificados en genes endógenos y exógenos que se transcriben a partir de ADN genómico; sin embargo, los miRNA típicamente no se traducen en secuencias polipeptídicas. Como tal, los miRNA se consideran en la técnica como "ARN no codificantes". El término gen "endógeno" como se usa en la presente pretende abarcar todos los genes que se producen de manera natural dentro del genoma de un individuo. El término gen "exógeno" como se usa en la presente pretende abarcar todos los genes que no se producen de forma natural dentro del genoma de un individuo. Por ejemplo, un miRNA podría introducirse de manera exógena a través de un virus.

Las moléculas de miRNA que se detectan en la invención incluyen pri-miRNA, pre-miRNA y miRNA maduros. Los miRNA maduros se transcriben inicialmente a partir de ADN genómico en pri-miRNA. El pri-miRNA contiene al menos 1 (hasta 6 cuando se transcriben a partir de unidades policistrónicas) estructura de lazo horquilla, que tienen cada una aproximadamente 70 nucleótidos de longitud. Existe la posibilidad de que un único pri-miRNA contenga múltiples miRNA. El pri-miRNA también puede someterse a la edición de ARN en donde se altera el procesamiento o la especificidad del miRNA. El pri-miRNA se corta en el núcleo de la célula a unos 11 nucleótidos de la base de cada estructura horquilla (2 vueltas helicoidales de ARN dentro del tallo) para formar el pre-miRNA. Se introducen cortes escalonados en los extremos de los brazos del lazo horquilla, dando como resultado 2 nucleótidos sobresalientes en el extremo 3' y un fosfato en el extremo 5' para producir un pre-miRNA de aproximadamente 70 nucleótidos de longitud. En el citoplasma, el pre-miRNA se corta y da como resultado un dúplex miRNA:miRNA* imperfecto de aproximadamente 20-25 pares de nucleótidos de longitud, que contiene la hebra de miRNA maduro y su hebra opuesta complementaria de miRNA*. La hebra pasajera, o la hebra complementaria de miRNA*, normalmente se degrada y se presenta en niveles inferiores en las células en estado estacionario, aunque hay casos en que ambas hebras del dúplex se vuelven miRNA funcionales que regulan diferentes poblaciones de miRNA.

El término "miRNA" es equivalente a otros términos que se usan para describir moléculas de ácido nucleico que son capaces de mediar el silenciamiento o interferencia génica secuencia específica, por ejemplo, ARN corto interferente (siRNA), ARN bicatenario (dsRNA), ARN interferente (RNAi), ARN corto horquilla (shRNA), oligonucleótidos interferentes cortos, ácido nucleico interferente corto, siRNA corto interferente modificado químicamente, ARN de silenciamiento génico postranscripcional (ptgsRNA) y otros equivalentes reconocidos en la técnica. Como se usa en la presente, el término "silenciamiento génico" pretende describir la regulación a la baja, la inactivación, la degradación, la inhibición, la supresión, la represión, la prevención o la disminución de la expresión de un gen, transcrito y/o producto polipeptídico. El silenciamiento e interferencia génica también describen la prevención de la traducción de transcritos de ARNm a un polipéptido. La traducción se previene, inhibe o disminuye al degradar los mRNA transcritos o al bloquear la traducción del ARNm.

Los puentes usados en la invención se unen específicamente a sus miRNA objetivo basándose en la complementariedad de secuencia parcial o completa. Los miRNA ilustrativos se proporcionan en la Tabla 1, a continuación.

Tabla 1: miRNA de humano ilustrativos

	Sec. con núm. de ident.:	Secuencia	miRBase™ ID
5	1	UGAGGUAGUAGGUUGUAUAGUU	hsa-let-7a
	2	UGAGGUAGUAGGUUGUGUGUU	hsa-let-7b
10	3	UGAGGUAGUAGGUUGUAUGUU	hsa-let-7c
	4	AGAGGUAGUAGGUUGCAUAGU	hsa-let-7d
	5	UGAGGUAGGAGGUUGUAUAGU	hsa-let-7e
15	6	UGAGGUAGUAGAUUGUAUAGUU	hsa-let-7f
	7	UGAGGUAGUAGUUUGUACAGU	hsa-let-7g
	8	UGAGGUAGUAGUUUGUCUGU	hsa-let-7i
20	9	UGGAAUGUAAAGAAGUAUGUA	hsa-miR-1
	10	AACCCGUAGAUCGAAACUUGUG	hsa-miR-100

Todas las secuencias de miRNA están disponibles públicamente en (www.mirbase.org).

25 Resumen del protocolo y formato de los datos del Sistema de Análisis nCounter®

La base del sistema de Análisis nCounter® es el código único que se asigna a cada gen a analizar (solicitud de patente internacional núm. WO 2008/124847 y Geiss y otros, *Nature Biotechnology*. 2008. 26(3): 317-325). El código se compone de una serie ordenada de puntos fluorescentes de colores que crean un código de barras único para cada objetivo a analizar. Un par de sondas se diseña para cada objetivo, una sonda de captura biotinilada y una sonda reportera que lleva el código de barras fluorescente.

Las sondas reportera y de captura específicas se sintetizan para cada objetivo. Brevemente, las sondas oligonucleotídicas de ADN secuencia específicas se unen a moléculas reporteras código específicas. Las sondas de captura se preparan mediante la ligación de un segundo oligonucleótido de ADN secuencia específico para cada objetivo a un oligonucleótido universal que contiene biotina. Las sondas reportera y de captura se agrupan en una sola mezcla de hibridación, la "biblioteca de sondas".

Los niveles de expresión de todos los blancos se miden en una única reacción de hibridación multiplexada. La muestra se combina con la biblioteca de sondas y la hibridación ocurre en solución. Después de la hibridación, los complejos tripartitos hibridados se purifican en un procedimiento de dos etapas mediante el uso de perlas magnéticas unidas a oligonucleótidos complementarios a las secuencias universales presentes en las sondas de captura y reporteras. Este proceso de purificación dual permite realizar la reacción de hibridación con un gran exceso de sondas específicas para el objetivo, ya que finalmente se eliminan y, por lo tanto, no interfieren con la unión y la obtención de imágenes de la muestra. Todas las etapas posteriores a la hibridación se realizan de forma robotizada en un robot de manejo de líquidos personalizado (Estación de Preparación, NanoString Technologies).

Las reacciones purificadas se depositan en celdas de flujo individuales de un cartucho de muestra mediante el uso de la Estación de Preparación, se unen a una superficie recubierta de estreptavidina a través de la sonda de captura, se someten a electroforesis para alargar las sondas reporteras, y se inmovilizan. Después del procesamiento, el cartucho de muestra se transfiere a un dispositivo de captura de imágenes y datos totalmente automatizado (Analizador Digital, NanoString Technologies). El nivel de expresión de un objetivo se mide al tomar imagen de cada muestra y contar el número de veces que se detecta el código para ese objetivo. Para cada muestra, típicamente se toman imágenes de 600 campos de visión (FOV) (1376 X 1024 píxeles) que representan aproximadamente 10 mm² de la superficie de unión. La densidad de imagen típica es de 100-1200 conteos de reporteros por campo de visión en dependencia del grado de multiplexación, la cantidad de ARN y los niveles generales de expresión del objetivo. Los datos se publican en formato de hoja de cálculo simple que registra el número de conteos por objetivo, por muestra.

60 Protocolo de Preparación de la Muestra para Ensayo de Expresión de miRNA en nCounter®

En el Ensayo de Expresión de miRNA nCounter®, las muestras de miRNA deben unirse a la etiqueta antes de que puedan introducirse en la reacción de hibridación de la sonda del Sistema de Análisis nCounter® que se describe anteriormente. A menos que se indique lo contrario, los datos en los ejemplos que se proporcionan se generaron mediante el uso de una modalidad del protocolo de preparación de muestras del estuche de Ensayo de Expresión de

miRNA nCounter® que se describe a continuación, seguido del protocolo de Ensayo Estándar nCounter® que se describió brevemente con anterioridad y en Geissy otros.

5 El tampón de hibridación (Tris 200 mM, KCl 750 mM) se mezcló con una mezcla de etiquetas. La mezcla de etiquetas incluye 60 nM cada uno de un grupo de los oligonucleótidos de ADN sintéticos (Integrated DNA Technologies, Coralville, IA) similares a los que se describen en la Tabla 2. La composición exacta de esta mezcla depende de los miRNA específicos que se miden. Se adiciona una cantidad equivalente de una mezcla de puentes a la mezcla. La mezcla de puentes consta de 55 nM cada uno de un grupo de los oligonucleótidos de ADN sintéticos (Integrated DNA Technologies) similares a los que se describen en la Tabla 3. La composición exacta de esta mezcla dependió de los miRNA específicos que se midieron, y coincidían con el perfil de la mezcla de etiquetas. Se añaden 100 ng de ARN total o una cantidad definida de ARN objetivo sintético (Integrated DNA Technologies) y agua tratada con DEPC (Ambion, Austin, TX) para normalizar el volumen de cada reacción. Las muestras se desnaturalizaron e hibridaron en un termociclador (BioRad, Hercules, CA) °C. Se preparó para añadir luego una mezcla de partes iguales de 50 % PEG-4000 (CalBioChem/EMD Biosciences, San Diego, CA) y tampón de ADN Ligasa T4 (Enzymatics, Beverly, MA). Las muestras se retiraron brevemente del termociclador, se añadió a cada tubo la solución concentrada de tampón de PEG/ligasa, y las muestras se mezclaron y centrifugaron brevemente. Los tubos se colocaron nuevamente en el termociclador y se añadió la T4 DNA Ligasa (Enzymatics) directamente a las muestras sin retirarlas del termociclador. Todas las reacciones en termociclador se realizaron a temperaturas en el intervalo de 45-50 °C (Figura 4).

20 La Exonucleasa Lambda (Enzymatics) se añadió a cada muestra a temperatura ambiente. Las muestras se incubaron a 37 °C durante 2 horas, se inactivaron por calor a 70 °C y se enfriaron. La muestra se diluye 10 veces con agua tratada con DEPC y se usa como sustrato en una reacción de hibridación en nCounter® mediante el uso de un registrador para detección de miRNA (NanoString Technologies, Seattle, WA), siguiendo las instrucciones del fabricante.

25 La adición de la ligasa debería tomar aproximadamente 6 minutos para 24 muestras. La adición directa de la ligasa a los tubos de reacción en el bloque térmico a 48 °C es una etapa crítica. De lo contrario, la calidad del ensayo disminuye, especialmente en términos de especificidad del ensayo.

30 Las reacciones de desnaturalización, hibridación, ligación y purificación que se describen en la presente descripción pueden realizarse dentro de un intervalo más amplio de temperaturas que abarcan, por ejemplo, de 37-95 °C. Específicamente, las reacciones de desnaturalización, hibridación, ligación y purificación que se describen en la presente descripción se realizan con uno o más de los siguientes intervalos incluyendo, pero limitados a, 37-45 °C, 44-53 °C, 45-52 °C, 45-50 °C, 50-55 °C, 55-60 °C, 65-70 °C, 70-75 °C, 75-80 °C, 85-90 °C y 90-95 °C. Alternativamente, las reacciones de desnaturalización, hibridación, ligación y purificación se describen en la presente descripción se realizan con uno o más de los siguientes intervalos incluyendo, pero limitados a, 37-45 °C, 37-50 °C, 37-55 °C, 37-60 °C, 37-65 °C, 37-70°C, 37-75 °C, 37-80 °C, 37-85 °C, 37-90 °C y 37-95 °C.

40 nCounter® En los ejemplos que se muestran más abajo, los datos de los ensayos se representan como el número de conteos detectados en 600 campos de visión con el Sistema de Análisis nCounter®. El número de conteos correlaciona con el nivel de expresión del ARN objetivo.

Más abajo, en la Tabla 1 se muestran secuencias ilustrativas de la etiqueta y del puente, apropiadas para la detección de los miRNA correspondientes.

45 Tabla 2: Secuencias ilustrativas de la etiqueta

miRNA	Secuencia de la etiqueta	Sec. con núm. de ident.:
50 hsa-let-7a	GGGCTTGACATCGGCGACACAAAATGCTTCTAACTCGCTGTGAAT	11
hsa-let-7b	GGGATATATTCCTTTTTTTTGAATTAAGTCCAGGCGATCTGTTG	12
hsa-let-7c	GCTGCGTAGTTTATCTGCATCACTCGTACTGAAATGCTCACA	13
55 hsa-let-7d	GGAGTAGTTTGTCTTCTGGAATTTCTTCTTTGATTTTGCCATTTT	14
hsa-let-7e	GTCGAAGTCCTTCGAGTGCATGAGCTGTCTTTCACATGATACATCG	15
hsa-let-7f	GGTGGGGCTTGTCGACTGATAGTAACTGTGGTTTCGAGTTATGCG	16
hsa-let-7g	GACGGTCCTAGAAGTCAAAAAGCTGCTTGATCGAAAAAAGCAG	17
60 hsa-let-7i	GGTTTTAATAGCGCGAGAACAAGTGAACGTGTATAGTTGCCATGCTG	18
hsa-miR-1	GCCGTGACCCAACCTATTCCATTGCCTCCAAACCAGCCCTTG	19
65 hsa-miR-100	GAAAAATAAAAAGTAAATTGGGCAATACCACAAAATCGTTCTTTATGGGGT	20

Tabla 3: Secuencias ilustrativas del puente

	miRNA	Secuencia del puente	Sec. con núm. de ident.:
5	hsa-let-7a	TGTCAAGCCCAACTATACAACCTACTAC	21
	hsa-let-7b	AAGGAATATATCCCAACCACACAACCTAC	22
10	hsa-let-7c	ACTACGCAGCAACCATACAACCTACT	23
	hsa-let-7d	GACAACTACTCCAACCTATGCAACCTACT	24
	hsa-let-7e	AGGACTTCGACAACCTATACAACCTCC	25
15	hsa-let-7f	AGCCCCACCAACTATACAATCTACTACC	26
	hsa-let-7g	CTAGGACCGTCAACTGTACAACTACTACC	27
	hsa-let-7i	CGCTATTTAAACCAACAGCACAACTACTAC	28
20	hsa-miR-1	GGTCACGGCATACTACTTCTTTACATT	29
	hsa-miR-100	TTTACTTTTTATTTTTCCACAAGTTCGGATCT	30

Diseño del puente y de la etiqueta

La adición de una etiqueta de ácido nucleico específica al ARN pequeño objetivo tiene dos propósitos principales: 1) agregar un identificador único y robusto a cada especie de ARN, lo que facilita la discriminación entre los ARN objetivo estrechamente relacionados en un ensayo que se basa en la hibridación; y 2) permite la manipulación y eculización de las T_m funcionales de los blancos de manera que puedan realizarse a la misma temperatura ensayos multiplexados de hibridación para diferentes ARN blancos.

Para evitar la hibridación cruzada, lo cual podría conducir a señales falsas positivas, la secuencia de la etiqueta no debe estar relacionada con ninguna otra secuencia en el transcriptoma del organismo del que se derivan las secuencias del ARN pequeño objetivo. De manera óptima, la secuencia de la etiqueta no estará relacionada con el transcriptoma de ningún organismo conocido, de manera que las mismas etiquetas pueden usarse para generar un estuche nCounter® de Preparación de Ensayo de ARN Pequeño para cualquier organismo. La hibridación cruzada se evitó mediante el uso de secuencias novedosas de la base de datos del Consorcio de Controles Externos de ARN (ERCC) como punto de partida para generar las secuencias etiqueta.

Para facilitar la síntesis, las etiquetas de ácido nucleico se diseñaron como oligonucleótidos de ADN, los cuales se ligaron covalentemente al extremo 3' de cada ARN, formando un objetivo quimérico de ADN-ARN para la detección. El ensayo de detección, basado en el Sistema de Análisis nCounter® de NanoString, se basa en la hibridación de dos sondas adyacentes, cada una con una T_m de 76 °C a 84 °C, con el objetivo. El objetivo quimérico de ARN-ADN final se diseñó para comprender dos regiones, una región reportera de unión y una región de captura de unión, cada una con una T_m de aproximadamente 76 °C a 84 °C.

La ligación de las etiquetas debe ser altamente específica, tanto individualmente como en una configuración multiplexada. Esta especificidad se logra a través del diseño individual de puentes de oligonucleótidos de ADN que se hibridan de manera secuencia específica al ARN pequeño en un extremo y a la etiqueta específica en el otro extremo (Figura 2), lo cual une al ARN y su etiqueta asignada en cercanía, permitiendo un evento de ligación para formar un enlace covalente entre los dos. La capacidad de multiplexar las ligaciones de cientos de especies diferentes de ARN pequeños con sus respectivas etiquetas se logró mediante un diseño cuidadoso de las secuencias puente y etiqueta basado en cálculos de las T_m de las interacciones puente/ARN/etiqueta de manera que todos los puentes se hibridan específicamente a sus ARN y etiquetas objetivo dentro de un intervalo de temperatura estrecho, con T_m calculadas de entre 44 °C y 53 °C. Un ejemplo de estas secuencias analizadas se muestra en la Tabla 4.

Todos los cálculos de la T_m de ADN/ADN se realizaron mediante el uso de los métodos que se describen en Allawi H.T., Santa Lucia J. (1997) Thermodynamics and NMR of internal G-T mismatches in DNA. *Biochemistry* 36: 10581-10594 y Santa Lucia J. Jr, Allawi H.T., Seneviratne P.A. (1996). Improved nearest-neighbor parameters for predicting DNA duplex stability. *Biochemistry* 35: 3555-3562.

Todos los cálculos de la T_m de ARN/ADN se realizaron mediante el uso de los métodos que se describen en Sugimoto N., Nakano S., Kato M., Matsumura A., Nakamuta H., Ohmichi T., Yoneyama M., Sasaki M. (1995). Thermodynamic parameters to predict stability of ARN/DNA hybrid duplexes, *Biochemistry* 34: 11211-11216 y Santa Lucia J. Jr, Allawi H.T., Seneviratne P.A. (1996) Improved nearest-neighbor parameters for predicting DNA duplex stability,

Biochemistry35: 3555-3562). Debe notarse que el ajuste de las concentraciones de Na⁺ en los cálculos ADN/ARN se realizó mediante el uso de coeficientes de dúplex de ADN en Santa Lucia y otros.

Diseño de la Etiqueta y el Puente

5

Se generó una mezcla inicial de secuencias seleccionando las secuencias de la base de datos de secuencias del Consorcio de Controles Externos de ARN (ERCC) (disponible públicamente en <http://ukpmc.ac.uk/articlerender.cgi?artid=486406>).

10

Estas secuencias se procesaron dividiéndolas en regiones de 35 bases y calculando sus T_m predichas. Se creó una 'mezcla de reportero de unión' de secuencias de 35 bases con una T_m ADN/ARN entre 76 °C y 84 °C. Se creó una segunda 'mezcla general' a partir de las secuencias restantes de longitudes aleatorias. Para cada secuencia corta de ARN (mostrada como una línea punteada en las Figuras 2 y 3), se seleccionó arbitrariamente una secuencia de 35 bases de la mezcla de reportero de unión y se asignó como la región reportera de unión (Figuras 2-3, fragmento A). Se generó la hebra reversa complementaria del ARN pequeño, la secuencia de ARN-RC, y se calculó la T_m del ARN/ARN predicho de un dúplex en el que la hebra de ADN era el ARN-RC. Con base en el resultado de este cálculo, el diseño de la etiqueta y el puente para cada secuencia de ARN pequeño específica se asignó a una de las dos estrategias de diseño, Tipo 1 o Tipo 2.

15

20

Diseño Tipo 1.

El diseño tipo 1 de la etiqueta y el puente se muestra en la Figura 2. Si la T_m calculada de ARN/ARN del dúplex de ADN reverso complementario al ARN (dúplex de ADN/ARN-RC) era entre 76 °C y 84 °C, entonces el fragmento A en la Figura 2 definió la longitud completa de la etiqueta y la secuencia corta de ARN (por ejemplo, la secuencia de miRNA) definió la región de captura de unión. La secuencia del puente (Figura 2, fragmentos C+D) se calculó subsecuentemente en 2 partes: el segmento puente del ARN pequeño (C) y el segmento puente de la etiqueta (D). El segmento puente del ARN pequeño se generó tomando la secuencia de ADN ARN-RC e identificando el fragmento de la secuencia en el extremo 5' con una T_m calculada del ARN/ARN entre 44 °C y 53 °C. El segmento puente de la etiqueta se generó tomando la hebra reversa complementaria de la región reportera de unión (A) e identificando el fragmento de secuencia en el extremo 3' con una T_m calculada del ADN/ARN entre 44 °C y 53 °C. La secuencia puente completa se creó uniendo el extremo 5' del segmento puente del ARN pequeño al extremo 3' del segmento puente de la etiqueta (C+D).

25

30

Diseño Tipo 2

El diseño tipo 2 de la etiqueta y el puente se muestra en la Figura 3. Si la T_m calculada del dúplex de ADN/ARN-RC estaba por debajo de 76 °C, entonces se seleccionó un segmento adicional de secuencia de ADN de tamaño aleatorio a partir de la mezcla general de secuencias, se añadió al extremo 5' del ARN-RC y se calculó la T_m predicha de ADN/ARN de la combinación de estas secuencias. El dúplex que en realidad forma esta porción en el ensayo final de hibridación es un dúplex de ADN/ARN-ADN-quimera, pero el cálculo se simplificó para reflejar una interacción ADN/ARN. Este proceso se repitió hasta que se encontró una combinación de secuencias con una T_m ADN/ARN predicha entre 76 °C y 84 °C. Este segmento adicional de secuencia se muestra como el segmento B en la Figura 3. La etiqueta de longitud completa se creó al unir B al extremo 5' de A (Figura 3). La secuencia del ARN pequeño combinada con el segmento B definió la región de captura de unión.

40

45

La secuencia puente (C+D, Figura 3) se calculó en 2 partes: el segmento puente del ARN pequeño (C) y el segmento puente de la etiqueta (D, Figura 3). El segmento puente del ARN pequeño se generó de manera idéntica a la descrita en el diseño Tipo 1 anterior. El segmento puente de la etiqueta se generó tomando la hebra reversa complementaria de la secuencia etiqueta Tipo 2 (B+A, Figura 3) e identificando el fragmento de secuencia en el extremo 3' con una T_m ADN/ARN calculada entre 44 °C y 53 °C. La secuencia puente completa se creó uniendo el extremo 5' del segmento puente del ARN pequeño al extremo 3' del segmento puente de la etiqueta (C+D).

50

Tabla 4: Secuencias Adicionales

Nombre del miRNA	Secuencia Adicionada	Longitud	T _m (ARN:DNA)
let-7a	GUAGUAGGUUGUAGUAGUU (Sec. con núm. de ident.: 31)	18	48.6753
let-7b	GUAGGUUGUGUGGUU (Sec. con núm. de ident.: 32)	15	49.7397
let-7c	AGUAGGUUGUAGGUU (Sec. con núm. de ident.: 33)	16	50.4865
let-7d	AGUAGGUUGCAUAGUU (Sec. con núm. de ident.: 34)	16	50.5324
let-7e	GGAGGUUGUAGUAGUU (Sec. con núm. de ident.: 35)	15	48.3192

55

60

65

Secuencias de ADN exógeno

5 El término "secuencia de ADN exógeno" describe una secuencia de ADN aleatorizada que tiene una reactividad cruzada mínima o despreciable con cualquier genoma conocido. La homología y/o identidad de una secuencia de ADN exógeno candidata se compara con todas las secuencias conocidas en una especie particular o en todas las especies, por ejemplo, mediante el uso de los programas NBLAST y BLAST de Altschul, y otros (J. Mol. Biol. 215:403-10 (1990)). Las secuencias de ADN exógeno no codifican genes o elementos reguladores de estos. Por el contrario, las secuencias de ADN exógeno tienen funciones no codificantes dentro de las composiciones, métodos y estuches de la invención.

10 Las secuencias de ADN exógeno se usan dentro de las composiciones, métodos y estuches de la invención para minimizar o prevenir las interacciones (por ejemplo la hibridación) entre moléculas que contienen secuencias de ADN exógeno y moléculas que se aíslan de una muestra objetivo, genoma, célula, animal o extracto de estos (por ejemplo moléculas de ARN objetivo, puentes no correspondientes, marcas no correspondientes, moléculas reporteras no correspondientes). Las moléculas de ARN objetivo y los puentes correspondientes, y las etiquetas comparten complementariedad de secuencia parcial o completa, mientras que las moléculas de ARN objetivo no comparten complementariedad de secuencia parcial o completa con puentes o etiquetas no correspondientes. Las moléculas reporteras y las etiquetas correspondientes comparten complementariedad de secuencia parcial o completa, mientras que las moléculas reporteras no comparten complementariedad de secuencia parcial o completa con las etiquetas no correspondientes.

20 Las moléculas etiqueta, las moléculas reporteras y las moléculas puente contienen secuencias de ADN exógeno. Las moléculas de ADN exógeno que se encuentran dentro de una etiqueta y un puente correspondiente se hibridan específicamente entre sí, y de manera óptima, con ninguna otra molécula presente en la composición durante la desnaturalización, la hibridación, la ligación y/o la reacción de purificación. Alternativamente, las moléculas de ADN exógeno que se encuentran dentro de una etiqueta y un puente correspondiente se hibridan específicamente entre sí, y preferentemente, tienen una homología inferior al 15 % a lo largo de 35-50 bases, con una homología máxima continua de 15 bases o menos, con las otras moléculas presentes en la composición durante la reacción de desnaturalización, hibridación, ligación y/o purificación. Una molécula reportera que contiene una secuencia de ADN exógeno puede hibridarse específicamente con la molécula de miRNA etiquetada correspondiente después de la reacción de purificación, y de manera óptima, con ninguna otra molécula presente en la composición. Alternativamente, una molécula reportera que contiene una secuencia de ADN exógeno puede hibridarse específicamente con la molécula de miRNA marcada correspondiente después de la reacción de purificación, y preferentemente, tiene una homología inferior al 15 % a lo largo 35-50 bases, con una homología máxima continua de 15 bases o menos, con las otras moléculas presentes en la composición.

35 Las secuencias de ADN exógeno ilustrativas abarcadas por la invención no tienen una identidad mayor al 85% a lo largo de 35-50 bases, con una homología máxima continua de 15 bases o menos, con cualquier secuencia de ADN o ARN genómico conocida. Además, el ADN exógeno no tiene una identidad mayor al 85% a lo largo de 35-50 bases, con una homología máxima continua de 15 bases o menos, secuencia conocida de ADN o ARN de un genoma o que se transcribe a partir de un genoma a partir del cual la molécula de ARN objetivo se transcribe. Las moléculas de ARN objetivo provienen de o se transcriben a partir de los genomas de cualquier especie, que incluyen, pero no se limitan a, animales, plantas, bacterias, hongos y virus. Las especies a partir de las cuales se derivan los ARN objetivo que se prefieren incluyen mamíferos, incluyendo con la máxima preferencia a humanos, primates y ratón.

40 Las secuencias de ADN exógeno tienen una homología inferior al 15 % a lo largo de 35-50 bases, con una homología máxima continua de 15 bases o menos, con todas las moléculas conocidas de ADN y ARN. Específicamente, las secuencias de ADN exógeno tienen una homología inferior al 15 % a lo largo de 35-50 bases, con una homología máxima continua de 15 bases o menos, con todas las moléculas de ADN y ARN en una composición o estuche. Específicamente, la secuencia de ADN exógeno tiene una homología inferior a 15 %, 10 %, 5 %, 2 %, 1 % o cualquier punto porcentual intermedio, a lo largo de 35-50 bases, con una homología máxima continua de 15 bases o menos, con las moléculas de ADN y ARN en una composición o estuche.

45 Las secuencias de ADN exógeno pueden hibridarse con una porción de un puente que contiene ADN, o específicamente, ADN exógeno. Específicamente, la secuencia de ADN exógeno tiene una homología inferior al 15 %, 10 %, 5 %, 2 %, 1 % o cualquier punto porcentual intermedio, a lo largo de 35-50 bases, con una homología máxima continua de 15 bases o menos, con cualquier molécula de ADN y ARN en la composición que no sea la tercera secuencia de ADN del puente.

Moléculas de ácido nucleico

60 La invención emplea puentes y etiquetas, por ejemplo, moléculas de ácido nucleico aisladas y purificadas que se unen a moléculas de ARN pequeños, incluyendo moléculas de miRNA. Las moléculas etiqueta ilustrativas incluyen, pero no se limitan a, aquellas moléculas de ácido desoxirribonucleico con Número de Identidad: 11-20. Las moléculas puente ilustrativas incluyen, pero no se limitan a, aquellas moléculas de ácido desoxirribonucleico de con Número de Identidad: 21-30.

Se describen moléculas de ácido nucleico aisladas, tales como moléculas de ARN y puentes y etiquetas de ADN, las secuencias de unión contienen una o más inserciones, deleciones, inversiones, desplazamientos del marco de lectura, translocaciones, recombinaciones o sustituciones.

5

Las moléculas de ácido nucleico aisladas incluyen moléculas de ácido ribonucleico (ARN) monocatenario y bicatenario y ácido desoxirribonucleico (ADN), así como también todos los análogos, derivados o moléculas híbridas de estos reconocidos en la técnica. Las moléculas de ácido nucleico aisladas también incluyen reactivos para sintetizar moléculas de ARN, puentes y etiquetas, como genes aislados de longitud completa, transcritos, moléculas de ADNc, cebadores, vectores, plásmidos, moléculas de ARN endógeno o de origen natural, puentes, etiquetas y fragmentos de estos.

10

Las moléculas de ácido nucleico aisladas se modifican para unir secuencias de ARN, ADN o secuencias de ADN "exógeno" que son distintas de la mayoría de los otros ácidos nucleicos presentes en la fuente natural de la molécula de ácido nucleico. Además, una molécula de ácido nucleico "aislada" puede estar sustancialmente libre de otro material celular, o medio de cultivo cuando se produce por técnicas recombinantes, o precursores químicos u otros productos químicos cuando se sintetiza químicamente. Una molécula de ácido nucleico puede fusionarse con otras secuencias codificantes o reguladoras y todavía puede considerarse "aislada". Las moléculas de ácido nucleico presentes en animales transgénicos no humanos, que no ocurren naturalmente en el animal, también se consideran "aisladas". Por ejemplo, las moléculas de ácido nucleico recombinante contenidas en un vector se consideran "aisladas". Otros ejemplos de moléculas de ácido nucleico "aisladas" incluyen moléculas recombinantes de ADN o ARN que se mantienen en células hospedadoras heterólogas, y moléculas purificadas (parcial o sustancialmente) de ADN o ARN en solución. Las moléculas de ARN aisladas incluyen transcritos de ARN *in vivo* o *in vitro* de las moléculas de ácido nucleico aislado. Además, las moléculas de ARN aisladas incluyen, pero no se limitan a, ARN de transferencia (tRNA), ARN nucleolar pequeño (snoRNA), microARN (miRNA), un ARN pequeño interferente (siRNA), ARN pequeño en horquilla (shRNA), un ARN pequeño interferente asociado a repeticiones (rasiRNA) y ARN asociado a piwi (piRNA). Las moléculas de ácido nucleico aisladas incluyen además estas moléculas producidas sintéticamente.

15

20

25

30

Generalmente, una molécula de ácido nucleico aislada comprende una o más secuencias que se modifican para unir una molécula de ARN, puente o etiqueta, con secuencias de nucleótidos flanqueantes en cualquier lado de la secuencia del ARN objetivo, puente o etiqueta. Una secuencia flanqueante puede incluir residuos nucleotídicos que se asocian de forma natural con el ARN objetivo, el puente o la etiqueta y/o secuencias nucleotídicas heterólogas. Preferentemente, la secuencia flanqueante es de hasta aproximadamente 500, 300, 100, 60, 50, 30, 25, 20, 15, 10, 8 o 4 nucleótidos (o cualquier otra longitud intermedia) en cualquier lado de la secuencia del ARN objetivo, puente o etiqueta, o tan larga como la longitud completa del gen, la secuencia codificante o no codificante completa (o cualquier porción de estas, como un exón, intrón o una región 5' o 3' no traducible).

35

Como se usa en la presente descripción, el término "fragmento" pretende describir una molécula de ácido nucleico aislada que es más corta que la molécula de ácido nucleico aislada de la que se deriva. Los fragmentos de moléculas de ácido nucleico aisladas pueden contener, consistir en, o comprender cualquier parte de la molécula de ácido nucleico aislada de la que se deriva. Típicamente, un fragmento comprende una secuencia de nucleótidos contigua de al menos aproximadamente 8 o más nucleótidos, con mayor preferencia al menos aproximadamente 10 o más nucleótidos, e incluso aún con mayor preferencia al menos aproximadamente 15 o más nucleótidos. Además, un fragmento podría comprender al menos aproximadamente 8, 10, 15, 20, 25, 30, 35, 40, 45, 50, 55, 60, 65, 70, 75, 80, 85, 90, 95, 100, 250 o 500 (o cualquier otro número intermedio) nucleótidos de longitud. La longitud del fragmento se basará en su uso previsto. Luego puede usarse una sonda marcada, por ejemplo, para tamizar una biblioteca de ADNc, una biblioteca de ADN genómico o ARNm para aislar el ácido nucleico que corresponde a la región de interés. Además, los cebadores y las sondas pueden usarse en reacciones de amplificación, para propósitos como ensayar genes de ARN o miRNA, la reactividad cruzada de moléculas de ARN con puentes o etiquetas, la homología de moléculas de ARN con secuencias puente o etiqueta, la identidad de moléculas de ARN con secuencias puente o secuencias etiquetas, o para clonar regiones específicas de una molécula de ARN o gen, una molécula puente o una molécula reportera.

40

45

50

Una molécula de ácido nucleico aislada comprende además una molécula de ARN, puente o reportera que es el producto de cualquiera de las variantes de los métodos de amplificación de ácido nucleico, que se usan para aumentar los números de copias de un polinucleótido de interés en una muestra de ácido nucleico. Tales métodos de amplificación se conocen bien en la técnica e incluyen, pero no se limitan a, la reacción en cadena de la polimerasa (PCR) (patentes de los Estados Unidos núm. 4,683,195; y núm. 4,683,202; PCR Technology: Principles and Applications for DNA Amplification, ed. HA Erlich, Freeman Press, NY, NY, 1992), reacción en cadena de la ligasa (LCR) (Wu y Wallace, Genomics 4: 560, 1989; Landegren y otros, Science 241: 1077, 1988), amplificación por desplazamiento de cadena (SDA) (patente de los Estados Unidos núm. 5,270,184; y núm. 5,422,252), amplificación mediada por transcripción (TMA) (patente de los Estados Unidos núm. 5,399,491), amplificación lineal enlazada (LLA) (patente de los Estados Unidos núm. 6,027,923), y similares, y métodos de amplificación isotérmica tales como amplificación basada en la secuencia de ácido nucleico (NASBA) y replicación de secuencia autosostenida (Guatelli y otros, Proc. Natl. Acad. Sci. USA 87: 1874, 1990). En base a tales metodologías, una persona experta en la técnica puede diseñar cebadores en cualquier región adecuada 5' y 3' a una molécula de ARN o gen que se describe en la presente

60

65

descripción. Además, los métodos de amplificación incluyen sintetizar *in silico* una molécula de ARN, puente, o etiqueta que se describe en la presente descripción.

5 Tal como se usa en la presente descripción, un "polinucleótido amplificado" es una molécula de ácido nucleico aislada en la que el número de moléculas se aumentó al menos dos veces mediante cualquier método de amplificación de ácido nucleico *in vitro* en comparación con su cantidad inicial en una muestra de prueba. En otras modalidades preferidas, un polinucleótido amplificado es el resultado de un aumento de al menos diez veces, cincuenta veces, cien veces, mil veces, o incluso diez mil veces en comparación con su cantidad inicial en una muestra de prueba. Generalmente, un polinucleótido amplificado tiene al menos aproximadamente 10 nucleótidos de longitud. Más típicamente, un polinucleótido amplificado tiene al menos aproximadamente 15 nucleótidos de longitud. En una modalidad preferida de la invención, un polinucleótido amplificado tiene al menos aproximadamente 20-25 nucleótidos de longitud. En una modalidad aún más preferida de la invención, un polinucleótido amplificado tiene al menos aproximadamente 20, 25, 30, 35, 40, 45, 50, o 100 nucleótidos, o cualquier valor intermedio, de longitud. En aún otra modalidad preferida de la invención, un polinucleótido amplificado tiene al menos aproximadamente 100, 200 o 300 nucleótidos, o cualquier valor intermedio de longitud. Mientras que la longitud total de un polinucleótido amplificado puede ser tan larga como un exón, un intrón, un 5' UTR, un 3' UTR o el gen completo en donde reside la molécula de ARN de interés, un producto amplificado típicamente no es mayor que aproximadamente 1,000 nucleótidos de longitud (aunque ciertos métodos de amplificación pueden generar productos amplificados de más de 1000 nucleótidos de longitud).

20 Se describen las moléculas de ácido nucleico que comprenden, consisten esencialmente en, o consisten en, por ejemplo, las secuencias de nucleótidos de sec. con núm. de ident.: 1-35. Las técnicas descritas en la presente descripción pueden usarse para proporcionar un número y variación ilimitados de moléculas de ácido nucleico para usar en el ensayo para permitir la detección. Una molécula de ácido nucleico comprende una secuencia de nucleótidos cuando la secuencia de nucleótidos es al menos parte de la secuencia de nucleótidos final de la molécula de ácido nucleico. De tal manera, la molécula de ácido nucleico puede ser solo la secuencia de nucleótidos o tener residuos de nucleótidos adicionales, tales como residuos que están asociados de forma natural con ella o secuencias de nucleótidos heterólogas. Dicha molécula de ácido nucleico puede tener de uno a unos pocos nucleótidos adicionales o puede comprender muchos más nucleótidos adicionales. Una molécula de ácido nucleico consiste esencialmente en una secuencia de nucleótidos cuando la molécula de ácido nucleico final contiene la secuencia de ácido nucleico y solo secuencias reguladoras o de mantenimiento. Las secuencias reguladoras y de mantenimiento son aquellas secuencias que permiten que la secuencia de nucleótidos se exprese y/o traduzca. Una molécula de ácido nucleico comprende una secuencia de nucleótidos cuando la secuencia de nucleótidos final de la molécula de ácido nucleico contiene solo esa secuencia de ácido nucleico. Más abajo se proporciona una breve descripción de cómo pueden prepararse y aislarse fácilmente varios tipos de estas moléculas de ácido nucleico, y dichas técnicas se conocen bien por los expertos en la técnica (Sambrook y Russell, 2000, Molecular Cloning: A Laboratory Manual, Cold Spring Harbor Press, NY).

Las moléculas aisladas de ácido nucleico pueden estar en forma de ARN, como ARNm o miRNA, o en forma de ADN, incluyendo ADNc y ADN genómico, que pueden obtenerse, por ejemplo, mediante clonación molecular o producirse mediante técnicas de síntesis química o por una combinación de estas (Sambrook y Russell, 2000, Molecular Cloning: A Laboratory Manual, Cold Spring Harbor Press, NY). Además, las moléculas de ácido nucleico aisladas también pueden estar parcial o completamente en forma de uno o más tipos de análogos de ácido nucleico, tales como ácido nucleico peptídico (ANP) (patentes de Estados Unidos núm. 5.539.082 ; 5,527,675 ; 5,623,049 ; 5,714,331). El ácido nucleico, especialmente el ADN, puede ser bicatenario o monocatenario. El ácido nucleico monocatenario puede ser la hebra codificante (hebra sentido) o la hebra complementaria no codificante (hebra antisentido). Los segmentos de ADN, ARN o ANP pueden unirse, por ejemplo, a partir de fragmentos del genoma humano o cualquier genoma incluyendo secuencias exógenas (en el caso del ADN o ARN) nucleótidos únicos, u oligonucleotídicos cortos de enlace, o de una serie de oligonucleótidos, para proporcionar una molécula de ácido nucleico sintética. Las moléculas de ácido nucleico pueden sintetizarse fácilmente mediante el uso de las secuencias que se proporcionan en la presente descripción como referencia; las técnicas de síntesis de oligonucleótidos y oligómeros de ANP se conocen bien en la técnica (véase, por ejemplo, Corey, "Peptide nucleic acids: expanding the scope of nucleic acid recognition", Trends Biotechnol. junio de 1997; 15(6):224-9, y Hyrup y otros, "Peptide nucleic acids (PNA): synthesis, properties and potential applications", Bioorg Med Chem. Enero de 1996; 4(1):5-23). Además, la síntesis automatizada a gran escala de oligonucleótidos/ANP (incluyendo la síntesis en una matriz o superficie de perlas u otro soporte sólido) puede realizarse fácilmente mediante el uso de sintetizadores de ácidos nucleicos disponibles comercialmente, tales como el Sintetizador de ADN 3900 de Alto Rendimiento de Applied Biosystems (Foster City, California) o el Sistema Expedito de Síntesis de Ácidos Nucleicos 8909, y la información de secuencia que se proporciona en la presente descripción.

60 Se describen análogos de ácido nucleico que contienen nucleótidos modificados, sintéticos, o de origen no natural, o elementos estructurales u otras alternativas/modificaciones químicas de ácido nucleico que se conocen en la técnica. Tales análogos de ácido nucleico son útiles, por ejemplo, como reactivos de detección (por ejemplo, cebadores/sondas). Además, también se describen estuches/sistemas (tales como perlas, matrices, etc.) que incluyen estos análogos. Por ejemplo, se contemplan específicamente oligómeros de APN que se basan en las secuencias polimórficas. Los oligómeros de APN son análogos de ADN en los que la cadena principal de fosfato se reemplaza por una cadena principal peptídica (Lagriffoul y otros, Bioorganic & Medicinal Chemistry Letters, 4: 1081-1082 (1994), Petersen y otros, Bioorganic & Medicinal Chemistry Letters, 6: 793-796 (1996), Kumar y otros, Organic Letters 3 (9): 1269-1272 (2001),

WO96/04000). El APN se hibrida con ARN o ADN complementario con mayor afinidad y especificidad que los oligonucleótidos convencionales y los análogos de oligonucleótidos. Las propiedades del APN permiten innovadoras aplicaciones de biología molecular y bioquímica inalcanzables con oligonucleótidos y péptidos tradicionales.

5 El término "molécula de ácido nucleico aislada" no se limita a moléculas que contienen solo ARN o ADN de origen natural, sino que también incluye nucleótidos y no nucleótidos modificados químicamente. En ciertas modalidades, las moléculas aisladas de ácido nucleico carecen de nucleótidos que contienen 2'-hidroxi (2'-OH). Ejemplos no limitantes de modificaciones químicas que se realizan en una molécula, puente o etiqueta de ARN incluyen, entre otros, enlaces internucleótidos de fosforotioato, 2'-deoxirribonucleótidos, 2'-O-metil ribonucleótidos, 2'-deoxi-2'-fluoro ribonucleótidos, nucleótidos de "base universal", nucleótidos "acíclicos", nucleótidos 5-C-metilo, y la incorporación de un glicerilo terminal y/o un desoxirresiduo abásico invertido. Estas modificaciones químicas, cuando se usan en moléculas de ARN, puentes o etiquetas, conservan la función y aumentan la estabilidad de estas moléculas.

15 Las moléculas de enlace de nucleótidos y no nucleótidos pueden incorporarse en moléculas de ARN, puentes y etiquetas. Una molécula de enlace no nucleotídica puede estar compuesta de un nucleótido abásico, un poliéter, una poliamina, una poliamida, un péptido, un carbohidrato, un lípido, un polihidrocarburo, u otros compuestos poliméricos (por ejemplo, polietilenglicoles tales como aquellos que tienen de 2 a 100 unidades de etilenglicol). Los ejemplos específicos incluyen aquellos que se describieron por Seela y Kaiser, *Nucleic Acids Res.* 18: 6353, 1990 y *Nucleic Acids Res.* 15: 3113, 1987; Cload y Schepartz, *J. Am. Chem. Soc.* 113:6324, 1991; Richardson y Schepartz, *J. Am. Chem. Soc.* 113:5109, 1991; Ma, y otros, *Nucleic Acids Res.* 21:2585, 1993 y *Biochemistry* 32:1751, 1993; Durand, y otros, *Nucleic Acids Res.* 18:6353, 1990; McCurdy, y otros, *Nucleosides & Nucleotides* 10:287, 1991; Jsckke, y otros, *Tetrahedron Lett.* 34:301, 1993; Ono, y otros, *Biochemistry* 30:9914 (1991); Arnold, y otros, publicación internacional núm. WO 89/02439; Usman, y otros, publicación internacional núm. WO 95/06731; Dudycz, y otros, publicación internacional núm. WO 95/11910 y Ferentz y Verdine, *J. Am. Chem. Soc.* 113:4000, 1991. Un "no nucleótido" significa además cualquier grupo o compuesto que puede incorporarse en una cadena de ácido nucleico en lugar de una o más unidades nucleotídicas, incluyendo ya sea sustituciones de azúcar y/o fosfato, y permite que las bases restantes exhiban su actividad enzimática. El grupo o compuesto puede ser abásico ya que no contiene una base nucleotídica comúnmente reconocida, tal como adenosina, guanina, citosina, uracilo o timidina, por ejemplo, en la posición C1 del azúcar.

30 Ejemplos adicionales de modificaciones de ácido nucleico que mejoran las propiedades de unión y/o estabilidad de un ácido nucleico incluyen el uso de análogos de bases tales como inosina, intercaladores (patente de Estados Unidos núm. 4.835.263) y unidores del surco menor (patente de los Estados Unidos núm. 5,801,115). Por lo tanto, las referencias en la presente descripción a moléculas de ácido nucleico incluyen oligómeros de APN y otros análogos de ácido nucleico. Otros ejemplos de análogos de ácidos nucleicos y alternativas/modificaciones químicas de ácido nucleico que se conocen en la técnica se describen en *Current Protocols in Nucleic Acid Chemistry*, John Wiley y Sons, N.Y. (2002). Los ácidos nucleicos aislados están compuestos de análogos de base que incluyen, pero no se limitan a, cualquiera de los análogos de base de ADN y ARN que se conocen tales como, pero no se limitan a, 4-acetilinosina, 8-hidroxi-N-6-metiladenosina, aziridinilcitosina, pseudoisitosina, 5-(carboxihidroxilmetil) uracilo, 5-bromouracilo, 5-carboximetilaminometil-2-tiouracilo, 5-carboximetilaminometiluracilo, dihidouracilo, inosina, N6-isopenteniladenina, 1-metiladenina, 1-metilpseudouracilo, 1-metilguanina, 1-metilinosina, 2,2-dimetilguanina, 2-metiladenina, 2-metilguanina, 3-metilcitosina, 5-metilcitosina, N6-metiladenina, 7-metilguanina, 5-metilaminometiluracilo, 5-metoxi-aminometil-2-tiouracilo, beta-Dmanosilqueosina, 5'-metoxycarbonilmetiluracilo, 5-metoxiuracilo, 2-metiltio-N6-isopenteniladenina, éster metílico del ácido uracilo-5-oxiacético, ácido uracilo-5-oxiacético, oxibutoxosina, pseudouracilo, queosina, 2-tiocitosina, 45 5-metil-2-tiouracilo, 2-tiouracilo, 4-tiouracilo, 5-metiluracilo, N-uracilo-5-oxiacético éster metílico de ácido, 2,6-diaminopurina y análogos modificados en el 2' tales como, pero no se limitan a, análogos modificados con 0-metilo, amino-y flúor.

50 En ciertas modalidades, las moléculas de ARN, puentes y etiquetas usadas en la invención se modifican para mejorar la estabilidad por modificación con grupos resistentes a nucleasas, por ejemplo, 2'-amino, 2'-C-alilo, 2'-flúor, 2'-O-metilo y 2'-H. (Para una revisión véase Usman y Cedergren, *TIBS* 17:34, 1992; Usman, y otros, *Nucleic Acids Symp. Ser.* 31: 163, 1994).

55 La síntesis química de moléculas de ácido nucleico con modificaciones (base, azúcar y/o fosfato) previene su degradación por ribonucleasas, lo que aumenta la eficacia de los ensayos que se describen en la presente descripción. Véase, por ejemplo, Eckstein, y otros, publicación internacional núm. WO 92/07065; Perrault, y otros, *Nature* 344: 565, 1990; Pieken, y otros, *Science* 253: 314, 1991; Usman y Cedergren, *Trends in Biochem. Sci.* 17: 334, 1992; Usman, et al, publicación Internacional núm. WO 93/15187; y Rossi, y otros, publicación internacional núm. WO 91/03162; Sproat, pat.de EE. UU. núm. 5,334,711; Gold, y otros, patente de Estados Unidos núm. 6,300,074. Todas las referencias anteriores describen diversas modificaciones químicas que se realizan en la base, fosfato y/o restos de azúcar de las moléculas de ácido nucleico aisladas que se describen en la presente descripción.

65 En una modalidad, la invención usa moléculas de ARN, puentes y etiquetas con modificaciones de la cadena principal de fosfato que comprenden una o más sustituciones por fosforotioatos, fosforoditioatos, metilfosfonato, fosfotriéster, morfolino, amidato carbamato, carboximetilo, acetamidato, poliamida, sulfonato, sulfonamida, sulfamato, sustituciones

de formacetal, tioformacetal y/o alquilsililo. Para una revisión de las modificaciones de la cadena principal del oligonucleótido, ver Hunziker y Leumann, "Nucleic Acid Analogues: Synthesis and Properties, en *Modern Synthetic Methods*, "VCH, 331-417, 1995, y Mesmaeker, y otros, "Novel Backbone Replacements for Oligonucleotides, in *Carbohydrate Modifications in Antisense Research*", ACS, 24-39, 1994.

5 Otras variantes de las moléculas de ácido nucleico que incluyen, pero no se limitan a las que se identifican con sec. con
 10 núm. de ident.: 1-35, tales como variantes alélicas de origen natural (así como ortólogos y parálogos) o variantes
 15 sintéticas que se producen mediante técnicas de mutagénesis, pueden identificarse y/o producirse mediante el uso de
 20 procedimientos que se conocen bien en la técnica. Tales variantes adicionales pueden comprender una secuencia de
 25 nucleótidos que comparte al menos 70-80 %, 80-85 %, 85-90 %, 91 %, 92 %, 93 %, 94 %, 95 %, 96 %, 97 %, 98 %, o 99
 30 % de identidad de secuencia con una secuencia de ácido nucleico descrita como sec. con núm. de ident.: 1-35 (o un
 35 fragmento de este). Por tanto, la presente invención contempla específicamente el uso de una molécula de ácido
 40 nucleico aislada que tiene un cierto grado de variación de secuencia en comparación con las secuencias de las SEC ID
 45 N°: 1-35.

Las moléculas de ARN, los puentes y las etiquetas se fabrican rutinariamente mediante técnicas tales como la síntesis
 en fase sólida. El equipo para tal síntesis se vende por varios proveedores, incluyendo, por ejemplo, Applied
 Biosystems, (Foster City, Calif.). Cualquier otro medio para tal síntesis que se conoce en la técnica se emplea adicional
 o alternativamente. Se conoce bien el uso de técnicas similares para preparar oligonucleótidos tales como los
 fosforotioatos y derivados alquilados.

Los oligonucleótidos se sintetizan mediante el uso de protocolos que se conocen en la técnica, por ejemplo, como se
 describe en Caruthers, y otros, *Methods in Enzymology* 211:3-19, 1992; Thompson, y otros, publicación internacional
 PCT núm. WO 99/54459; Wincott, y otros, *Nucleic Acids Res.* 23: 2677-2684, 1995; Wincott, y otros, *Methods Mol. Bio.*
 74:59, 1997; Brennan, y otros, *Biotechnol Bioeng.* 61:33-45, 1998; y Brennan, patente de Estados Unidos
 núm.6,001,311. La síntesis de moléculas de ARN sigue procedimientos generales como se describe, por ejemplo, en
 Usman, y otros, *J. Am. Chem. Soc.* 109: 7845, 1987; Scaringe, y otros, *Nucleic Acids Res.* 18: 5433, 1990; y Wincott, y
 otros, *Nucleic Acids Res.* 23: 2677-2684, 1995; Wincott, y otros, *Methods Mol. Bio.* 74:59, 1997.

La comparación de secuencias y la determinación del porcentaje de identidad entre dos secuencias pueden lograrse
 mediante el uso un algoritmo matemático. (Computational Molecular Biology, Lesk, A. M., ed., Oxford University Press,
 Nueva York, 1988; Biocomputing: Informatics and Genome Projects, Smith, D. W., ed., Academic Press, Nueva York,
 1993; Computer Analysis of Sequence Data, Part 1, Griffin, A. M., and Griffin, H. G., eds., Humana Press, Nueva Jersey,
 1994; Sequence Analysis in Molecular Biology, von Heinje, G., Academic Press, 1987; and Sequence Analysis Primer,
 35 Gribskov, M. y Devereux, J., eds., M Stockton Press, Nueva York, 1991). El porcentaje de identidad entre dos
 40 secuencias de aminoácidos se determina mediante el uso del algoritmo de Needlemand y Wunsch (*J. Mol. Biol.*
 (48):444-453 (1970)) el cual se incorporó en el programa GAP en el paquete de software GCG, mediante el uso de ya
 sea una matriz Blossom 62 o una matriz PAM250, y un peso del espacio de 16, 14, 12, 10, 8, 6, o 4 y un peso de la
 longitud de of 1, 2, 3, 4, 5, o 6.

El por ciento de identidad entre dos secuencias de nucleótidos se determina mediante el programa GAP en el paquete
 de software GCG (Devereux, J., y otros, *Nucleic Acids Res.* 12(1):387 (1984)), mediante el uso de una matriz
 NWSgapdna.CMP y un peso del espacio de 40, 50, 60, 70, u 80 y un peso de la longitud de 1, 2, 3, 4, 5 o 6). El
 porcentaje de identidad entre dos secuencias de aminoácidos o nucleótidos además puede determinarse mediante el
 uso del algoritmo de E. Meyers y W. Miller ((1989) CABIOS, 4:11-17) que se incorporó en el programa ALIGN (versión
 2.0), mediante el uso de una tabla de peso de residuos PAM120, una penalización de longitud de espacio de 12 y una
 penalización por espacio de 4.

Las secuencias de nucleótidos y aminoácidos pueden usarse además como una "secuencia de referencia" para realizar
 una búsqueda en bases de datos de secuencias para, por ejemplo, identificar otros miembros de la familia o secuencias
 relacionadas. Dichas búsquedas pueden realizarse utilizando los programas NBLAST y BLAST (versión 2.0) de Altschul,
 y otros (*J. Mol. Biol.* 215:403-10 (1990)). Las búsquedas de nucleótidos mediante BLAST pueden realizarse con el
 programa NBLAST, puntuación=100, longitud de palabra=12 para obtener secuencias de nucleótidos homólogas a las
 moléculas de ácido nucleico de la invención. Las búsquedas de proteína mediante BLAST pueden realizarse con el
 programa XBLAST, puntaje=50, longitud de palabra=3 para obtener secuencias de aminoácidos homólogas a las
 55 proteínas de la invención. Para obtener alineamientos separados para fines de comparación, puede utilizarse Gapped
 BLAST como se describe en Altschul y otros (*Nucleic Acids Res.* 25(17):3389-3402 (1997)). Cuando se utilizan los
 programas BLAST y gapped BLAST, pueden usarse los parámetros predeterminados de los programas respectivos (por
 ejemplo, BLAST y NBLAST). Además de BLAST, los ejemplos de otros programas de búsqueda y comparación de
 60 secuencias usados en la técnica incluyen, pero no se limitan a, FASTA (Pearson, *Methods Mol. Biol.* 25, 365-389
 (1994)) y KERR (Dufresne y otros, *Nat Biotechnol* diciembre de 2002; 20 (12): 1269-71). Para más información sobre las
 técnicas bioinformáticas, ver *Current Protocols in Bioinformatics*, John Wiley & Sons, Inc., N.Y.

Aplicaciones terapéuticas

Las composiciones y los métodos de la invención se usan para detectar la expresión génica en sujetos que están en riesgo de desarrollar una enfermedad o trastorno. Además, las composiciones y métodos de la invención se usan para detectar la expresión génica en sujetos a los que se les diagnosticó una enfermedad o trastorno, y que necesitan un diagnóstico o pronóstico. Las composiciones y métodos que se describen en la presente descripción se usan para monitorear la progresión de la enfermedad y la eficacia de la terapia a nivel de expresión y regulación génica. Además, las composiciones y métodos que se proporcionan en la presente descripción se usan para detectar individuos por su riesgo personal de desarrollar un trastorno así como también por su riesgo de transmitir un trastorno a futuros niños. Las células embrionarias se prueban mediante el uso de las composiciones y métodos de la invención para la presencia o ausencia de trastornos.

La invención puede usarse para determinar el riesgo de desarrollar una condición biológica particular, una enfermedad particular, como un cáncer, un trastorno genético, un trastorno del desarrollo, un trastorno degenerativo, un trastorno neurológico, un trastorno de células madre, u otra condición biológica. Además, la presente invención puede usarse para controlar la progresión de una enfermedad o monitorear las respuestas a la terapia. Específicamente, la invención puede usarse para detectar, monitorear la progresión, o monitorear regímenes terapéuticos de enfermedades del corazón, riñón, uréter, vejiga, uretra, hígado, próstata, corazón, vasos sanguíneos, médula ósea, músculo esquelético, músculo liso, varias regiones específicas del cerebro (incluyendo, pero no limitado a, la amígdala, el núcleo caudado, el cerebelo, el cuerpo caloso, fetal, el hipotálamo, el tálamo), médula espinal, nervios periféricos, retina, nariz, tráquea, pulmones, boca, glándula salival, esófago, estómago, intestino delgado, intestino grueso, hipotálamo, hipófisis, tiroides, páncreas, glándulas suprarrenales, ovarios, oviductos, útero, placenta, vagina, glándulas mamarias, testículos, vesículas seminales, pene, ganglios linfáticos, timo y bazo. La presente invención puede usarse para detectar, controlar la progresión, o controlar regímenes terapéuticos de una enfermedad particular, tal como un cáncer, un trastorno genético, un trastorno del desarrollo, un trastorno degenerativo, un trastorno neurológico, un trastorno de células madre, u otra condición biológica.

Los métodos de la invención abarcan una variedad de sujetos, incluyendo mamíferos. En ciertas modalidades, el mamífero es un humano, un primate no humano, un ratón, una rata, un perro, un gato, un caballo o una vaca, pero no se limita a estos ejemplos. Los mamíferos distintos de los humanos se usan ventajosamente como sujetos que representan modelos animales de un trastorno particular. El sujeto preferido es el humano. Los métodos de la invención también abarcan una variedad de sujetos, incluyendo no mamíferos. Estos incluyen a las aves, los reptiles, las plantas, las bacterias, los hongos, los protistas y los virus. Cualquier muestra que contenga moléculas de ARN pequeños de origen natural o sintéticos puede usarse como el sujeto del ensayo.

Cáncer

Las composiciones y los métodos de la invención se usan para identificar células y sujetos con riesgo de desarrollar cáncer o aquellas células y sujetos que pueden tener una predisposición para desarrollar cáncer. Además, las composiciones y métodos de la invención se usan para diferenciar células tipo cancerosas, el subtipo del cáncer, el grado tumoral o estadio del cáncer, con el propósito de diagnosticar o pronosticar a un sujeto en riesgo de desarrollar cáncer o a un sujeto que desarrolló cáncer. Las composiciones y métodos de la invención se usan además para monitorear la progresión de un tumor, cáncer o un régimen de tratamiento. Adicionalmente, las composiciones y métodos de la invención se usan para detectar individuos con cualquier predisposición genética para desarrollar cáncer.

El término "cáncer" incluye tumores sólidos, así como también tumores hematológicos y/o tumores malignos. Una "célula precancerosa" es una célula que manifiesta un trastorno proliferativo celular que es un precáncer o una condición precancerosa. Una "célula cancerosa" es una célula que manifiesta un trastorno proliferativo celular que es un cáncer. Cualquier medio reproducible de medición puede usarse para identificar células cancerosas o células precancerosas. Las células cancerosas o las células precancerosas pueden identificarse mediante tipificación histológica o clasificación de una muestra de tejido (por ejemplo, una muestra de biopsia). Las células cancerosas o las células precancerosas pueden identificarse mediante el uso de marcadores moleculares apropiados.

Las composiciones y métodos de la invención se usan para determinar adicionalmente la gravedad del cáncer, ya que se caracteriza por etapa, grado tumoral y expresión de factores que degradan la matriz extracelular, inducen la vascularización, inhiben la adhesión celular y permiten la metástasis.

Los cánceres ilustrativos incluyen, pero no se limitan a, carcinoma adrenocortical, cánceres relacionados con el SIDA, linfoma relacionado con el SIDA, cáncer anal, cáncer anorrectal, cáncer del canal anal, cáncer de apéndice, astrocitoma cerebeloso infantil, astrocitoma cerebral infantil, carcinoma de células basales, cáncer de piel (no melanoma), cáncer biliar, cáncer de las vías biliares extrahepáticas, cáncer de las vías biliares intrahepáticas, cáncer de vejiga, cáncer de vejiga urinaria, cáncer de huesos y articulaciones, osteosarcoma e histiocitoma fibroso maligno, cáncer de cerebro, tumor cerebral, glioma de tronco encefálico, astrocitoma cerebeloso, astrocitoma cerebral/glioma maligno, ependimoma, meduloblastoma, tumores neuroectodérmicos primitivos supratentoriales, glioma de la vía visual y glioma del hipotalámico, cáncer de mama, adenomas/carcinoides bronquiales, tumor carcinoide gastrointestinal, cáncer del sistema

nervioso, linfoma del sistema nervioso, cáncer del sistema nervioso central, linfoma del sistema nervioso central, cáncer cervical, cánceres infantiles, leucemia linfocítica crónica, leucemia mieloide crónica, trastornos mieloproliferativos crónicos, cáncer de colon, cáncer colorrectal, linfoma cutáneo de células T, neoplasia linfoide, micosis fungoide, síndrome de Sezary, cáncer de endometrio, cáncer de esófago, tumor de células germinales extracraneales, tumor de células germinales extragonadales, cáncer de vías biliares extrahepáticas, cáncer de ojo, melanoma intraocular, retinoblastoma, cáncer de vesícula biliar, cáncer gástrico (estómago), tumor carcinoide gastrointestinal, tumor del estroma gastrointestinal (GIST), tumor de células germinales, tumor de células germinales ováricas, glioma tumoral trofoblástico gestacional, cáncer de cabeza y cuello, cáncer hepatocelular (hígado), linfoma de Hodgkin, cáncer de hipofaringe, melanoma intraocular, cáncer ocular, tumores de células de los islotes (páncreas endocrino), sarcoma de Kaposi, cáncer de riñón, cáncer renal, cáncer de riñón, cáncer de laringe, leucemia linfoblástica aguda, leucemia mieloide aguda, leucemia linfocítica crónica, leucemia mieloide crónica, leucemia de células pilosas, cáncer de labio y cavidad oral, cáncer de hígado, cáncer de pulmón, cáncer de pulmón de células no pequeñas, cáncer de pulmón de células pequeñas, linfoma relacionado con el SIDA, linfoma no Hodgkin, linfoma primario del sistema nervioso central, macroglobulinemia de Waldenström, meduloblastoma, melanoma, melanoma intraocular (ojo), carcinoma de células de Merkel, mesotelioma maligno, mesotelioma, escamoso metastásico cáncer de cuello, cáncer de boca, cáncer de lengua, síndrome de neoplasia endocrina múltiple, micosis fungoide, síndromes mielodisplásicos, enfermedades mielodisplásicas/mieloproliferativas, leucemia mielógena crónica, leucemia mieloide aguda, mieloma múltiple, trastornos mieloproliferativos crónicos, cáncer nasofaríngeo, neuroblastoma, cáncer oral, cáncer de cavidad oral, cáncer orofaríngeo, cáncer de ovario, cáncer epitelial ovárico, tumor ovárico de bajo potencial maligno, cáncer de páncreas, cáncer de páncreas de células de los islotes, cáncer de la cavidad nasal y paranasal, cáncer de paratiroides, cáncer de pene, cáncer de faringe, feocromocitoma, pineoblastoma y primitivo supratentorial tumores neuroectodérmicos, tumor pituitario, neoplasia de células plasmáticas/mieloma múltiple, blastomameleuropulmonar, cáncer de próstata, cáncer de recto, pelvis renal y uréter, cáncer de células transicionales, retinoblastoma, rhabdomyosarcoma, cáncer de glándulas salivales, familia de sarcomas, sarcoma de Kaposi, sarcoma de tejidos blandos, uterino cáncer, sarcoma uterino, cáncer de piel (no melanoma), cáncer de piel (melanoma), carcinoma de piel de células de Merkel, cáncer de intestino delgado, sarcoma de tejidos blandos, carcinoma de células escamosas, cáncer de estómago (gástrico), tumores neuroectodérmicos primitivos supratentoriales, cáncer testicular, cáncer de garganta, timoma, timoma y carcinoma tímico, cáncer de tiroides, cáncer de células transicionales de la pelvis renal y uréter y otros órganos urinarios, tumor trofoblástico gestacional, cáncer de uretra, cáncer de endometrio uterino, sarcoma uterino, cáncer de cuerpo uterino, cáncer vaginal, cáncer vulvar y tumor de Wilm.

Trastornos degenerativos y del desarrollo

Las composiciones y los métodos de la invención se usan para identificar células y sujetos con riesgo de desarrollar un trastorno degenerativo o del desarrollo o aquellas células y sujetos que pueden tener una predisposición a desarrollar un trastorno degenerativo o del desarrollo. Además, las composiciones y métodos de la invención se usan para diferenciar trastornos del desarrollo, trastornos degenerativos, o trastornos del desarrollo de trastornos degenerativos con el propósito de diagnosticar o pronosticar un sujeto en riesgo de presentarlos o un sujeto que se diagnosticó con un trastorno del desarrollo o degenerativo. Las composiciones y métodos de la invención se usan además para monitorear la progresión de un trastorno del desarrollo, un trastorno degenerativo o un régimen de tratamiento. Adicionalmente, las composiciones y métodos de la invención se usan para detectar individuos con cualquier predisposición genética para presentar un trastorno degenerativo o del desarrollo en sí mismos, o para dar lugar a un niño con un trastorno degenerativo o del desarrollo.

El término "trastorno del desarrollo" incluye cualquier trastorno que inicialmente se presenta en un individuo durante la gestación o el desarrollo posnatal temprano. El desarrollo posnatal temprano abarca un período de tiempo desde el nacimiento hasta los 18 años. Aunque los trastornos del desarrollo a menudo se consideran sinónimos de discapacidades mentales que causan deficiencias mentales, emocionales o cognitivos, el término "trastorno del desarrollo" pretende abarcar cualquier trastorno que se presenta en un feto o un niño de 18 años o menos, independientemente de los signos o síntomas específicos asociados con el trastorno. Además, los trastornos del desarrollo típicamente se caracterizan por un desarrollo inadecuado o mal funcionamiento de procesos biológicos o psicológicos. Los trastornos del desarrollo también se caracterizan por rasgos del comportamiento, antecedentes familiares, morfología cerebral o biomarcadores genéticos que están presentes durante el desarrollo y predicen o indican el riesgo individual de desarrollar la enfermedad en la edad adulta (por ejemplo, enfermedad de Huntington, esclerosis lateral Amiotrófica o ALS y esquizofrenia).

Un trastorno del desarrollo específico afecta selectivamente a un área del desarrollo, respetando esencialmente todas las demás áreas del desarrollo. Los trastornos específicos del desarrollo afectan principalmente a la audición, la visión, el habla o el metabolismo. Sin embargo, un trastorno generalizado del desarrollo implica retrasos en el desarrollo de muchas habilidades básicas, sobre todo la capacidad de socializar con los demás, porque estas condiciones afectan la capacidad del niño para comunicarse y usar la imaginación. Los trastornos generalizados del desarrollo incluyen, entre otros, trastornos del espectro del autismo y el autismo, síndrome de Asperger, trastorno desintegrativo infantil, síndrome de Rett, trastorno por déficit de atención (ADD) y trastornos no especificados pero generalizados.

Los trastornos del desarrollo ilustrativos también incluyen, pero no se limitan a, trastornos del espectro autista (ASD), Síndrome de Angelman, trastorno del procesamiento auditivo central (CAPD), parálisis cerebral, síndrome de Down, trastorno del lenguaje expresivo, IsoDendrónico 15 (abreviado idic (15)), Síndrome de Lanau-Kleffner, defectos del tubo neural, fenilcetonuria (PKU), Síndrome de Prader-Willi, trastornos convulsivos, epilepsia, Síndrome de Tourette, 5 Síndrome de Williams, pérdida de audición, sordera, ceguera, deterioro de la visión, ictericia/quernicterus, trastorno (trastornos del habla), agnosias (visual, auditiva y somatosensorial), trastorno de anorexia nerviosa, trastorno de estrés agudo, trastorno de adaptación, trastorno bipolar, trastorno dismórfico corporal, trastornos del sueño relacionados con la respiración, asma, episodio psicótico breve, bulimia nerviosa, esquizofrenia, enfermedad de Huntington (HD), esclerosis múltiple (MS), esclerosis lateral amiotrófica (ALS), trastorno crónico del tic motor o vocal, trastorno del sueño del ritmo 10 circadiano, trastorno de la conducta, trastornos de la comunicación/lenguaje, Síndrome de Cornelia de Lange, insomnio familiar fatal (FFI), síndrome de Fahr (o calcificación idiopática de los ganglios basales), migraña, neoplasia (benigna y maligna), lupus eritematoso, trastornos autoinmunes, diabetes (tipo I), enfermedad de Wilson, parálisis de Bell, enfermedad cardíaca congénita, microcefalia, encefalitis neonatal, hidrocefalia, enfermedad de Parkinson, narcolepsia, distrofia muscular, Síndrome de Guillain-Barre, neurofibromatosis, enfermedad de Von Hippel-Lindau, dislexia, 15 hipercolesterolemia familiar, enfermedad renal poliquística, esferocitosis hereditaria, cáncer de mama y síndrome ovárico, Síndrome de Marfan, anemia de células falciformes, enfermedad de células falciformes, fibrosis quística, mucopolisacaridosis, enfermedades de almacenamiento de glucógeno, galactosemia, hemofilia, alopecia androgenética, neuropatía óptica hereditaria de Leber, enfermedad autoinmune, paladar hendido, obesidad, enfermedad de Gaucher, Síndrome de Rett, ataxia telangiectasia, Síndrome del QT largo, Síndrome de Alport, calvicie de patrón masculino, determinación del sexo SRY, acondroplasia, síndrome de Cockayne, síndrome de DiGeorge, síndrome del X frágil, inmunodeficiencia combinada grave, síndrome de Waardenburg, síndrome de Werner, síndrome de Zellweger, 20 adrenoleucodistrofia, malabsorción de glucosa galactosa, hemocromatosis hereditaria, Síndrome de Lesch-Nyhan, enfermedad urinaria de jarabe de arce, síndrome de Menkes, síndrome de Neimann-Pick, porfiria, enfermedad de Refsum, enfermedad de Tánger, enfermedad de Tay-Sachs, displasia diastrófica, síndrome de Ellis-van Creveld (displasia condroctodérmica), hemoglobinuria paroxística nocturna, talasemia, enfermedad de Crohn, enfermedad de Best, glaucoma, retinoblastoma, hiperplasia suprarrenal congénita, síndrome poliglandular autoinmune, neoplasia endocrina múltiple, fiebre mediterránea familiar, inmunodeficiencia con hiper IgM, Síndrome de Charcot-Marie-Tooth, fibrodisplasiaosificante progresiva, distrofia miotónica, temblor esencial, ataxia de Friedrich, atrofia muscular espinal, ataxia espinocerebelosa, esclerosis tuberosa, deficiencia de alfa-1-antitripsina y Síndrome de Pendred.

El término "trastorno degenerativo" incluye cualquier trastorno que inicialmente se presenta en un individuo adulto. El término adulto abarca un período de tiempo desde los 18 años hasta la muerte. Aunque los trastornos degenerativos a menudo se consideran sinónimos de discapacidades mentales que causan déficits mentales, emocionales o cognitivos, 30 el término "trastorno degenerativo" pretende abarcar cualquier trastorno que se presente en un adulto de 18 años o más, independientemente de los signos o síntomas específicos que se asocian con el trastorno. Además, los trastornos degenerativos se caracterizan típicamente por la desregulación o el mal funcionamiento de un proceso biológico o psicológico normalmente operativo. Los trastornos degenerativos pueden ser el resultado de la predisposición genética, factores ambientales o la exposición a patógenos como un virus o prión.

Los trastornos degenerativos ilustrativos incluyen, pero no se limitan a, la enfermedad de Alzheimer, demencia, senilidad, agnosias (visual, auditiva y somatosensorial), trastorno de estrés agudo, trastorno de adaptación, trastorno bipolar, trastorno dismórfico corporal, trastornos del sueño relacionados con la respiración (apnea del sueño), episodio psicótico breve, bulimia nerviosa, esquizofrenia, enfermedad de Huntington (HD), enfermedad de Parkinson, esclerosis múltiple (MS), esclerosis lateral amiotrófica (ALS), síndrome de Capgras (delirio), síndrome de fatiga crónica, trastorno 40 del sueño del ritmo circadiano, trastorno de la conducta, trastornos de comunicación/lenguaje, enfermedad de Creutzfeldt-Jakob (CJD), kuru, síndrome de Gerstmann-Sträussler-Scheinker (GSS), insomnio familiar fatal (FFI), trastorno ciclotímico, síndrome de inmunodeficiencia adquirida (AIDS), depresión, adicción, síndrome de Cushing (también llamado hiperadrenocorticismismo o hipercorticismismo), neoplasia (benigna y maligna), accidente cerebrovascular, diabetes (tipo II), aneurisma, enfermedad cardiovascular (incluyendo enfermedades del corazón), Enfermedad de Meniere, sordera, ceguera, atrofia multisistémica, enfermedad de Neiman Pick, arterosclerosis, parálisis supranuclear progresiva, cáncer, enfermedad de Tay-Sachs, queratocono, degeneración macular, enfermedad inflamatoria intestinal (IBD), prostatitis, calvicie de patrón masculino, obesidad, paroxística nocturna, hemoglobinuria, talasemia, enfermedad de Crohn, enfermedad de Best, glaucoma, atrofia girata de la coroides y la retina, síndrome de Charcot-Marie-Tooth, 50 fibrodisplasiaosificante progresiva, distrofia miotónica, osteoartritis, osteoporosis, artritis y artritis reumatoide.

Trastornos neurológicos

Las composiciones y los métodos de la invención se usan para identificar células y sujetos con riesgo de desarrollar un trastorno neurológico o aquellas células y sujetos que pueden tener una predisposición a desarrollar un trastorno 60 neurológico. Además, las composiciones y métodos de la invención se usan para diferenciar trastornos neurológicos con el fin de diagnosticar o pronosticar un sujeto con riesgo de presentar o un sujeto que se diagnosticó con un trastorno neurológico. Las composiciones y métodos de la invención se usan además para monitorear la progresión de un trastorno neurológico o un régimen de tratamiento. Adicionalmente, las composiciones y métodos de la invención se usan para detectar individuos con cualquier predisposición genética para presentar un trastorno neurológico en sí 65 mismos, o para dar lugar a un niño con un trastorno neurológico.

El término "trastorno neurológico" incluye cualquier trastorno que inicialmente se presenta en el sistema nervioso de un individuo. Los trastornos neurológicos se presentan con una variedad de signos y síntomas, que incluyen, entre otros, cambios psicológicos, emocionales o conductuales; pérdida o disminución de la precisión de uno o más sentidos (visión, audición, tacto); aumento de dolor o sensaciones de ardor; falta de coordinación o equilibrio; pérdida de memoria; pérdida de control sobre el movimiento voluntario o involuntario; habla o equilibrio; alucinaciones visuales o auditivas; convulsiones; dolores de cabeza; disminución de movimiento; y finalmente, coma o muerte. Los trastornos neurológicos pueden ser resultado de la predisposición genética para desarrollar el trastorno neurológico, uno o más factores ambientales que inducen un trastorno para aumentar la predisposición genética del individuo o la exposición de un individuo a agentes infecciosos como un virus, una bacteria, un hongo o un prión que induce el trastorno o aumenta la predisposición genética del individuo.

Los trastornos neurológicos ilustrativos incluyen, pero no se limitan a, trastornos del espectro autista (ASD), síndrome de Angelman, trastorno bipolar, trastorno por déficit de atención (ADD), trastorno del procesamiento auditivo central (CAPD), parálisis cerebral, síndrome de Down, trastorno del lenguaje expresivo, IsoDendrónico 15 (abreviado idic(15)), síndrome de Lanau-Kleffner, defectos del tubo neural, trastornos convulsivos, epilepsia, síndrome de Tourette, lesión cerebral traumática (TBI), trastorno desintegrativo infantil, agnosias (visual, auditiva y somatosensorial), trastorno de anorexia nerviosa, trastorno de estrés agudo, trastorno de adaptación, trastorno bipolar, trastorno dismórfico corporal, trastornos del sueño relacionados con la respiración, episodio psicótico breve, bulimia nerviosa, esquizofrenia, enfermedad de Huntington (HD), esclerosis múltiple (MS), esclerosis lateral amiotrófica (ALS) Síndrome de Capgras (delirio), trastorno crónico de tic motor o vocal, trastorno del sueño de ritmo circadiano, trastorno (trastornos del habla), trastorno de la conducta, trastornos de la comunicación/el lenguaje, enfermedad de Creutzfeldt-Jakob (CJD), kuru, síndrome de Gerstmann-Sträussler-Scheinker (GSS), insomnio familiar fatal (FFI), depresión, adicción, síndrome de Fahr (o calcificación de los ganglios basales idiopáticos), migraña, neoplasia (benigna y maligna), afasia, parálisis, parálisis de Bell, enfermedad cerebrovascular, encefalitis, hidrocefalia, microcefalia, enfermedad de Parkinson, neuralgia del trigémino, narcolepsia, distrofia muscular, síndrome de Guillain-Barre, neurofibromatosis, dislexia, síndrome de Rett, síndrome del X frágil, adrenoleucodistrofia, ataxia telangiectasia, síndrome de Cockayne, sordera, distrofia muscular de Duchenne, enfermedad de Gaucher, síndrome de Lesch-Nyhan, enfermedad de la orina de jarabe de arce, síndrome de Menkes, fenilcetonuria, síndrome de Prader-Willi, atrofia muscular espinal, ataxia espinocerebelosa, esclerosis tuberosa, síndrome de Neimann-Pick, enfermedad de Refsum, Tay-Enfermedad de Sachs, síndrome de Charcot-Marie-Tooth, fibrodisplasiaosificante progresiva, distrofia miotónica y enfermedad de Meniere.

Trastornos de células madre

Las composiciones y los métodos de la invención se usan para identificar células y sujetos con riesgo de desarrollar un trastorno de "células madre" o a aquellas células y sujetos que pueden tener una predisposición para desarrollar un trastorno de células madre. Además, las composiciones y métodos de la invención se usan para diferenciar trastornos de células madre con el fin de diagnosticar o pronosticar un sujeto con riesgo de presentar o un sujeto que se diagnosticó con un trastorno de células madre. Las composiciones y métodos de la invención se usan además para monitorear la progresión de un trastorno de células madre o un régimen de tratamiento. Adicionalmente, las composiciones y métodos de la invención se usan para detectar individuos con cualquier predisposición genética para presentar un trastorno de células madre en sí mismos, o para dar lugar a un niño con un trastorno de células madre.

El término "trastorno de células madre" incluye cualquier trastorno que inicialmente se presenta dentro de una célula madre totipotente (u omnipotente), pluripotente, multipotente, oligopotente o unipotente de un individuo. Alternativamente o de manera adicional, un trastorno de células madre incluye cualquier trastorno que puede tratarse o prevenirse administrando al individuo una composición que incluye una célula madre. Las células madre se caracterizan por su capacidad de producir células hijas, una de las cuales se diferenciará y la otra seguirá siendo una célula madre indiferenciada. La potencia de una célula madre se relaciona con el potencial de diferenciación de la célula hija que se compromete con un destino celular particular. Específicamente, los términos célula madre totipotente o célula madre omnipotente describen células madre que pueden dar lugar a células madre embrionarias o, alternativamente, la célula madre puede generar todos los tipos celulares en el cuerpo humano. Las células madre pluripotentes tienen un potencial más restringido que las células madre totipotentes, sin embargo, estas células madre pueden generar células derivadas de cualquiera de las tres capas germinales (ectodermo, mesodermo o endodermo). Las células madre multipotentes tienen un potencial más restringido que las células madre pluripotentes, sin embargo, estas células madre pueden generar células dentro de un linaje relacionado. Las células madre multipotentes a menudo se consideran células madre adultas porque se encuentran, por ejemplo, en el cerebro adulto (células madre neuronales que dan lugar a neuronas y todos los tipos de glía) y huesos (células madre de la médula ósea que dan lugar a todos los tipos de células de la sangre). Las células madre oligopotentes tienen un potencial más restringido que las células madre multipotentes, sin embargo, estas células madre pueden generar algunos tipos celulares relacionados. Por ejemplo, el epitelio corneal contiene células madre oligopotentes que producen solo células córneas y conjuntivas. Las células unipotentes son el tipo celular más restringido porque solo pueden reproducir su propio tipo celular, sin embargo, mantienen la capacidad de autorrenovarse. Las células madre musculares son ejemplos no limitantes de células madre unipotentes.

Los trastornos de células madre ilustrativos incluyen, pero no se limitan a, trastornos del espectro autista (ASD), defectos del tubo neural, trastornos convulsivos, epilepsia, pérdida auditiva, sordera, ceguera, deterioro de la visión, ictericia/quernicterus, trastorno (trastornos del habla), agnosias (visual, auditiva y somatosensorial), enfermedad de Huntington (HD), esclerosis múltiple (MS), esclerosis lateral amiotrófica (ALS), trastorno crónico del tic motor o vocal, trastorno del sueño de ritmo circadiano, enfermedad de Alzheimer, demencia, senilidad, diabetes, enfermedad de Parkinson, distrofia muscular, síndrome de Guillain-Barré, anemia de células falciformes o enfermedad de células falciformes, ataxia telangiectasia, síndrome de Cockayne, síndrome de DiGeorge, inmunodeficiencia combinada grave, porfiria, hemoglobinuria paroxística nocturna, talasemia, fiebre mediterránea familiar, inmunodeficiencia con hiper IgM, Síndrome de Charcot-Marie-Tooth, fibrodisplasia osificante progresiva, distrofia miotónica, atrofia muscular espinal, ataxia espinocerebelosa y enfermedad de Gaucher.

Estuches

Los estuches, como se define en la reivindicación 11, incluyen una composición que contiene al menos una etiqueta (como se muestra, por ejemplo, en la Tabla 2), al menos un puente (como se muestra, por ejemplo, en la Tabla 3) y una sustancia que es un excluidor de volumen o una nucleasa. Alternativamente, los estuches incluyen una composición que contiene una o más etiquetas (como se muestra, por ejemplo, en la Tabla 2), uno o más puentes (como se muestra, por ejemplo, en la Tabla 3) y una sustancia que es un excluidor de volumen o una nucleasa. Las etiquetas se proporcionan por separado de los puentes. Alternativamente, las etiquetas se proporcionan en una mezcla que contiene puentes porque el grado de hibridación cruzada entre moléculas reporteras y puente es despreciable. En ciertas modalidades, los estuches también incluyen una ligasa. En ciertas modalidades, los estuches pueden incluir al menos una etiqueta, al menos un puente y una ligasa. En estas modalidades, los estuches también pueden incluir un excluidor de volumen o una nucleasa.

Un ejemplo no limitante de una ligasa preferida es la T4 ADN ligasa, sin embargo, todas las ligasas se abarcan por la invención. Las ligasas a menudo se dividen en clases denominadas EC 6.1 (forman enlaces carbono-oxígeno), EC 6.2 (forman enlaces carbono-oxígeno), EC 6.3 (forman enlaces carbono-nitrógeno), EC 6.4 (forman enlaces carbono-carbono), EC 6.5 (forman enlaces de éster fosfórico), y EC 6.6 (forman enlaces nitrógeno-metal). Alternativamente o de manera adicional, las ligasas se clasifican por los tipos de moléculas que unen. La ARN ligasa y la ADN ligasa (tipos I-IV) se contemplan. Aunque la T4 ADN ligasa se muestra en la presente descripción, la presente invención abarca otras ligasas naturales, recombinantes, sintéticas o modificadas genéticamente.

Un ejemplo no limitante de un excluidor de volumen preferido es el polietilenglicol (PEG). Aunque PEG se muestra en la presente descripción, la invención abarca otras moléculas de poliéter, que incluyen, pero no se limitan a, poli (óxido de etileno) (PEO) y polioxietileno (POE), que varían según el tamaño del polímero de óxido de etileno. La invención abarca otros polímeros naturales, recombinantes, sintéticos o de ingeniería genética con tamaño, carga y solubilidad similares al PEG. Específicamente, el PEG es soluble en agua, metanol, benceno, diclorometano y es insoluble en dietil éter y hexano.

Un ejemplo no limitante de una nucleasa es una exonucleasa específica de ADN. Aunque en la presente descripción se muestra la exonucleasa lambda, la presente invención abarca otras exonucleasas naturales, recombinantes, sintéticas o modificadas genéticamente.

Los estuches contienen, opcionalmente, una molécula de ARN control. Las moléculas de ARN control son preferentemente moléculas de miRNA aisladas y purificadas a las que se hibridó específicamente un puente control, y a la que se liga una etiqueta específica. El puente control correspondiente y las moléculas reporteras se proporcionan y etiquetan en consecuencia.

Los estuches también incluyen instrucciones para manejar las composiciones que se incluyen y las sustancias y protocolos para realizar reacciones singulares o multiplexadas de desnaturalización, hibridación, ligación y/o purificación mediante el uso de las composiciones y sustancias que se incluyen. Además, las instrucciones proporcionan una guía para preparar la(s) molécula(s) de ARN marcadas resultantes, para la detección mediante el uso del Sistema de Análisis nCounter®.

Ejemplos

Ejemplo 1: Protocolo del estuche de detección de miRNA

El estuche de preparación de muestras de miRNA nCounter® proporciona reactivos para ligar etiquetas de oligonucleótidos únicas sobre miRNA, permitiendo que estos ARN cortos se detecten con gran especificidad y sensibilidad en el ensayo de expresión genética estándar nCounter®. La reacción de ligación de la etiqueta al miRNA puede realizarse en un fondo de ARN total.

La preparación de la muestra implicó una hibridación multiplexada de las etiquetas específicas a su miRNA objetivo, una reacción de ligación y una purificación enzimática para eliminar las etiquetas no ligadas. La especificidad de la

5 secuencia entre cada miRNA y su etiqueta apropiada se aseguró mediante un control cuidadoso y paso a paso de las temperaturas de hibridación y ligación. El ARN control que se incluye en el estuche de preparación de muestras de miRNA de humanos nCounter® permitió al usuario controlar la eficacia y la especificidad de la ligación en cada paso de la reacción. El tiempo total de preparación para la reacción de preparación de la muestra fue de aproximadamente 30 minutos, con un tiempo transcurrido de aproximadamente 3 horas.

10 El ensayo de expresión de miRNA nCounter® se ejecutó en el Sistema de Análisis nCounter®. El sistema consta de dos instrumentos, la Estación de Preparación que se usa para el procesamiento posterior a la hibridación y el Analizador Digital que se usa para la recogida de datos.

15 Después de la hibridación, las sondas en exceso se lavaron mediante el uso de una purificación en dos etapas con bolas magnéticas en la Estación de Preparación de nCounter®. Las perlas magnéticas derivatizadas con secuencias cortas de ácido nucleico que eran complementarias a la Sonda de Captura y las Sondas Reporteras se usaron secuencialmente. En primer lugar, se dejó que la mezcla de hibridación que contenía complejos objetivo/sonda se uniera a perlas magnéticas complementarias a las secuencias en la Sonda de Captura. Se llevaron a cabo las etapas de lavado para eliminar el exceso de Sondas Reporteras y los transcritos celulares no objetivo. Después del lavado, las sondas de captura y los complejos objetivo/sonda se eluyeron de las perlas y se hibridaron con perlas magnéticas complementarias a las secuencias en la Sonda Reportera. Se realizó un lavado adicional para eliminar el exceso de Sondas de Captura. Finalmente, los complejos de objetivo/sonda purificados se eluyeron de las perlas y se inmovilizaron en el cartucho para la recogida de datos.

20 La recogida de datos se llevó a cabo en el Analizador Digital nCounter®. Las imágenes digitales se procesaron y los conteos de códigos de barras se tabularon en un formato de valores separados por comas (CSV).

25 **Materiales**

Tabla 1.1 Materiales y reactivos requeridos para la preparación de muestras de miRNA y el Ensayo de Expresión de miRNA

Material	Fabricante	Número de Parte
Estuche de Ensayo de Expresión de miRNA de humano nCounter®	Tecnologías NanoString	GXA-MIR1-xx
Estuche Maestro nCounter®	Tecnologías NanoString	NAA-Aestuche-xxx
estuche QIAGEN miRNeasy®	QIAGEN (o estuche equivalente de purificación de ARN total)	
Guantes desechables	Varios	
Agua tratada con DEPC (o libre de ARNasa)		
100 ng de ARN total por muestra normalizado a 33 ng/μl		

45 **Termociclador**

50 El termociclador que se usa para el Protocolo de Preparación de Muestras de miRNA tenía una tapa caliente, como los modelos MJ Research/BioRad enumerados en la Tabla 1.2. También se espera que otros termocicladores con tapas calientes funcionen bien, y el estuche de ensayo incluye controles para verificar el funcionamiento adecuado. El termociclador debe calibrarse antes de usar este ensayo.

Tabla 1.2 Instrumentos Necesarios para la Preparación de Muestras de miRNA y el Ensayo de Expresión Génica de miRNA

Material	Fabricante	Número de parte
NanoDrop ND-1000 (o espectrofotómetro equivalente)	Tecnologías NanoDrop	N/A
Bioanalizador 2100	Agilent	G2940CA
Pipeta de 0.5 10 µL	Rainin (o equivalente)	L-10
Pipeta de 2.0-20 µL	Rainin (o equivalente)	L-20
Pipeta de 20 a 200 µL	Rainin (o equivalente)	L-200
Picofuga con adaptador de tubo de tira	Stratagene (o equivalente)	400540
Termociclador DNA Engine u horno de hibridación*	MJ Research/BioRad (o equivalente)	PTC-200G
		PTC-1148
		PTC-0220G
		PTC-0221G
		PTC-0240G
Estación de Preparación nCounter	Tecnologías NanoString	NCT-PREP-120
Analizador Digital nCounter	Tecnologías NanoString	NCT-DIGA-120
Unidad USB	Tecnologías NanoString	N/A
* El horno de hibridación solo puede usarse para el protocolo de hibridación de miRNA. Se requiere un termociclador con una tapa caliente para el protocolo de preparación de muestras de miRNA.		

El protocolo de preparación de miRNA nCounter® usó un cuidadoso control de temperatura de todas las etapas de reacción. Para este procedimiento, se utilizó un termociclador con tapa caliente. Antes de comenzar, los protocolos del termociclador se programaron de la siguiente manera:

Tabla 1.3 Protocolo de hibridación

Temperatura	Tiempo
94 °C	1 min
65°C	2 min
45 °C	10 min
48 °C	mantener
Tiempo total	13 min

Tabla 1.4 Protocolo de ligación

Temperatura	Tiempo
48 °C	3 min
47 °C	3 min
46 °C	3 min
45 °C	5 min
65 °C	10 min
4°C	mantener
Tiempo total	24 min

Tabla 1.5 Protocolo de purificación

Temperatura	Tiempo
37 °C	2 horas
70 °C	10 min
4°C	mantener
Tiempo total	2 horas 10 min

Protocolo de preparación de muestras de miRNA

Todos los experimentos se diseñaron en conjuntos de doce ensayos. El siguiente protocolo es para un conjunto de 12 ensayos. Todos los reactivos se suministran en 12 alícuotas de reacción.

1. Las muestras de ARN se normalizaron a 33 ng/μL mediante el uso de agua tratada con DEPC (o libre de ARNasa).
2. Se preparó una dilución 1:500 de los miRNA Controles del Ensayo. Se añadieron 499 μl de H₂O tratada con DEPC a 1 μL de los miRNA Controles del Ensayo en un tubo de microcentrífuga estéril. El tubo se mezcló en vórtex, se centrifugó brevemente y se almacenó en hielo.
3. Se preparó una mezcla maestra de hibridación combinando 13 μL de Tampón de Hibridación, 26 μL de Reactivo Etiqueta de miRNA nCounter® y 6,5 μL de la dilución 1:500 de miRNA Controles del Ensayo preparada en la Etapa 2. Esto se mezcló bien pipeteando hacia arriba y abajo.
4. Se tomaron alícuotas de 3,5 μL de la mezcla maestra de hibridación en cada tubo.
5. Se añadieron 3 μL (100 ng) de la muestra de ARN a cada tubo. Los tubos se taparon, se movieron suavemente para mezclar y se centrifugaron brevemente.
6. La tira se colocó en el termociclador y se inició el Protocolo de Hibridación.
7. Se combinaron 19.5 μL de PEG con 13 μL de Tampón de Ligación para preparar una mezcla maestra de ligación.
8. Después de finalizar el Protocolo de Hibridación, cuando el termociclador alcanzó 48 °C, se añadieron 2.5 μL de la mezcla maestra de ligación a cada tubo. (El termociclador se dejó encendido para que se mantuviera a 48 °C para la Etapa 9 y la Etapa 10). Los tubos se movieron suavemente para mezclar y se centrifugaron brevemente.
9. Los tubos se colocaron nuevamente en el termociclador a 48 °C, la tapa se cerró y los tubos se incubaron a 48 °C durante 5 min.
10. El termociclador se abrió, las tapas se quitaron cuidadosamente de los tubos, dejando los tubos en su lugar en el bloque de calor, y se añadieron 1.0 μL de ligasa directamente a cada tubo mientras se incubaron a 48 °C. La punta de la pipeta se verificó para asegurarse de que toda la ligasa se añadiera a la reacción. No hubo necesidad de mezclar.

NOTA: El PEG es viscoso por lo que se pipeteó lentamente para asegurar una transferencia precisa del volumen a la mezcla. Se mezcló bien pipeteando hacia arriba y abajo.

NOTA: Para La Etapa 10, los tubos no se removieron del termociclador, manteniendo la temperatura de los tubos a 48 °C.

11. Inmediatamente después de la adición de la ligasa al tubo final, los tubos se volvieron a tapar y se dejaron en el bloque térmico. El termociclador se cerró y se inició el Protocolo de Ligación.
12. Después de completar el Protocolo de Ligación, se añadió 1 μL de Enzima de Limpieza de ligación a cada reacción. Los tubos se eliminaron del bloque térmico para esta etapa. Los tubos se movieron suavemente para mezclar y se centrifugaron brevemente.
13. Los tubos se devolvieron al termociclador y se inició el Protocolo de Purificación.
14. Después de completar el Protocolo de Purificación, se añadieron 40 μl de H₂O tratada con DEPC (o libre de ARNasa) a cada muestra. Esto se mezcló bien y se centrifugó brevemente. (Si fue necesario, en esta etapa, las reacciones de preparación de muestras purificadas se almacenaron a -20 °C durante varias semanas). Las muestras se desnaturalizaron (Etapa 5 del Protocolo de Hibridación de miRNA) antes de proceder al protocolo de hibridación.)

Protocolo de hibridación

La reacción final de hibridación contenía los siguientes componentes: 10 μL del reactivo Reporter CodeSet, 10 μL de tampón de hibridación, una alícuota de 5 μL del Protocolo de Preparación de Muestras de miRNA y 5 μL del reactivo Capture ProbeSet.

1. Las alícuotas de ambos reactivos Reporter CodeSet y Capture ProbeSet se retiraron del congelador y se descongelaron en hielo. Las alícuotas se invirtieron varias veces para mezclar bien. El reactivo se centrifugó brevemente a <1000 rpm.
2. Se creó una mezcla maestra que contiene 130 μL del Reporter CodeSet y 130 μL de tampón de hibridación añadiendo el tampón de hibridación al tubo que contiene el reactivo Reporter CodeSet. La mezcla maestra se invirtió para mezclar y se centrifugó brevemente.

3. Los tubos se etiquetaron.
4. Se agregaron 20 µL de mezcla maestra a cada uno de los 12 tubos.
5. Las muestras se desnaturalizaron a partir del protocolo de preparación de muestra de miRNA a 85 °C durante 5 minutos y se enfriaron rápidamente en hielo. Se añadió una alícuota de 5 µl a partir del Protocolo de Preparación de Muestras de miRNA a cada tubo. Durante la configuración del ensayo, la mezcla se realizó moviendo o invirtiendo los tubos.
6. El termociclador se precalentó a 65 °C y luego se programó usando 30 µl de volumen, temperatura calculada, tapa caliente y ajuste de tiempo "para siempre".
7. Se agregaron 5 µL del reactivo Capture ProbeSet a cada tubo inmediatamente antes de colocarlos a 65 °C. Los tubos se taparon y los reactivos se mezclaron invirtiendo los tubos de la tira varias veces y sacudiendo para asegurar una mezcla completa. Los tubos se centrifugaron brevemente a <1000 rpm e inmediatamente los tubos se colocaron en el termociclador a 65 °C.
8. Los ensayos de hibridación se incubaron durante al menos 12 horas. Las hibridaciones se dejaron a 65 °C hasta que estuvieron listas para el procesamiento. El tiempo máximo de hibridación no excedió las 30 horas.
9. Una vez retirado del termociclador, se procedió de inmediato al procesamiento poshibridación con la Estación de Preparación nCounter®.

Ejemplo 2: Los estuches multiplexados del ensayo de expresión de miRNA nCounter® distinguen especies individuales de miRNA con alta especificidad.

Se realizó un conjunto multiplexado de ensayos para 55 miRNA diferentes en miRNA objetivo sintéticos individuales presentes en 3 pM en la ligación, y 300 fM en la reacción final de hibridación (Tabla 5). Se muestran datos representativos para 10 blancos y los 10 ensayos correspondientes (un subconjunto de los 55 ensayos multiplexados). Los datos están en conteos por 600 campos de visión. Cada ensayo dentro del conjunto multiplexado muestra una fuerte especificidad para detectar el miRNA objetivo para el cual se diseñó.

Tabla 5: Datos para el Ejemplo 2

miRNA objetivo	miR-15a	miR-15b	miR-25	miR-92a	miR-92b	miR-122	miR-133a	miR-143	miR-195	miR-206
Ensayo miRNA										
miR-15a	16143	1	2	1	1	1	2	2	2	3
miR-15b	1	14659	2	0	1	3	2	3	3	5
miR-25	0	0	8066	1	0	1	1	2	3	41
miR-92a	1	2	4	15558	2	2	2	2	3	3
miR-92b	0	6	0	20	20145	0	1	1	0	2
miR-122	0	2	1	13	10	12324	2	1	1	1
miR-133a	0	0	1	2	4	12	16217	2	3	1
miR-143	0	0	1	1	9	3	5	13519	3	2
miR-195	0	0	2	0	1	1	2	1	20814	2
miR-206	0	0	1	1	1	3	2	2	25	20754

Ejemplo 3: Los estuches de ensayos nCounter® multiplexados revelaron niveles de expresión de miRNA en diferentes tipos de tejidos.

Los miRNA pueden expresarse a niveles similares en una gama de tejidos, pero muchos también exhiben expresión diferencial en diferentes tipos de tejidos. En estos experimentos, los Ensayos multiplexados de Expresión de miRNA nCounter® para 619 miRNA de humano se realizaron con ARN total purificado de diversos tejidos de humano (Ambion), incluyendo pulmón, músculo esquelético, colon y corazón, y los datos se compararon en conjuntos de pares. Cientos de microARN se detectaron específicamente en cada muestra. En las Figuras 5A-D, los puntos de datos que caen en la diagonal son aquellos miRNA que se expresaron a niveles similares en ambos tejidos. Aquellos que quedan fuera de la diagonal representan miRNA que se regularon diferencialmente en los dos tipos de tejidos. Estos resultados muestran la capacidad del estuche de Ensayo de Expresión de miRNA nCounter® en un contexto altamente multiplexado para medir la expresión diferencial de cientos de ARN pequeños.

Las Figuras 6A-B, tomadas de los mismos conjuntos de datos, resaltan la expresión diferencial de varios miRNA específicos en los cuatro tipos de tejidos. En la Figura 6A, puede verse que los diferentes niveles de expresión de seis miRNA de humano, miR-133a,-143,-16,-21,-29a y-30b varían de aproximadamente 0 a 25,000 conteos, mientras que la Figura 6B muestra la expresión específica de músculo de miR-1 humano, que esencialmente no se detecta en el tejido de pulmón y colon, pero da más de 200,000 conteos en el músculo esquelético y 75,000 conteos en el tejido de corazón. Estos datos demuestran la capacidad del estuche de Ensayo de Expresión de miRNA nCounter® en un contexto altamente multiplexado para medir las diferencias en la expresión específica de un miRNA dado en un amplio rango de niveles de expresión.

Ejemplo 4: El estuche de ensayo de expresión de miRNA nCounter® identifica ARN en muestras clínicas

La capacidad de detectar ARN en una variedad de tipos de muestras es una característica importante en los ensayos de expresión génica. De particular interés en el campo de los ARN pequeños es la capacidad de medir sus niveles de expresión en muestras clínicas, donde pueden proporcionar información pronóstica, diagnóstica o terapéutica. Las muestras de tejido clínico se conservan frecuentemente como muestras fijadas en formalina e incluidas en parafina (FFPE), lo que conduce a modificaciones de la estructura del ARN objetivo. No todos los ensayos de expresión génica son compatibles con ARN aislado de muestras FFPE. Se aisló ARN total a partir de muestras FFPE mediante el uso de un estuche miREasy FFPE (Qiagen, Gaithersburg, MD) siguiendo las instrucciones del fabricante, y los datos obtenidos en el estuche de Ensayo de Expresión de miRNA nCounter® con estas muestras se compararon con los datos obtenidos con el ARN total aislado del mismo tejido almacenado como una muestra congelada. Los resultados de estos experimentos demuestran que el estuche de Ensayo de Expresión de miRNA nCounter® es capaz de detectar ARN pequeños en muestras FFPE con la misma especificidad y sensibilidad que en el ARN total. Un conjunto de datos representativos que se muestra en la Figura 7 demuestra una correlación extremadamente alta entre los datos de los dos tipos de muestra, con un valor de R^2 mayor que 0,99.

Ejemplo 5: El estuche de ensayo de expresión de miRNA nCounter® proporciona un formato multiplexado

Los estuches de Ensayo de Expresión de miRNA nCounter® generan datos reproducibles en un formato multiplexado. La Figura 8 muestra la correlación de los datos de dos réplicas técnicas en las que se realizaron ensayos multiplexados para 676 miRNA de humano en 100 ng de ARN total de Referencia de Cerebro Humano (Stratagene, LaJolla, CA). Los datos de las dos réplicas experimentales demuestran una correlación extremadamente alta, con un valor de R^2 mayor que 0.999.

Ejemplo 6: El estuche de ensayo de expresión de miRNA nCounter® permite elaborar perfiles de variantes de las secuencias 3' de miRNA.

Para estudiar las variantes de las secuencias 3' de miRNA, pueden crearse puentes para el Ensayo de Expresión de miRNA nCounter® que dirijan el marcaje de los miRNA variantes. Aquí se midieron las dos variantes 3' más comunes (designadas arbitrariamente variante 1 y variante 2) para cada miRNA de interés. Cada muestra se dividió en tres y se analizaron por separado con una mezcla de puentes canónicos, la mezcla de puentes variantes 1 y la mezcla de puentes variantes 2. En este experimento, los puentes dirigieron las variantes a la misma etiqueta que la secuencia canónica, y por lo tanto tuvieron que detectarse en ensayos separados. También es posible diseñar puentes que dirijan cada variante a una etiqueta única, lo que permite la detección de todas las variantes en el mismo ensayo. La especificidad de la plataforma se demostró analizando mezclas de cinco miRNA sintéticos canónicos, variante 1 o variante 2, con cada una de las tres mezclas de puentes. Se encontró que cada mezcla de puentes distinguía de manera confiable las especies de miRNA de interés (Figura 9A), con una mínima detección de fondo de las otras variantes. También se analizaron mezclas de miRNA sintéticos que contenían un 60% de miRNA canónico, un 30% de variante 1 y un 10% de variante 2 y se encontró que, en general, se podía distinguir la proporción correcta de miRNA canónico a variante (figura 9B). Estos resultados demuestran que el Ensayo de Expresión de miRNA nCounter® proporciona una plataforma sólida para investigar la expresión de variantes de secuencia 3' de miRNA.

Otras modalidades

Se entiende que aunque la invención se describió junto con la descripción detallada de esta, la descripción anterior pretende ilustrar y no limitar el alcance de la invención, la cual se define por el alcance de las reivindicaciones anexas.

Mientras la presente invención se muestra particularmente y se describe con referencia a las modalidades preferidas de esta, se entenderá por los expertos en la técnica que pueden hacerse varios cambios en la forma y los detalles sin apartarse del alcance de la invención como se define por las reivindicaciones anexas.

Reivindicaciones

1. Una composición que comprende al menos dos complejos, cada complejo comprende:
 - (a) una molécula etiqueta, en donde la molécula etiqueta comprende una primera secuencia de ADN y una pluralidad de regiones de unión reporteras y en donde la primera secuencia de ADN comprende una secuencia de ADN que tiene una identidad no mayor al 85% a lo largo de 35-50 bases, con una homología máxima continua de 15 bases o menor, con cualquier secuencia conocida de ADN genómico o ARN que se transcribe a partir de un genoma;
 - (b) moléculas reporteras, cada una unida a una de la pluralidad de regiones de unión reporteras de una molécula etiqueta, en donde las moléculas reporteras juntas producen un código que comprende una serie ordenada de manchas fluorescentes coloreadas que identifican una molécula de ARN objetivo; y
 - (c) una molécula puente, en donde la molécula puente comprende una segunda secuencia de ADN que es complementaria a la molécula de ARN objetivo y una tercera secuencia de ADN que es complementaria a la primera secuencia de ADN de la molécula etiqueta;

en donde un primer complejo identifica una primera molécula de ARN objetivo y comprende una molécula puente que es complementaria a la primera molécula de ARN objetivo;

en donde al menos un segundo complejo identifica al menos una segunda molécula de ARN objetivo y comprende una molécula puente que es complementaria a la al menos segunda molécula de ARN objetivo; y en donde la primera y la al menos segunda molécula de ARN objetivo son diferentes.
2. La composición de la reivindicación 1, en donde la segunda secuencia de ADN y la tercera secuencia de ADN de cada molécula puente son contiguas.
3. La composición de la reivindicación 1, en donde la primera molécula de ARN objetivo o la al menos segunda molécula de ARN objetivo comprenden un ARN no codificante.
4. La composición de la reivindicación 3, donde el ARN no codificante es un ARN de transferencia (tRNA), un ARN pequeño nucleolar (snoRNA), un microARN (miRNA), un ARN pequeño interferente (siRNA), un ARN pequeño en horquilla (shRNA), un ARN pequeño interferente asociado a repeticiones (rasiRNA) o un ARN asociado a piwi (piRNA), preferentemente en donde el ARN no codificante es un miRNA.
5. La composición de la reivindicación 1, en donde la segunda secuencia de ADN de cada molécula puente y la molécula de ARN objetivo de cada complejo forman un heterodúplex de ADN/ARN que tiene una temperatura de fusión de entre 37-95 °C; o en donde la segunda secuencia de ADN de cada molécula puente y la molécula de ARN objetivo de cada complejo forman un heterodúplex de ADN/ARN que tiene una temperatura de fusión de entre 44-53 °C.
6. La composición de la reivindicación 1, en donde la tercera secuencia de ADN de cada molécula puente y la primera secuencia de ADN de cada molécula etiqueta forman un dúplex de ADN/ADN que tiene una temperatura de fusión de entre 37-95 °C; o en donde la tercera secuencia de ADN de cada molécula puente y la primera secuencia de ADN de cada molécula etiqueta forman un dúplex de ADN/ADN que tiene una temperatura de fusión de entre 44-53 °C.
7. La composición de la reivindicación 1, en donde la segunda secuencia de ADN y la tercera secuencia de ADN de cada molécula puente forman dúplex de ácido nucleico que tienen sustancialmente la misma temperatura de fusión.
8. La composición de la reivindicación 1, en donde la tercera secuencia de ADN de cada molécula puente comprende una secuencia de ADN que tiene una identidad no mayor al 85% a lo largo de 35-50 bases, con una homología máxima continua de 15 bases o menos con cualquier ADN genómico conocido.
9. La composición de la reivindicación 1, en donde la molécula de ARN objetivo y/o la molécula etiqueta de cada complejo contiene una secuencia que se hibrida específicamente con la molécula puente del complejo, con complementariedad completa.
10. La composición de la reivindicación 1, en donde la molécula de ARN objetivo y/o la molécula etiqueta de cada complejo contiene una secuencia que se hibrida específicamente con la molécula puente del complejo con complementariedad parcial.
11. Un estuche que comprende:
 - (a) una composición que comprende al menos dos complejos, cada complejo comprende:
 - (1) una molécula etiqueta, en donde la molécula etiqueta comprende una primera secuencia de ADN y una pluralidad de regiones de unión reporteras y en donde la primera secuencia de ADN comprende una secuencia de ADN que tiene una identidad no mayor al 85% a lo largo de 35-50 bases, con una

homología máxima continua de 15 bases o menos, con cualquier secuencia conocida de ADN genómico o ARN que se transcribe a partir de un genoma;

(2) moléculas reporteras, cada una unida a una de la pluralidad de regiones de unión reporteras de una molécula etiqueta, en donde las moléculas reporteras juntas producen un código que comprende una serie ordenada de manchas fluorescentes coloreadas que identifican una molécula de ARN objetivo; y

(3) una molécula puente, en donde la molécula puente comprende una segunda secuencia de ADN que es complementaria a la molécula de ARN objetivo y una tercera secuencia de ADN que es complementaria a la primera secuencia de ADN de la molécula etiqueta;

en donde un primer complejo identifica una primera molécula de ARN objetivo y comprende una molécula puente que es complementaria a la primera molécula de ARN objetivo;

en donde al menos un segundo complejo identifica al menos una segunda molécula de ARN objetivo y comprende una molécula puente que es complementaria a al menos la segunda molécula de ARN objetivo; y en donde la primera y al menos la segunda molécula de ARN objetivo son diferentes; y

(b) una sustancia que se selecciona del grupo que consiste en un excluidor de volumen y una nucleasa.

12. Un método para la detección de una molécula de ARN objetivo que comprende:

(a) proporcionar una muestra que contiene al menos una molécula de ARN objetivo;

(b) proporcionar una molécula etiqueta, en donde la molécula etiqueta comprende una primera secuencia de ADN y una pluralidad de regiones de unión reporteras y en donde la primera secuencia de ADN comprende una secuencia de ADN que tiene una identidad no mayor al 85% en 35-50 bases, con una homología máxima continua de 15 bases o menos, con cualquier secuencia conocida de ADN genómico o ARN que se transcribe a partir de un genoma;

(c) proporcionar una molécula puente, en donde la molécula puente comprende una segunda secuencia de ADN que es complementaria a la molécula de ARN objetivo y una tercera secuencia de ADN que es complementaria a la primera secuencia de ADN de la molécula etiqueta;

(d) proporcionar un tampón;

(e) hibridar específicamente la molécula de ARN objetivo, la molécula puente y la molécula etiqueta entre 37-95 °C;

(f) mantener la reacción de hibridación entre 37-95 °C;

(g) proporcionar un tampón para la ligasa;

(h) proporcionar una ligasa directamente a la reacción de hibridación entre 37-95 °C;

(i) ligar la molécula de ARN objetivo a la primera secuencia de ADN de la molécula etiqueta a una o más temperaturas entre 37-95 °C;

(j) proporcionar moléculas reporteras, en donde cada molécula reportera es capaz de hibridarse con una de la pluralidad de regiones de unión reporteras de la molécula etiqueta, donde las moléculas reporteras juntas producen un código que comprende una serie ordenada de manchas fluorescentes coloreadas que identifica una molécula de ARN objetivo;

(k) hibridar la molécula reportera con la molécula etiqueta ligada al ARN de la etapa (i); y

(l) detectar la serie ordenada de las manchas fluorescentes de colores.

13. Un método de detección múltiple de una pluralidad de moléculas de ARN objetivo que comprende:

(a) proporcionar una muestra que contiene una pluralidad de moléculas de ARN objetivo;

(b) proporcionar una pluralidad de moléculas etiquetas, donde cada molécula etiqueta comprende una primera secuencia de ADN y una pluralidad de regiones de unión reporteras y en donde cada primera secuencia de ADN comprende una secuencia de ADN que tiene una identidad no mayor al 85% a lo largo de 35-50 bases con una homología máxima continua de 15 bases o menos con cualquier secuencia conocida de ADN genómico o ARN transcrito a partir de un genoma;

(c) proporcionar una pluralidad de moléculas puente, donde cada molécula puente comprende una segunda secuencia de ADN que es complementaria a una molécula de ARN objetivo y una tercera secuencia de ADN que es complementaria a la primera secuencia de ADN de una molécula etiqueta, en donde cada puente hibrida específicamente a una especie de molécula de ARN objetivo y una especie de molécula etiqueta;

(d) proporcionar un tampón;

(e) hibridar específicamente las moléculas de ARN objetivo, las moléculas puente y las moléculas etiqueta entre 37-95 °C;

(f) mantener la reacción de hibridación entre 37-95 °C;

(g) proporcionar un tampón para la ligasa;

(h) proporcionar una ligasa directamente a la reacción de hibridación entre 37-95 °C;

(i) ligar las moléculas de ARN objetivo a las primeras secuencias de ADN de las moléculas etiqueta a una o más temperaturas entre 37-95 °C;

(j) proporcionar una pluralidad de moléculas reporteras, en donde cada molécula reportera es capaz de hibridar con una de la pluralidad de regiones de unión reporteras de las moléculas etiqueta, en donde la pluralidad de moléculas reporteras unidas a una molécula etiqueta juntas producen un código único que comprende una serie ordenada de manchas fluorescentes coloreadas que identifican una molécula de ARN objetivo;

- (k) hibridar la pluralidad de moléculas reporteras con las moléculas etiqueta ligadas a ARN de la etapa (i); y
- (l) detectar uno o más códigos únicos.

- 5
14. El método de la reivindicación 12 o 13, que comprende además purificar las moléculas etiqueta ligadas al ARN de la etapa (i) antes de la etapa (j).
- 10
15. El método de conformidad con cualquiera de las reivindicaciones 12-14, que comprende además proporcionar una molécula de captura biotinilada, en donde dicha molécula de captura se hibrida con las moléculas etiqueta ligadas a ARN de la etapa (i).
- 15
16. El método de conformidad con cualquiera de las reivindicaciones 12-15, en donde la molécula de ARN o la pluralidad de moléculas de ARN comprende un ARN no codificante, y opcionalmente, en donde el ARN no codificante es un ARN de transferencia (tRNA), un ARN pequeño nucleolar (snoRNA), un microARN (miRNA), un ARN pequeño interferente (siRNA), un ARN pequeño en horquilla (shRNA), un ARN pequeño interferente asociado a repeticiones (rasiRNA) o un ARN asociado a piwi (piRNA), preferentemente en donde el ARN no codificante es un miRNA.

FIGURA 1

**Distribución de Tm
de miRNA de humano**

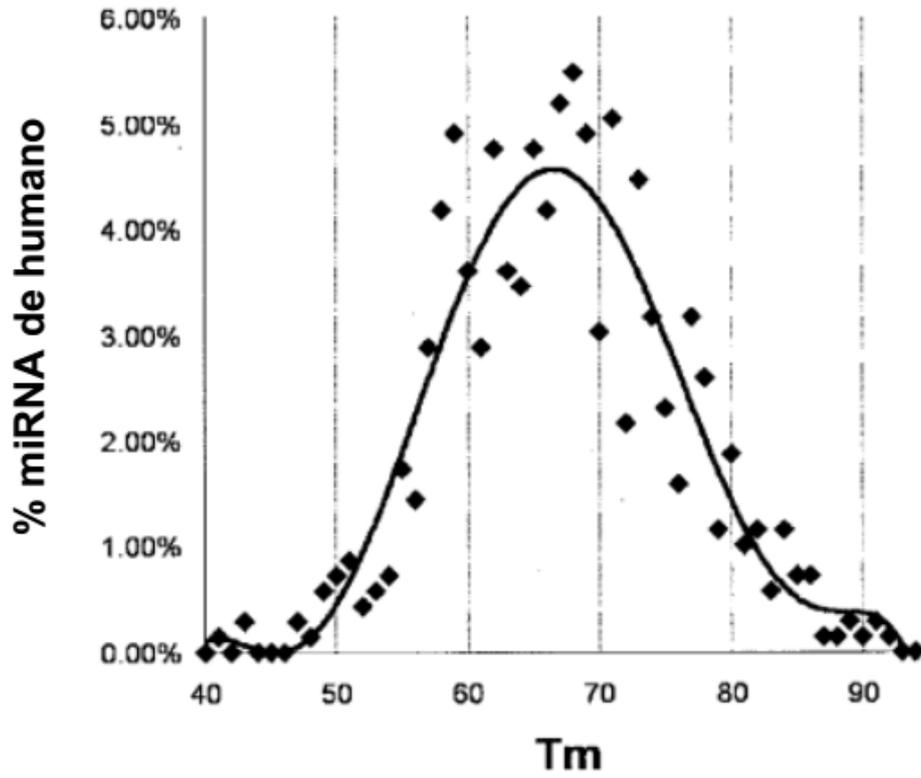


FIGURA 2

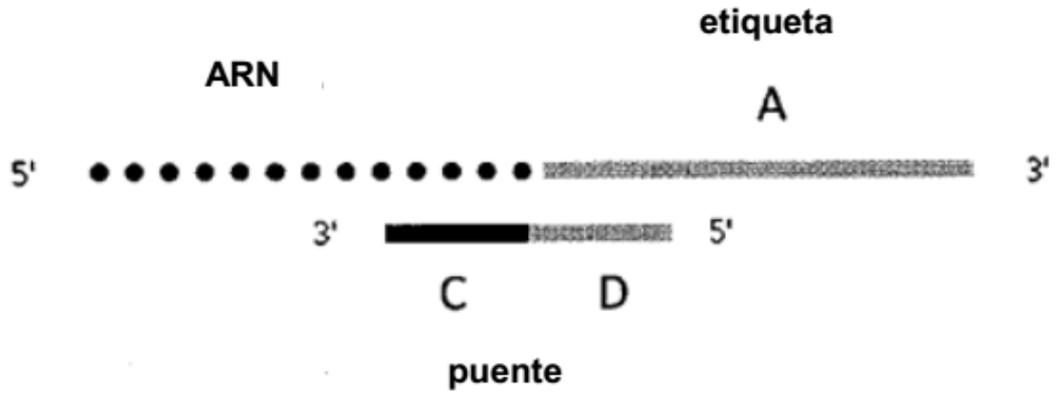


FIGURA 3

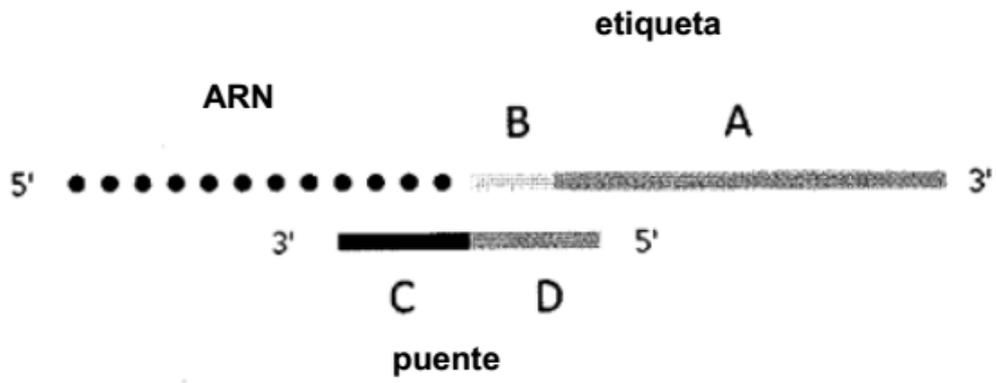


FIGURA 4

Temperatura de ligación

45 46 47 48 49 50 51 52

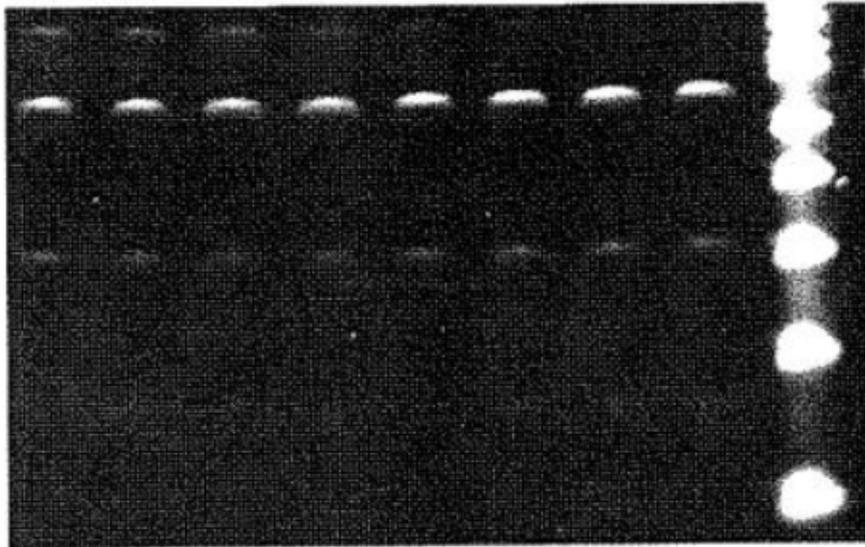
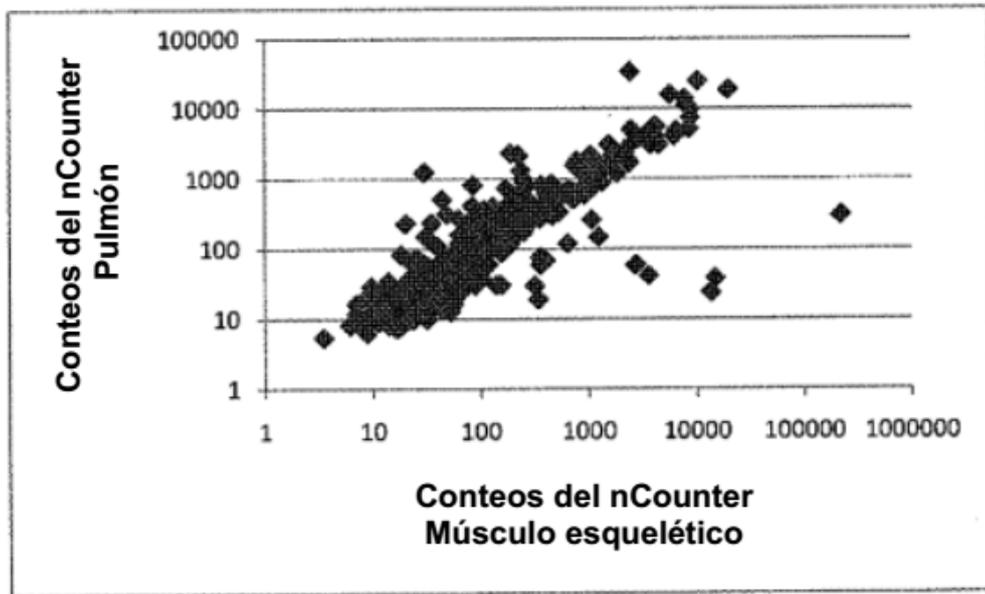


FIGURA 5

A



B

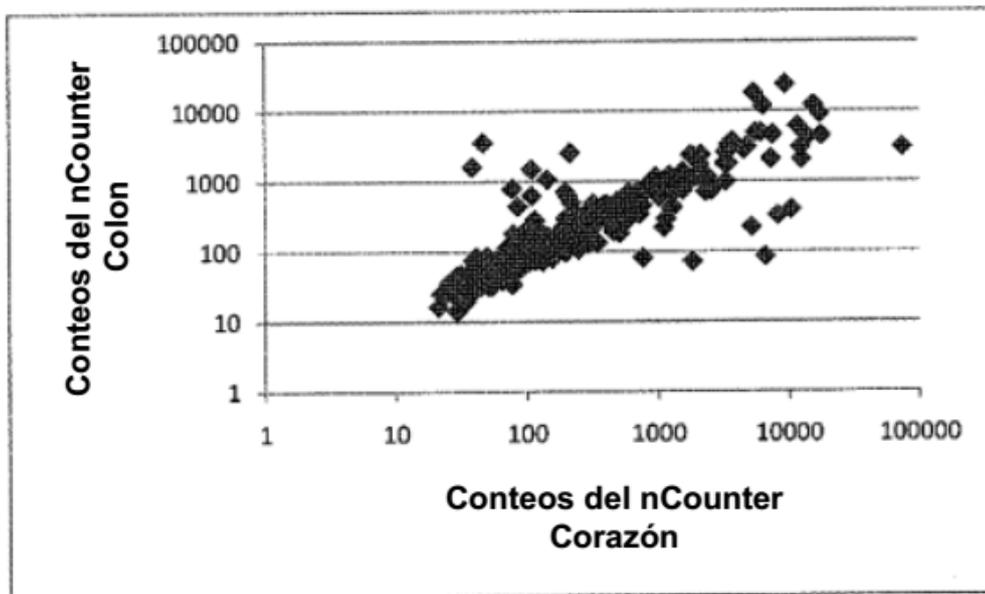
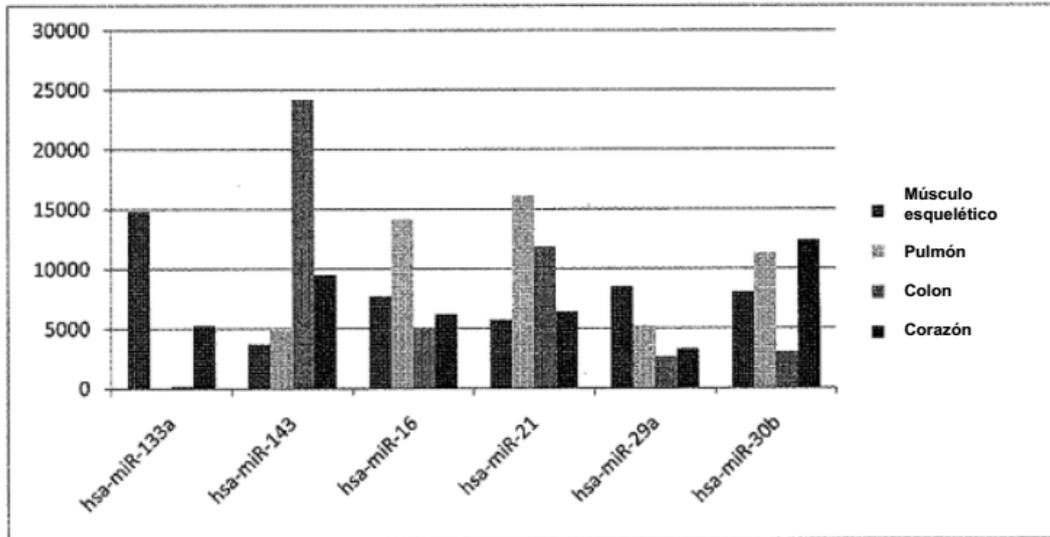


FIGURA 6

A



B

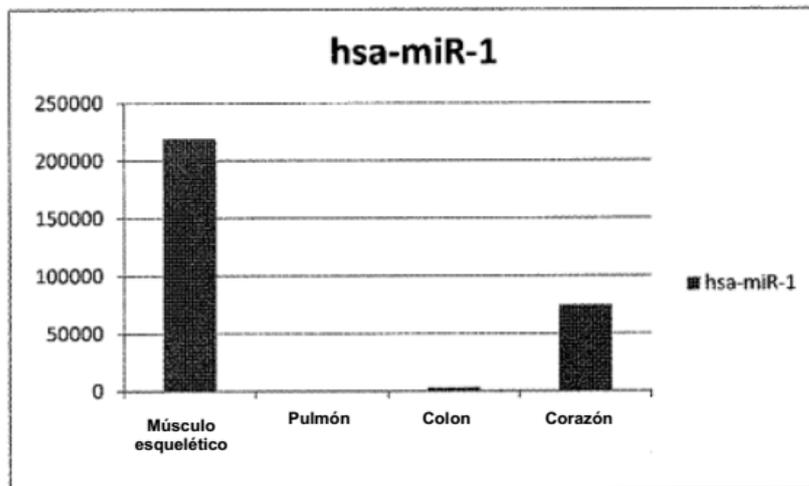


FIGURA 7

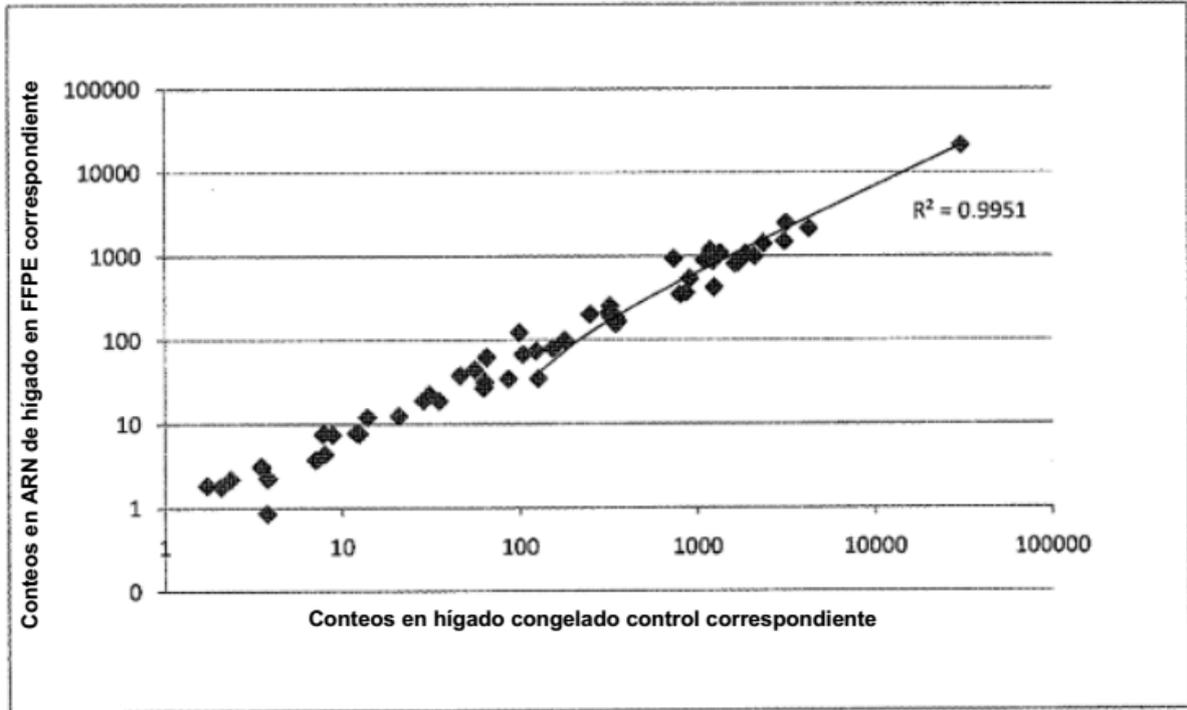


FIGURA 8

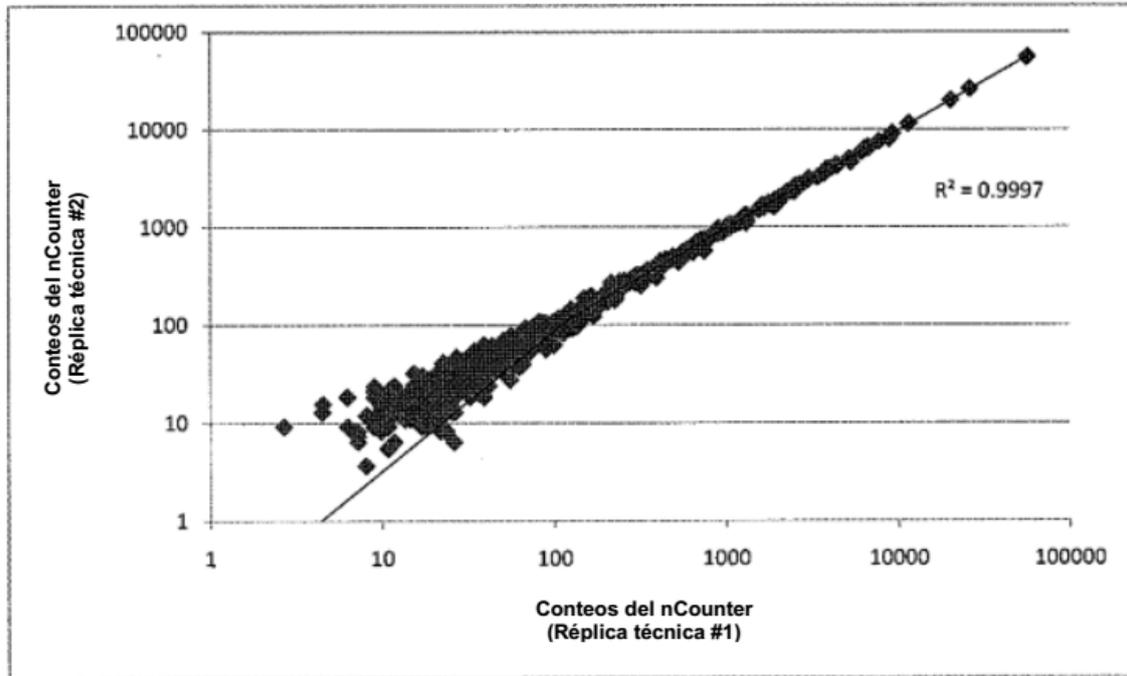


FIGURA 9

