

19



OFICINA ESPAÑOLA DE
PATENTES Y MARCAS

ESPAÑA



11 Número de publicación: **2 731 637**

51 Int. Cl.:

C12Q 1/6816 (2008.01)

12

TRADUCCIÓN DE PATENTE EUROPEA

T3

86 Fecha de presentación y número de la solicitud internacional: **02.03.2016 PCT/EP2016/054450**

87 Fecha y número de publicación internacional: **09.09.2016 WO16139262**

96 Fecha de presentación y número de la solicitud europea: **02.03.2016 E 16707454 (1)**

97 Fecha y número de publicación de la concesión europea: **01.05.2019 EP 3265581**

54 Título: **Detección simultánea de oligonucleótidos, un kit y un uso relacionado con el mismo**

30 Prioridad:

02.03.2015 EP 15000588

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

18.11.2019

73 Titular/es:

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

72 Inventor/es:

**RÖHL, INGO;
DÖRFLER, NADINE y
KNIS, JULIA**

74 Agente/Representante:

ISERN JARA, Jorge

ES 2 731 637 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

Detección simultánea de oligonucleótidos, un kit y un uso relacionado con el mismo

- 5 Las moléculas de ADN y ARN desempeñan una función importante en la expresión génica en una diversidad de organismos. Por ejemplo, los ARN pequeños se descubrieron recientemente como reguladores importantes de la expresión génica postranscripcional, en particular el silenciamiento génico, con impacto tanto en procesos fisiológicos como patológicos en células vivas. Desde entonces, se ha descubierto una diversidad de ARN cortos que son clases abundantes de reguladores génicos en plantas, animales y virus de ADN, y se han identificado ARN cortos de diferente
- 10 origen y función en una diversidad de organismos a partir de levaduras de fisión para seres humanos. Entre ellos, los miARN son el tipo más abundante de ARN reguladores pequeños en plantas y animales. Hasta la fecha, se han identificado más de 20 000 miARN diferentes por clonación y secuenciación (véase, por ejemplo, miRBase: the microRNA registry database at <http://www.mirbase.org/>, Sanger Institute, R.U.). En general, los miARN se caracterizan por una longitud de 21-25 nucleótidos (nt) y están implicados en la regulación de la expresión de proteínas por un mecanismo en que se forman pares de bases complementarias entre el miARN y su ARNm diana. Este proceso da lugar a la inhibición de la traducción de proteínas y, dependiendo del grado de complementariedad de secuencia entre el miARN y su sitio diana, también a la degradación del transcrito de ARNm (para una revisión véase, por ejemplo, Bartel DP, Cell 2009, 136(2): 215-233).
- 20 La expresión alterada de miARN se ha implicado en la contribución a enfermedades humanas, en particular al cáncer, basándose en el hallazgo de que los tumores malignos y la líneas celulares tumorales revelan perfiles de expresión de miARN desregulados en comparación con tejidos normales (para una revisión véase, por ejemplo, Farazi *et al.*, 2013, Adv. Exp. Med. Biol 774: 1-20). Es decir, se ha observado una disminución global en los niveles de miARN en cánceres humanos, lo que indica que los ARN reguladores pequeños pueden tener una función intrínseca en la supresión tumoral. Como hay una regulación por disminución global de los miARN en tumores, el perfil de expresión de los miARN puede reflejar el origen y estado de diferenciación de esta enfermedad. De una manera similar, otras enfermedades se caracterizan por niveles regulados por aumento y/o disminución de los miARN expresados de forma endógena tales como, por ejemplo, el ARN regulador pequeño miARN-21 cuya expresión se ha encontrado desregulada en casi todos los tipos de cánceres, pero también desempeña una función crucial en otros diversos
- 25 procesos biológicos incluyendo el desarrollo, enfermedades cardiovasculares y pulmonares e inflamación (para una revisión véase, por ejemplo, Kumarswamy *et al.*, 2011, RNA Biology 8: 5, 706-713, y Kataoka y Wang, Cell 2014, 3: 883-898). Además, se ha demostrado que la insuficiencia renal se caracteriza por un patrón de expresión diferente de los ARN reguladores pequeños miARN-320 y miARN-210 (Lorenzen J.M. *et al*, Clin. J. Am. Soc. Nephrol, 6: 1540-1546).
- 30 Las moléculas sintéticas que pueden unirse con alta especificidad de secuencia a una secuencia génica diana elegida son de interés principal en contextos médicos y biotecnológicos ya que se muestran prometedoros para el desarrollo de agentes genoterapéuticos y dispositivos de diagnóstico. Es decir, los oligonucleótidos de secuencia conocida, por ejemplo, se usan habitualmente en una amplia diversidad de aplicaciones químicas y biológicas y han obtenido importancia creciente en aplicaciones de diagnóstico y terapéuticas.
- 35 El análisis de los oligonucleótidos usados como agentes terapéuticos a partir de muestras fisiológicas incluyendo el análisis de ARN reguladores pequeños en forma de, por ejemplo, perfiles de expresión de miARN ya se ha desarrollado como una herramienta importante en diagnóstico médico. Los micro-ARN son oligonucleótidos fácilmente detectables que se emplean actualmente como biomarcadores en una amplia gama de enfermedades. Los sistemas de detección altamente sensibles para el análisis cuantitativo de clases particulares de oligonucleótidos reguladores pequeños son, por tanto, una herramienta importante para el diagnóstico médico de vanguardia. Las estrategias de detección de alto rendimiento actuales, sin embargo, dependen en gran medida de métodos que emplean reacción en cadena de la polimerasa en tiempo real cuantitativa (RT-PCR). La RT-PCR posibilita tanto la detección como la cuantificación en forma de número absoluto de copias, así como en forma de cantidades relativas. Estos métodos, sin embargo, necesitan una preparación de muestras intensiva incluyendo amplificación previa de la secuencia diana y llevan mucho tiempo y son caros.
- 40 La cromatografía de intercambio iónico en combinación con la absorbancia de UV o la detección fluorescente se ha usado principalmente hasta ahora para analizar el grado de pureza de los oligonucleótidos sintéticos, o para detectar modificaciones oligonucleotídicas. En esta ocasión, los oligonucleótidos se separan en una fase estacionaria positiva por el número de cargas del esqueleto fosfodiéster negativas que se definen por la longitud de su estructura. La cromatografía de intercambio iónico acoplada con detección de UV o lectura fluorescente se ha descrito además en el contexto de análisis de la farmacocinética de los oligonucleótidos terapéuticos. De este modo, se divulga un método para la detección simultánea de ambas hebras de un oligonucleótido en paralelo a partir de una muestra (documento WO 2010/043512 A1, para una revisión véase, por ejemplo, Batkai y Thum, 2014, Journal of Chromatography B, 964: 146-152).
- 55 Se divulgan biosondas que comprenden una secuencia de nucleobases que puede hibridar con un biomarcador y al menos un grupo funcional cargado que provoca menor agregación de una pluralidad de biosondas para hibridación
- 60
- 65

con el biomarcador, por lo que detectar la hibridación es indicativa de la presencia del biomarcador (documento WO 2012/109157).

5 El campo de oligonucleótidos reguladores pequeños en expansión está afrontando actualmente muchos cambios analíticos, tanto a nivel molecular como a nivel de diagnóstico a gran escala. Proporcionar métodos de detección altamente sensibles, fiables y rápidos para la cuantificación absoluta y normalización en el contexto del cribado de alto rendimiento es, por lo tanto, una cuestión principal de máxima importancia en el campo de la investigación médica, diagnóstico y tratamiento.

10 Por tanto, siempre hay una necesidad de un método mejorado de detección cuantitativa de oligonucleótidos diana de interés en paralelo a partir de una muestra, incluyendo el análisis del patrón de expresión de ARN reguladores pequeños tales como miARN con la misma longitud, pero diferente identidad, u otros nucleótidos terapéuticos.

15 En el contexto de la presente invención, se ha descubierto que oligonucleótidos de diferente secuencia, pero la misma longitud pueden detectarse cuantitativamente y, de este modo, analizarse en paralelo por un método que emplee moléculas de detección complementarias en combinación con cromatografía de líquidos de alto rendimiento de intercambio aniónico (AEX-HPLC), en la que las moléculas de detección se marcan de forma fluorescente y se modifican químicamente para revelar diferentes cargas superficiales globales. Es decir, mientras los oligonucleótidos de la misma longitud revelan perfiles de elución similares después de su unión a una fase estacionaria cargada de forma positiva debido a sus cargas de estructura negativa similares, la hibridación de las moléculas de detección complementarias con diferentes cargas superficiales altera significativamente las cargas superficiales globales de los oligonucleótido diana y, de este modo, posibilita una resolución mejorada y permite la separación de otro modo imposible de los oligonucleótidos diana respectivos debido a sus afinidades de unión alteradas después de la hibridación con su molécula de detección respectiva. El método de la presente invención o como se divulga en este documento, por tanto, es particularmente adecuado para detectar más una especie de oligonucleótidos en paralelo en una muestra, en particular cuando los oligonucleótidos son de longitud idéntica o similar, que dificultaría normalmente o impediría su separación por métodos cromatográficos. Por lo tanto, el método de la presente invención o como se divulga en este documento es particularmente adecuado para detectar múltiples ARN reguladores pequeños o moléculas de ADN de la misma longitud en una estrategia, incluyendo, por ejemplo, en el contexto de cuantificación de alto rendimiento de múltiples miARN o ARN terapéuticos pequeños en paralelo a partir de una muestra biológica de interés.

25 Por consiguiente, en un primer aspecto, la presente invención se refiere a un método para detectar de forma cuantitativa al menos tres oligonucleótidos distintos de la misma longitud en paralelo a partir de una muestra biológica, comprendiendo dicho método las etapas de

35 a) proporcionar una muestra biológica que contiene o es sospechosa de contener los al menos tres oligonucleótidos distintos de la misma longitud;

40 b) formar una mezcla de hibridación poniendo en contacto la muestra biológica con al menos tres moléculas de detección complementarias a los al menos tres oligonucleótidos distintos de la misma longitud, en el que las moléculas de detección se marcan cada una con al menos un resto fluorescente, y en el que las moléculas de detección tienen diferentes cargas superficiales, en el que las diferentes cargas superficiales de las al menos tres moléculas de detección se seleccionan del grupo de cargas neutras, negativas y positivas, en el que la carga o cargas superficiales negativas se caracterizan por la presencia de al menos dos restos de aminoácido cargados negativamente incorporados o modificaciones de la estructura de aminoglicina, y en el que la carga o cargas superficiales positivas se caracterizan por la presencia de al menos dos restos de aminoácido cargados positivamente incorporados o modificaciones de la estructura de aminoglicina;

45 c) separar las moléculas de detección hibridadas con los al menos tres oligonucleótidos distintos de la misma longitud del resto de moléculas de detección no hibridadas por cromatografía de líquidos de alto rendimiento de intercambio aniónico (AEX-HPLC);

50 d) detectar la molécula de detección hibridada - restos oligonucleótidos mediante lectura de fluorescencia cuantitativa.

Se divulga un método para detectar de forma cuantitativa al menos dos oligonucleótidos distintos de la misma longitud en paralelo a partir de una muestra biológica, comprendiendo dicho método las etapas de

60 a) proporcionar una muestra biológica que contiene o es sospechosa de contener los al menos dos oligonucleótidos distintos de la misma longitud;

65 b) formar una mezcla de hibridación poniendo en contacto la muestra biológica con al menos dos moléculas de detección complementarias a los al menos dos oligonucleótidos distintos de la misma longitud, en el que las moléculas de detección se marcan cada una con al menos un resto fluorescente, y en el que las moléculas de detección tienen diferentes cargas superficiales;

c) separar las moléculas de detección hibridadas con los al menos dos oligonucleótidos distintos de la misma longitud del resto de moléculas de detección no hibridadas por cromatografía de líquidos de alto rendimiento de intercambio aniónico (AEX-HPLC);

5 d) detectar la molécula de detección hibridada - restos oligonucleótidos mediante lectura de fluorescencia cuantitativa.

El término "oligonucleótido", como se usa en el contexto de la presente invención, en general se refiere a un oligómero o polímero compuesto de desoxirribonucleótidos (ADN) o ribonucleótidos (ARN), preferiblemente a un oligonucleótido o polímero compuesto de ribonucleótidos (ARN). Por tanto, en el contexto de la presente invención, los oligonucleótidos de interés son preferiblemente moléculas de ARN en forma de oligonucleótidos de ARN, incluyendo, aunque sin limitación, ARN reguladores pequeños tales como miARN y ARNip. Igualmente se prefiere que los oligonucleótidos de la presente invención sean moléculas de ADN en forma de oligonucleótidos de ADN, incluyendo, aunque sin limitación, todos los tipos de oligonucleótidos de ADN diseñados sintéticamente y/o fabricados tales como, por ejemplo, oligonucleótidos señuelo. En principio, los oligonucleótidos de acuerdo con la presente invención incluyen todos los tipos de estructuras compuestas de una nucleobase (es decir, una base nitrogenada), un azúcar de cinco carbonos que puede ser una ribosa, un 2'-desoxirribosa o cualquier derivado del mismo, y un grupo fosfato. La nucleobase y el azúcar constituyen una unidad mencionada como nucleósido. Los grupos fosfato pueden formar enlaces con el carbono 2, 3 o 5, en particular con el carbono 3 y 5 del azúcar. Un ribonucleótido contiene una ribosa como resto de azúcar, mientras que un desoxirribonucleótido contiene una desoxirribosa como un resto de azúcar. Los nucleótidos pueden contener una base de purina o pirimidina. Por consiguiente, los oligonucleótidos de acuerdo con la presente invención, constituidos por ribonucleótidos o desoxirribonucleótidos o por cualquier combinación de los mismos, pueden incluir además uno o más nucleótidos modificados. Opcionalmente, los oligonucleótidos pueden comprender además únicamente nucleótidos modificados. Las formas ribo y desoxi de los nucleótidos modificados pueden incluir, por ejemplo, aunque sin limitación, nucleósidos 5-propinil-uridina, 5-propinil-citidina, 5-metil-citidina, 2-amino-adenosina, 4-tiouridina, 5-yodouridina, N6-metil-adenosina, 5-fluorouridina, inosina, 7-propinil-8-aza-7-desazapurina y 7-halo-8-aza-7-desazapurina. Los oligonucleótidos mencionados en el contexto de la presente invención pueden comprender además modificaciones de la estructura tales como, por ejemplo, 2'-O-metil (2'-OMe) ARN o 2'-fluoro (2'-F) ARN. Opcionalmente, los oligonucleótidos de la presente invención también pueden comprender o pueden comprender en su lugar una o más modificaciones en la estructura de fosfato tales como, por ejemplo, fosforotioatos o metilfosfonatos, que se sabe que aumentan la estabilidad contra las nucleasas.

La expresión "oligonucleótidos distintos de la misma longitud", como se usa en este documento, significa moléculas oligonucleotídicas monocatenarias o bicatenarias de longitud idéntica o similar, es decir, oligonucleótidos que están compuestos de un número idéntico o similar de nucleótidos. La expresión "misma longitud" preferiblemente define que los oligonucleótidos de interés tienen una longitud idéntica. En este caso, los oligonucleótidos de interés están compuestos de un número idéntico de nucleótidos. Igualmente se prefiere, sin embargo, que los oligonucleótidos de interés tengan una longitud similar, es decir, una longitud que difiere ligeramente entre sí. Una "misma longitud" de acuerdo con la presente invención, de este modo, también incluye que la longitud de los oligonucleótidos respectivos varía entre sí en un par de nucleótidos, preferiblemente un máximo de cinco, cuatro, tres o dos nucleótidos. Más preferiblemente, los al menos tres oligonucleótidos distintos de interés varían únicamente en un nucleótido de longitud.

Es decir, en una realización preferida, los al menos tres oligonucleótidos a detectar por el método de la presente invención pueden tener una longitud similar que varía en 5 nucleótidos o, como alternativa, en 4 nucleótidos o, como alternativa, en 3 nucleótidos o, como alternativa, en 2 nucleótidos. Más preferiblemente, los oligonucleótidos de interés pueden tener una longitud similar que varía en únicamente un nucleótido. En aquellos casos en que se detectan más de dos oligonucleótidos distintos de interés en paralelo a partir de una muestra, por ejemplo, en casos en que se detectan tres, cuatro, cinco, seis, siete, ocho, nueve, diez o incluso más oligonucleótidos de la misma longitud en paralelo a partir de una muestra, los oligonucleótidos a detectar pueden ser de longitud idéntica o similar, o ambas, como se define por cualquiera de las combinaciones o alternativas descritas anteriormente.

Preferiblemente, los oligonucleótidos distintos de la misma longitud de acuerdo con la presente invención son oligonucleótidos de diferente secuencia, pero compuestos de un número idéntico de nucleótidos. Los oligonucleótidos de longitud similar que difieren en la longitud en únicamente un pequeño número de nucleótidos, preferiblemente por una diferencia de no más de 5 nucleótidos de longitud, son igualmente preferidos. La definición "oligonucleótidos distintos de la misma longitud", como se usa en este documento, además no excluye que los oligonucleótidos de interés puedan incluir, comprender o abarcar una o más modificaciones químicas idénticas o diferentes. Las modificaciones químicas pueden ser idénticas o diferentes con respecto al número y/o la identidad. En general, en el contexto de la presente invención, los oligonucleótidos a detectar pueden tener una longitud total de 10 a 50 nucleótidos, o de 12 a 40 nucleótidos, o de 12 a 30 nucleótidos, o preferiblemente una longitud de 10 a 25 nucleótidos. Igualmente se prefiere que los nucleótidos de interés puedan tener una longitud en el intervalo de 15 a 30 nucleótidos, más preferiblemente en el intervalo de 18 a 25 nucleótidos, mucho más preferiblemente en el intervalo de 20 a 22 nucleótidos. Sin embargo, es evidente para los expertos en la materia que los límites superior o inferior anteriores también pueden combinarse para llegar a diferentes intervalos. Además, la muestra de la invención que contiene los oligonucleótidos de interés puede contener una población de moléculas oligonucleotídicas con dichas longitudes variables. Es decir, la muestra proporcionada en el contexto de la presente invención puede comprender

oligonucleótidos de la misma longitud, o puede comprender oligonucleótidos de diferente longitud, o ambas, incluyendo, aunque sin limitación, formas precursoras y maduras de un oligonucleótido de interés tal como, por ejemplo, un miARN y su precursor, o ARN no codificantes largos. La presencia de oligonucleótidos de diferente longitud, sin embargo, no altera la detección cuantitativa de oligonucleótidos de la misma longitud por el método de la presente invención.

Por tanto, en una realización preferida, los al menos tres oligonucleótidos distintos tienen una longitud de 10 a 50 nucleótidos, preferiblemente de 12 a 40 nucleótidos, más preferiblemente de 18 a 30 nucleótidos.

Los oligonucleótidos a detectar en el contexto de la presente invención pueden derivar además de todos los tipos de fuentes naturales, no naturales o artificiales incluyen, aunque sin limitación, ADN o ARN vírico, bacteriano y eucariota. Como alternativa, los oligonucleótidos de interés pueden derivar de fuentes sintética incluyendo aquellas que se fabrican y sintetizan para su uso en investigación, como agentes de diagnóstico o terapéuticos. El término "sintetizar", como se usa en este documento, preferiblemente se refiere a la fabricación de oligonucleótidos de ADN o ARN mediante síntesis química incluyendo, aunque sin limitación, el uso de sintetizadores automatizados de ADN y/o ARN y/o química de fosforamidita. Los sintetizadores automatizados de ADN o ARN se usan de forma rutinaria por los expertos en la materia y están disponibles en el mercado de diversos proveedores tales como, por ejemplo, Applied Biosystems (Darmstadt, Alemania), Biolytic (Newark, CA, EE. UU.), GE Healthcare o BioAutomation (Plano, TX, EE. UU.).

La característica "que proporciona una muestra biológica" como se usa en el contexto de la presente invención se refiere a todos los tipos de procedimientos adecuados para preparar una composición que contiene los al menos tres oligonucleótidos distintos de interés o, como alternativa, una población de oligonucleótidos a detectar para análisis adicional. Estos procedimientos incluyen, aunque sin limitación, procedimientos convencionales bioquímicos y/o de biología celular adecuados para la preparación de un extracto celular o tisular, en los que las células y/o tejidos pueden obtenerse de cualquier tipo de organismo que contenga los al menos tres oligonucleótidos de interés. Por ejemplo, una muestra de acuerdo con la presente invención puede ser un extracto celular o un extracto tisular que abarca ARN total purificado y/o ARN total fraccionado por tamaño, por ejemplo, derivado de una célula o células cultivadas en cultivo celular u obtenidas de un organismo por disección y/o cirugía. En particular, una muestra biológica de acuerdo con la presente invención puede obtenerse de uno o más tejidos de uno o más pacientes o cualquier tipo de sujeto vivo. Proporcionar una muestra biológica de una célula, de un extracto celular o de un tejido puede incluir una o más etapas bioquímicas de purificación tales como, por ejemplo, centrifugación y/o fraccionamiento, lisis celular mediante etapas de alteración mecánica o química incluyendo, por ejemplo, múltiples ciclos de congelación y/o descongelación, tratamiento o tratamientos salinos, extracción con fenol-cloroformo, tratamiento con dodecilsulfato de sodio (SDS) y digestión con proteinasa K. Opcionalmente, proporcionar una muestra biológica de acuerdo con la presente invención puede incluir además la eliminación de ARN grande, tal como ARNr ribosómico abundante, por precipitación en presencia de polietileno o sal, o la eliminación de dodecilsulfato de sodio (SDS) interferente por precipitación en presencia de sal, preferiblemente en presencia de solución de cloruro de potasio. Los métodos de purificación de ARN total a partir de una célula y/o un tejido son bien conocidos para los expertos en la materia e incluyen, por ejemplo, procedimientos convencionales tales como el uso de extracción con tiocianato de guanidinio - fenol ácido-cloroformo (por ejemplo, TRIzol®, Invitrogen, EE. UU.).

En el contexto de la presente invención, igualmente se prefiere, sin embargo, que la muestra biológica se proporcione sin ninguna de las etapas de precipitación y/o purificación descritas en este documento. Es decir, en una realización preferida, la muestra biológica de la presente invención puede someterse únicamente a una digestión con proteinasa K en presencia de SDS. Después de la digestión de la muestra biológica en presencia de SDS, el dodecilsulfato de sodio (SDS) interferente puede eliminarse por una etapa de precipitación posterior en presencia de sal, preferiblemente en presencia de iones potasio. Igualmente se prefiere, sin embargo, que la muestra biológica se proporcione o procese en presencia de proteinasa K, preferiblemente por digestión enzimática con proteinasa K, en ausencia de SDS. En este caso, pueden omitirse todas las etapas de precipitación para eliminar el SDS interferente.

Además, la muestra biológica de acuerdo con la presente invención puede comprender además o complementarse por una o más moléculas sintéticas tales como, por ejemplo, una o más moléculas oligonucleotídicas sintéticas de una o más concentraciones conocidas y/o de uno o más pesos moleculares conocidos que pueden servir como patrón interno para la cuantificación y/o para la lectura fluorescente cuantitativa. Las moléculas sintéticas que pueden usarse como patrón interno se proporcionan en forma de una mezcla de moléculas con diferentes concentraciones y/o con diferentes pesos moleculares, o en forma de diversas series de dilución. En todas las realizaciones, las moléculas oligonucleotídicas sintéticas preferiblemente se marcan de forma fluorescente para permitir una lectura fluorescente cuantitativa directa y se tratan de la misma manera que la muestra biológica de interés. Las moléculas adecuadas que pueden servir como patrón interno en el contexto de la presente solicitud pueden incluir, aunque sin limitación, oligonucleótidos sintéticos que corresponden a la secuencia o secuencias diana de los al menos tres oligonucleótidos de interés, o correspondientes a fragmentos de los mismos.

Como alternativa, la muestra biológica puede contener al menos tres, preferiblemente cinco concentraciones diferentes de una molécula sintética marcada de forma fluorescente cuya secuencia corresponde a diferentes longitudes de la secuencia del oligonucleótido diana a detectar. Por ejemplo, para detectar un oligonucleótido diana de 20 nucleótidos

de longitud, pueden usarse moléculas oligonucleotídicas sintéticas marcadas de forma fluorescente con una longitud de 8, 11 y 14 nucleótidos, respectivamente, como patrón interno para la cuantificación. Como alternativa, los oligonucleótidos marcados de forma fluorescente pueden tener diferentes longitudes que prolongan la longitud original del oligonucleótido u oligonucleótidos diana a detectar. Por ejemplo, para detectar un oligonucleótido diana de 20 nucleótidos de longitud, pueden usarse moléculas oligonucleotídicas marcadas de forma fluorescente con una longitud de 24, 28 y 32 nucleótidos, respectivamente, como patrón interno para una lectura fluorescente cuantitativa. En esta ocasión, los oligonucleótidos marcados de forma fluorescente pueden corresponder a la secuencia de los oligonucleótidos diana a detectar y pueden abarcar prolongaciones de nucleótidos adicionales, preferiblemente diseñadas de forma artificial, que no corresponden a la secuencia o secuencias diana de interés.

En general, en el contexto de la presente invención, los oligonucleótidos marcados de forma fluorescente usados para la cuantificación interna preferiblemente se sintetizan de forma sintética. Además, los oligonucleótidos marcados de forma fluorescente usados como patrón interno preferiblemente hibridarán con su molécula o moléculas de detección respectivas de la misma manera que los oligonucleótidos diana de interés antes de que se separen mediante cromatografía HPLC de intercambio aniónico. Es decir, la cuantificación mediante el uso de patrones internos como se describe en este documento depende de la formación, elución y separación de dobles hélices mediante cromatografía de líquidos de alto rendimiento de intercambio aniónico (AEX-HPLC), en la que las dobles hélices del patrón interno comprenden oligonucleótidos marcados de forma fluorescente hibridados para la detección de moléculas de secuencia complementaria. Más preferiblemente, para una lectura cuantitativa, los oligonucleótidos marcados de forma fluorescente se separan y eluyen de la columna de intercambio aniónico junto con la muestra biológica de interés en una configuración experimental, en particular como parte de la misma ejecución de columna de AEX-HPLC. En esta configuración, la lectura de fluorescencia cuantitativa depende de la comparación de las diferentes alturas de pico y/o diferentes áreas de pico generadas por las dobles hélices oligonucleotídicas del patrón interno con las alturas y/o las áreas de los pico de elución generados por la respectiva molécula de detección - restos oligonucleotídicos de interés. La lectura de fluorescencia cuantitativa que usa patrón interno es bien conocida para los expertos en la materia y se aplica de forma rutinaria en la práctica de laboratorio, y hay programas informáticos disponibles en el mercado para calcular, comparar, integrar y/o cuantificar la alturas de pico y/o áreas de pico de elución en una base cuantitativa (por ejemplo, ThermoFisher, Waters, Shimadzu, Agilent, EE. UU.).

Ejemplos de muestras biológicas de acuerdo con la presente invención incluyen, aunque sin limitación, por ejemplo, sangre, plasma, orina, heces, el hígado, pulmón, líquido cefalorraquídeo o cualquier otra muestra celular, tisular y/o de biopsia obtenida de un individuo, preferiblemente obtenida de un individuo con una enfermedad particular, preferiblemente con una enfermedad renal, más preferiblemente con lesión en los riñones.

Por consiguiente, en una realización preferida, la muestra biológica es una muestra obtenida de uno o más individuos, incluyendo sujeto no humanos y humanos, preferiblemente en forma de una muestra de biopsia, más preferiblemente en forma de células, tejido o líquido. Igualmente se prefiere, sin embargo, que la muestra biológica se obtenga de una configuración experimental o de un experimento *in vitro* o *in vivo* tal como, por ejemplo, ensayos biológicos o bioquímicos, ensayos genéticos moleculares, ensayos de cultivo celular o ratones. La muestra biológica de la presente invención puede seleccionarse además del grupo que consiste en sangre, plasma, orina, heces y muestras de líquido cefalorraquídeo, incluyendo muestras de uno o más tejidos y/o una o más células derivadas de hígado, pulmón, riñón, mama, próstata, corazón o cerebro. En una realización preferida, la muestra biológica es una muestra de plasma.

En el contexto de la presente invención, la expresión "molécula de detección" en general significa cualquier tipo de molécula que sea adecuada para hibridar con la secuencia o secuencias oligonucleotídicas diana de interés por emparejamiento de bases complementarias, formando de este modo una doble hélice de dos hebras complementarias. Además, la molécula de detección de acuerdo con la presente invención contendrá un resto fluorescente que permite la detección, análisis y/o visualización de los al menos tres oligonucleótidos de interés tras la hibridación. En general, los al menos tres oligonucleótidos de interés no están marcados de forma fluorescente. Las moléculas de detección adecuadas de acuerdo con la presente invención incluyen, aunque sin limitación, todos los tipos de moléculas diseñadas sintéticamente y/o fabricadas con carga neta neutra tales como, por ejemplo, ácidos peptidnucleicos (PNA por sus siglas en inglés), oligómeros morfolino de fosfordiamidato (PMO) y Ugimer. Es decir, la molécula de detección de la presente invención se caracteriza preferiblemente por una carga de estructura neutra, en particular por carecer de cualquier grupo iónico cargado tal como, por ejemplo, grupos fosfato cargados negativamente.

Por consiguiente, en una realización preferida, la molécula de detección se selecciona del grupo que consiste en ácidos peptidnucleicos (PNA), oligómeros morfolino de fosfordiamidato (PMO) y Ugimer.

La molécula de detección de la presente invención en general se sintetiza para que acople con una secuencia de nucleótidos de interés y pueda usarse para detectar, analizar y/o visualizar dicha secuencia de nucleótidos a nivel molecular. Será evidente para los expertos en la materia que la molécula de detección de la presente invención tiene una longitud adecuada para proporcionar la especificidad requerida para la hibridación con su molécula diana. La molécula de detección de acuerdo con la presente invención está compuesta de varios nucleótidos, preferiblemente de al menos 10, más preferiblemente de al menos 15 nucleótidos y preferiblemente comprende al menos un resto fluorescente en forma de un marcador fluorescente.

En una realización preferida, las moléculas de detección empleadas en el contexto de la presente invención tienen una longitud de 10 a 30 nucleótidos, preferiblemente una longitud de 10 a 20 nucleótidos, más preferiblemente una longitud de 15 a 20 nucleótidos.

5 La expresión "ácido peptidonucleico (PNA)", como se usa en este documento, en general se refiere a cualquier tipo de análogo de ácido nucleico en que la estructura de fosfato y azúcar de ácido nucleico natural se ha remplazado por una estructura de péptido sintético habitualmente formada por la repetición de unidades de N-(2-aminoetil)-glicina que carece de cualquier grupo fosfato cargado. Opcionalmente, el ácido peptidonucleico también puede comprender cualquier tipo de unidad que no sea glicina y/o reactivo de unión que pueda permitir o facilitar la incorporación de uno o más marcadores adicionales o modificaciones químicas. En general, los ácidos peptidonucleicos se diseñan de forma personalizada y se sintetizan químicamente. Es decir, en el contexto de la presente invención, los ácidos peptidonucleicos se diseñan de forma personalizada para acoplar con el oligonucleótido respectivo de interés, lo que significa preferiblemente que la secuencia del ácido peptidonucleico es complementaria a la secuencia oligonucleotídica diana de interés a detectar. Los ácidos peptidonucleicos son bien conocidos para los expertos en la materia y están disponibles en el mercado de una diversidad de proveedores, incluyendo, por ejemplo, BioSynthesis Inc., EE. UU. o Panagene (Corea del Sur).

20 Los oligómeros morfolino de fosfordiamidato (PMO) son análogos de ADN no iónicos y, de este modo, una clase distinta de análogos oligonucleotídicos que pueden emplearse como moléculas de detección con el contexto de la presente invención. Su carácter no iónico combinado con la resistencia a la degradación les hace adecuados para su uso como moléculas de detección para detectar de forma cuantitativa oligonucleótidos de la misma longitud de acuerdo con la presente invención. Por tanto, en el contexto de la presente invención, los oligómeros morfolino de fosfordiamidato (PMO) pueden usarse como una alternativa igual de adecuada a los ácidos peptidonucleicos, ya que pueden diseñarse de forma racional basándose en los datos de secuencia génica diana. Los oligómeros morfolino de fosfordiamidato (PMO) son bien conocidos en la técnica (véase, por ejemplo, Summerton J, Weller D (1997), Antisense Nucleic Acid Drug Dev, 7: 187 - 95) y están disponibles en el mercado de una diversidad de empresas incluyendo, por ejemplo, Gene Tools, LLC, EE. UU.

30 Los Ugimer son una alternativa adicional a los ácidos peptidonucleicos que pueden usarse como molécula de detección en el contexto de la presente invención. Los Ugimer se basan en la estructura de ácido peptidonucleico (PNA) no natural y, por lo tanto, poseen todas las ventajas de los PNA, incluyendo la fuerte eficacia de bloqueo estérico, la alta especificidad de diana, la alta estabilidad, la baja toxicidad y un bajo riesgo de provocar una respuesta inmunitaria. Los Ugimer pueden modificarse mediante la integración de cadenas laterales particulares a lo largo de la estructura de PNA que puede mejorar considerablemente su solubilidad en agua y que permite una modulación selectiva de sus cargas superficiales globales incluyendo el acoplamiento de restos fluorescentes para la detección fluorescente. Los Ugimer, por ejemplo, están disponibles en el mercado de la empresa Ugichem GmbH, Innsbruck, Austria.

40 La molécula de detección de la presente invención puede diseñarse preferiblemente, aunque no necesariamente, para que revele una complementariedad con su secuencia diana oligonucleotídica de un 100 %. La molécula de detección también puede diseñarse para que revele menos de un 100 % de complementariedad con la secuencia diana oligonucleotídica, si se considera apropiado. La complementariedad entre la molécula de detección y su secuencia diana oligonucleotídica de interés, sin embargo, tiene que ser a tal grado que proporcione unión específica a y, por consiguiente, detección fluorescente del oligonucleótido u oligonucleótidos de interés. El grado de complementariedad tiene que establecerse en una base caso por caso dependiendo de la molécula diana respectiva y la configuración experimental respectiva. El diseño de moléculas de detección, tales como ácidos peptidonucleicos, es un método rutinario para los expertos en la materia y puede facilitarse por estrategias bioinformáticas. Con los números crecientes de genes clonados, pueden diseñarse fácilmente ácidos peptidonucleicos, Ugimer o PMO basándose en cualquier secuencia de ADNc publicada y/o entrada a genoteca. Las bases de datos con secuencias genómicas de diversos organismos son conocidas para los expertos en la materia e incluyen, por ejemplo, todas las bases de datos públicas del NCBI (National Center of Biological Information, EE. UU. o la base de datos de registro de micro-ARN).

55 Las moléculas de detección empleadas en el contexto de la presente invención se caracterizan además por diferentes cargas superficiales globales. La expresión "diferente carga o cargas superficiales", como se usa en este documento, en general significa que la carga superficial global de las al menos tres moléculas de detección empleadas en el contexto de la presente invención son diferentes entre sí. En particular, en el contexto de la presente invención, una o más cargas superficiales diferentes significa que las moléculas de detección tales como, por ejemplo, los ácidos peptidonucleicos, están cargados negativamente, positivamente o de forma neutra a un grado tal distinguible que pueden alterar la afinidad de unión de moléculas oligonucleotídicas diana cargadas de forma igual durante la cromatografía de intercambio aniónico. En particular, la diferente carga o cargas superficiales de las moléculas de detección empleadas en el contexto de la presente invención posibilitan, tras la hibridación con su secuencia diana respectiva, que los oligonucleótidos diana de la misma longitud puedan separarse por únicamente una etapa de cromatografía de intercambio aniónico de una muestra biológica en paralelo a alta resolución. En el contexto de la presente invención, la diferente carga o cargas superficiales de las al menos tres moléculas de detección son un resultado de una o más modificaciones químicas incorporadas, tales como, por ejemplo, la incorporación de aminoácidos adicionales cargados positivamente y/o negativamente y/u otros grupos funcionales que alteran la carga

superficial global de la molécula respectiva. Esta diferencia tiene que mantenerse después de la hibridación con la secuencia diana respectiva. En el contexto de la presente invención, se prevé que el número y/o la identidad de la modificación o modificaciones químicas a incorporar en la molécula de detección, es decir, el diseño de la carga o cargas superficiales globales respectivas, se realizará de acuerdo con las características estructurales y necesidades de la molécula o moléculas diana particulares de interés. Es decir, la carga superficial de la molécula diana respectiva tiene que tenerse en cuenta cuando se diseña la carga superficial de la molécula de detección químicamente. Las modificaciones químicas que pueden alterar la carga superficial global de una molécula de detección, tal como, por ejemplo, un ácido peptidonucleico o un Ugimer, incluyen, aunque sin limitación, cualquier tipo de aminoácido con una cadena lateral cargada positivamente o negativamente, así como otros conectores químicos cargados positivamente o negativamente y/o moléculas que puedan incorporarse en la estructura del ácido peptidonucleico o el Ugimer sin alterar la función de la molécula para hibridar específicamente con y unirse a su secuencia diana respectiva. Preferiblemente, la modificación o modificaciones químicas se incorporan en cualquiera de los extremos de la molécula de detección, tal como, por ejemplo, en el extremo N' o C' del ácido peptidonucleico, más preferiblemente en el extremo N' y C'. Igualmente se prefiere, sin embargo, que la modificación o modificaciones químicas se incorporen en la estructura del ácido peptidonucleico o el Ugimer, preferiblemente en el que la modificación química se une a la posición gamma de la estructura de N-(2-aminoetil)-glicina. Estos tipos de PNA modificados químicamente son conocidos como los llamados gamma-PNA. Tanto los ácidos peptidonucleicos como los Ugimer son igual de adecuados para modificarse mediante la introducción de cargas superficiales adicionales en su estructura, en particular unidos a las posiciones gamma. Los ácidos peptidonucleicos modificados químicamente o Ugimer modificados químicamente están disponibles en el mercado de diversas fuentes y pueden, por ejemplo, adquirirse de Paranege (Corea del Sur) o Ugichem GmbH, Austria.

La expresión "complementario a", como se menciona en el contexto de la presente invención, en general significa la capacidad de un polinucleótido de unirse específicamente a una secuencia diana de interés mediante emparejamiento de bases complementarias. Los pares de bases complementarias se forman entre dos moléculas nucleotídicas (que pueden incluir o no una o más modificaciones) que son complementarias entre sí. En el contexto de la presente invención, los pares de bases complementarias que se forman, por ejemplo, entre la molécula de detección y la molécula oligonucleotídica de interés, pueden incluir todos los tipos de pares de bases canónicas o no canónicas, incluyendo, aunque sin limitación, A-U de Watson-Crick, AT de Watson-Crick, G-C de Watson-Crick, pares de bases oscilantes G-U, pares de bases de Hoogsteen inversas A-U y A-C, o pares de bases de purina-purina y pirimidina-pirimidina tales como los pares de bases G-A recortadas o pares de bases imino G-A. Preferiblemente, la expresión "complementario a" se refiere a pares de bases canónicas.

El término "hibridar" o "hibridación", como se usa en este documento, en general se refiere a la hibridación de dos hebras oligonucleotídicas complementarias, y en particular significa la hibridación de las al menos tres moléculas de detección con sus oligonucleótidos diana complementarios. La hibridación satisfactoria depende de una diversidad de factores, incluyendo temperatura, concentraciones salinas y/o pH. La temperatura óptima para la hibridación está preferiblemente en el intervalo de 5-15 °C por debajo del valor de T_m que define la temperatura de fusión (T_m) de los híbridos, es decir, la temperatura a la que un 50 % de las hebras oligonucleotídicas bicatenarias se separan. Los expertos en la materia conocen diversas fórmulas para calcular los valores de T_m . Las condiciones que dan lugar a la hibridación en el contexto de la presente invención pueden incluir el uso de tampón que contiene reactivos para maximizar la formación de dobles hebras y para inhibir la unión no específica de la molécula de detección con su secuencia diana. Si se requiere, la concentración final de las moléculas de detección respectivas tales como, por ejemplo, los ácidos peptidonucleicos particulares empleados en el contexto de un experimento particular, puede optimizarse para cada reacción. Las condiciones que dan lugar a la hibridación también incluyen incubar la molécula de detección con la molécula diana durante un periodo suficiente de tiempo para permitir la hibridación óptima. Preferiblemente, la hibridación de acuerdo con la presente invención se refiere a condiciones de hibridación en que la molécula de detección, tal como el ácido peptidonucleico, se incuba con su molécula diana en solución, preferiblemente formando una mezcla de hibridación. Las condiciones de hibridación de acuerdo con la presente invención se ilustran, por ejemplo, en detalle en la sección de ejemplos. La hibridación de acuerdo con la presente invención se realiza preferiblemente calentando la muestra hasta una temperatura entre 70 °C y 80 °C y posteriormente enfriando la muestra hasta una temperatura de 5 a 15 °C. En un caso particular, la hibridación también realizarse a temperatura ambiente (es decir, aproximadamente 25 °C. Además, puede ser ventajoso optimizar las condiciones de temperatura en una base caso por caso, tal como en vista de y dependiendo del pH. Dicha optimización puede realizarse fácilmente por un experto en la materia.

La expresión "resto fluorescente", como se usa en este documento, en general se refiere a cualquier sustancia o agente que pueda adherirse y/o unirse a la molécula de detección de la invención, y que puede emplearse para visualizar y/o para cuantificar el oligonucleótido de interés después de su hibridación con la secuencia diana mediante lectura fluorescente. En el contexto de la presente invención, el resto fluorescente es preferiblemente un marcador fluorescente o un fluoróforo diseñado para aplicaciones de alta sensibilidad tales como microscopia de fluorescencia, citometría de flujo o hibridación *in situ*. Los marcadores fluorescentes usados de forma rutinaria incluyen, aunque sin limitación, tintes de fluoresceína, tintes de rodamina o tintes de cianina. Los marcadores fluorescentes preferidos de la presente invención incluyen todos los tipos de tintes Atto y preferiblemente los marcadores fluorescentes Atto 425, Atto 520 y Atto 610, o similares. El marcador fluorescente también puede seleccionarse del grupo de tintes de fluoresceína tales como carboxifluoresceína (FAM), 6-carboxi-4',5'-dicloro-2',7'-dimetoxifluoresceína (JOE),

isotiocianato de fluoresceína (FITC) o fosforamida de 5'-hexacloro-fluoresceína-CE (HEX); tintes de rodamina tales como, por ejemplo, carboxi-X-rodamina (ROX), Texas Red y tetrametilrodamina (TAMRA), tintes de cianina tales como tintes de cianina de pirilio, DY548, Quasar 570 o tintes tales como Cy3, Cy5, Alexa 568 o similares. La elección del marcador fluorescente se determina típicamente por sus propiedades espectrales y por la disponibilidad de equipo para las imágenes. El uso de marcadores fluorescentes en ensayos cuantitativos es un procedimiento convencional bien conocido para los expertos en la materia, y los marcadores fluorescentes están disponibles en el mercado de diversos proveedores incluyendo, por ejemplo, Invitrogen™ (EE. UU.).

En una realización preferida, las al menos tres moléculas de detección empleadas en el contexto de la presente invención se marcan cada una con un resto fluorescente de la misma identidad. Preferiblemente, las al menos tres moléculas de detección se marcan cada una con al menos un resto fluorescente, en el que el resto fluorescente tiene la misma identidad.

Por consiguiente, en una realización preferida, las al menos tres moléculas de detección se marcan cada una con el mismo resto fluorescente, preferiblemente seleccionado del grupo que consiste en, aunque sin limitación, Atto 425, Atto 520 y Atto 610. El uso de restos fluorescentes idénticos tiene la ventaja de que la lectura fluorescente cuantitativa puede realizarse a únicamente una longitud de onda que no solamente facilita la configuración experimental, sino que también proporciona una base mejorada para la comparación cuantitativa y la lectura fluorescente.

Igualmente se prefiere, sin embargo, que las al menos tres moléculas de detección se marquen cada una con al menos dos restos fluorescentes de la misma identidad. Se prevé además en el contexto de la presente invención que las al menos tres moléculas de detección se marquen cada una con más de dos restos fluorescentes de la misma identidad, tales como, por ejemplo, con al menos tres, cuatro, cinco o seis restos fluorescentes de la misma identidad.

Como alternativa, las al menos tres moléculas de detección distintas complementarias a al menos tres oligonucleótidos distintos de la misma longitud de interés se marcan cada una con al menos un resto fluorescente de diferente identidad, tal como, por ejemplo, Atto 425 y Atto 610, Atto 425 y Atto 520 o, como alternativa, Atto 520 y 610. Debe entenderse por los expertos en la materia que la elección de la identidad de los diferentes marcadores fluorescentes dependerá de la configuración experimental individual.

En otra realización preferida, las al menos tres moléculas de detección se marcan cada una con al menos un resto fluorescente, más preferiblemente con al menos dos restos fluorescentes, de diferente identidad.

Igualmente se prefieren varias moléculas de detección marcadas de forma fluorescente diferentes en caso de que se prevea detección múltiple de una diversidad de oligonucleótidos diana distintos. Es decir, en una realización preferida, se comprenden tres, cuatro, cinco, seis, siete, ocho, nueve o diez moléculas de detección diferentes para la detección cuantitativa paralela de al menos tres, cuatro, cinco, seis, siete, ocho, nueve o diez oligonucleótidos distintos de la misma longitud en el contexto de la presente invención. Igualmente se prefiere que se comprendan incluso más de 10 moléculas de detección diferentes para la detección cuantitativa paralela de incluso más de 10 oligonucleótidos diana diferentes en el contexto de la presente invención. Es evidente para los expertos en la materia que, en este contexto, el marcador o marcadores fluorescentes se eligen para la mejor práctica experimental, es decir, los marcadores fluorescentes pueden ser idénticos o diferentes, o ambos, lo que pueda ser adecuado para una resolución cromatográfica óptima y la separación de una selección particular de dianas distintas de interés.

En otra realización preferida, además se comprende al menos una molécula marcada de forma fluorescente complementaria a un sitio de unión de las al menos tres moléculas de detección, en las que este sitio de unión no está implicado en la unión a la secuencia diana.

Es decir, en el contexto de esta realización preferida, las al menos tres moléculas de detección se diseñan de tal manera que abarquen al menos un sitio de unión adicional para la al menos una molécula marcada de forma fluorescente, en la que este sitio de unión no es complementario a ninguna secuencia diana de interés. Por consiguiente, las al menos tres moléculas de detección preferiblemente contienen un sitio de unión que no está implicado en la unión a la secuencia diana.

Además en esta realización, las al menos tres moléculas de detección se marcan preferiblemente con el mismo resto fluorescente que la molécula marcada de forma fluorescente.

El uso de marcadores fluorescente idénticos permite la lectura fluorescente usando únicamente un canal de detección, es decir, la lectura fluorescente puede realizarse a únicamente una longitud de onda. El uso de únicamente un canal de detección fluorescente no solamente facilita la configuración experimental completa sino que también permite una lectura fluorescente cuantitativa más simplificada y fiable. Sin embargo, igualmente se prefiere en el contexto de la presente invención que la identidad del marcador fluorescente en el contexto de las al menos tres moléculas de detección sea diferente, es decir, que las moléculas de detección se marquen con restos fluorescentes de diferente identidad.

El método de la presente invención es en principio aplicable para la detección de oligonucleótidos de todos los tipos de longitud. El método como se describe en este documento, sin embargo, es particularmente adecuado para la detección múltiple de oligonucleótidos de longitud idéntica o similar, incluyendo, por ejemplo, moléculas de ARN regulador pequeño, tales como, por ejemplo, micro-ARN, oligonucleótidos terapéuticos tales como ARNip, oligonucleótidos de antisentido u oligonucleótidos señuelo.

En el contexto de la presente invención, los términos "detección" o "detectar" en general significan visualizar, analizar y/o cuantificar la molécula de detección hibridada - resto oligonucleotídico de interés. En particular, el término "detectar" se refiere a cualquier método conocido en la técnica que sea aplicable para detectar moléculas marcadas de forma fluorescente mediante lectura de fluorescencia.

La expresión "molécula de detección - resto/restos oligonucleotídicos", como se usa en este documento, se refiere al complejo compuesto de la molécula de detección marcada de forma fluorescente, preferiblemente un ácido peptidónucleico hibridado con su secuencia diana oligonucleotídica complementaria. Un molécula de detección - resto oligonucleotídico de acuerdo con la presente invención, por tanto, se refiere a una molécula bicatenaria, o una estructura de doble hélice. Durante la cromatografía de intercambio aniónico, las moléculas bicatenarias se separan de las moléculas de detección no hibridadas libres que eluyen en el volumen evacuado del sistema de HPLC. La separación y, por tanto, la purificación de la molécula de detección - restos oligonucleotídicos de acuerdo con la presente invención se ejemplifica además por los ejemplos de la presente invención. En el contexto de la presente invención, la molécula de detección - resto/restos oligonucleotídicos preferiblemente se refiere a dobles hélices compuestas de ácidos peptidónucleicos marcados de forma fluorescente y sus secuencias diana oligonucleotídicas respectivas derivadas de la muestra biológica a analizar.

La expresión "lectura de fluorescencia cuantitativa" en general significa todos los tipos de métodos de imágenes conocidos en la técnica que son adecuados para visualizar, detectar, analizar y/o cuantificar los oligonucleótidos de interés a partir de una muestra cuando hibridan con su molécula de detección respectiva. La lectura de fluorescencia cuantitativa de acuerdo con la presente invención incluye una comparación cuantitativa de las alturas de los picos, las anchuras de picos y/o las áreas de los picos con un patrón interno como se describe en este documento o por comparación con un patrón externo en forma de una curva de calibración externa. La lectura fluorescente cuantitativa de acuerdo con la presente invención se ejemplifica, por ejemplo, en las figuras 8 a 13 de los ejemplos.

El método de la presente invención puede aplicarse satisfactoriamente además para detectar al menos tres oligonucleótidos de interés en paralelo a partir de una muestra. Es decir, en una realización preferida, el método de la presente invención se aplica para detectar múltiples oligonucleótidos de la misma longitud en paralelo en una configuración experimental, tales como, por ejemplo, tres, cuatro, cinco, seis, siete, ocho, nueve o diez oligonucleótidos distintos en paralelo. En este contexto, los oligonucleótidos diana de interés pueden ser de longitud idéntica o similar, o ambas. Es decir, si se detectan varios oligonucleótidos diana distintos de interés en paralelo por el método de la presente invención, tal como, por ejemplo, un total de siete oligonucleótidos diana distintos, cuatro de estos oligonucleótidos diana pueden tener longitudes idénticas mientras que los tres oligonucleótidos restantes de interés pueden ser de longitud similar, es decir, varían en las longitudes en uno o más nucleótidos, preferiblemente en cinco nucleótidos como máximo.

Por consiguiente, en otra realización preferida, el método de la invención es para detectar de forma cuantitativa tres, cuatro, cinco, seis, siete, ocho, nueve o diez oligonucleótidos distintos en paralelo a partir de una muestra biológica.

Preferiblemente, al menos dos oligonucleótidos distintos de la misma longitud están compuestos de nucleótidos de ADN o ARN. Es decir, los al menos tres oligonucleótidos distintos a detectar son preferiblemente oligonucleótidos de ADN o ARN.

Más preferiblemente, los al menos tres oligonucleótidos distintos de la misma longitud se seleccionan del grupo que consiste en miARN (miARN), ARN interferentes pequeños (ARNip), ARN activadores cortos (ARNac), oligonucleótidos señuelo, oligonucleótidos de antisentido, aptámeros y espiegélmeros.

Los términos "miARN" o "micro-ARN", que igualmente se usan en el contexto de la presente invención, en general se refieren a una molécula de ARN de longitud corta que se expresa de forma endógena dentro de una célula. En particular, el término "miARN" se refiere a un ARN monocatenario de aproximadamente 20 a 25 nucleótidos de longitud que se genera a partir de una molécula precursora con forma horquilla endógena de aproximadamente 70 nucleótidos de longitud. Los genes que codifican los miARN se encuentran en los genomas de seres humanos, animales, plantas y virus, respectivamente.

La expresión "ARN interferente pequeño" o "ARNip" en general significa una molécula de ARN que se produce tras el suministro exógeno de una molécula de ARNbc en una célula, tras la expresión transgénica de ARNbc largo, o que se introduce en una célula por transferencia génica, transfección celular o transducción celular, o que se expresa de forma endógena en una célula. El término "ARNip" también significa una molécula de ARN regulador corto que está implicada en la interferencia de ARN y el silenciamiento génico, preferiblemente provocando la degradación de un transcrito de ARN diana. Un ARN interferente pequeño puede ser un ARN monocatenario o puede ser un ARN

bicatenario que consiste en dos hebras de ARN separadas, es decir, una hebra codificante y una no codificante. Los ARN interferentes pequeños en general son de 18-30 nucleótidos de longitud.

Un "ARN activador corto" o "ARNac" en general se refiere a cualquier tipo de molécula de ARN bicatenario (ARNbc) que pueda abordar secuencias en promotores génicos, induciendo de este modo la expresión génica diana en un fenómeno también mencionado como activación transcripcional inducida por ARNbc. Es decir, los ARNac son conocidos para los expertos en la materia como ARNbc pequeños que inducen la actividad transcripcional en células humanas abordando regiones promotoras (véase, por ejemplo, Li *et al.*, 2006, Proc Natl Acad Sci USA 103: 17337 - 17342; Janowski *et al.*, 2007, Nat Chem Biol 3: 166-173).

La expresión "oligonucleótido señuelo" en general se refiere a cualquier tipo de agente de antisentido que permite la inhibición específica de la función del factor de transcripción en células vivas. Preferiblemente, los oligonucleótidos señuelo son fragmentos sintéticos cortos de ADN o ARN que se parecen y/o imitan a secuencias complementarias de ácidos nucleicos o proteínas (tales como, por ejemplo, factores de transcripción), evitando de ese modo que los factores de transcripción se unan a las regiones promotoras del gen diana.

La expresión "oligonucleótido de antisentido", como se usa en este documento, significa cualquier tipo de oligonucleótido de ADN o ARN con una secuencia complementaria a la secuencia de una molécula de ARN específica de interés. Tras la hibridación con su secuencia diana, los oligonucleótidos de antisentido pueden inhibir específicamente la expresión de la diana de ARNm con la consecuencia de inducir un bloqueo en la transferencia de información genética del ADN a la proteína. Un oligonucleótido de antisentido de acuerdo con la presente invención también se refiere a cualquier oligonucleótido que inhiba la expresión génica mediante hibridación con una secuencia diana, activando de ese modo la escisión enzimática por la RNasa H. Los oligonucleótidos de antisentido son bien conocidos en la técnica como agentes terapéuticos o como herramientas para estudiar la función génica (para una revisión, véase, por ejemplo, Dias y Stein, 2002, Molecular Cancer Therapeutics Vol. 1, 347 - 355).

En el contexto de la presente invención, un "aptámero" en general se refiere a todos los tipos de moléculas oligonucleotídicas que se unen a una molécula diana específica. Los aptámeros se crean habitualmente por selección de una combinación grande de secuencias aleatorias, pero también existen aptámeros naturales. El término "aptámero", como se usa en este documento también incluye aptámeros de ácido nucleico que se han manipulado mediante rondas repetidas de selección *in vitro* o, de forma equivalente, SELEX (evolución sistemática de ligandos por enriquecimiento exponencial) para que se unan a diversas dianas moleculares tales como moléculas pequeñas, proteínas, ácidos nucleicos e incluso células, tejidos y organismos. Los aptámeros son útiles en aplicaciones biotecnológicas y terapéuticas ya que ofrecen propiedades de reconocimiento molecular que rivalizan con las de los anticuerpos. Además de su reconocimiento discriminado, los aptámeros ofrecen ventajas sobre los anticuerpos ya que pueden manipularse completamente en un tubo de ensayo, se producen fácilmente por síntesis química, poseen propiedades de almacenamiento deseables y provocan poca o ninguna inmunogenicidad en aplicaciones terapéuticas.

Un "espiegélmero", en general significa un aptámero de ácido L-ribonucleico o un aptámero de L-ARN. Los espiegélmeros son molécula de tipo ARN compuestas de unidades de L-ribosa. Los espiegélmeros son oligonucleótidos artificiales que reciben su nombre por ser una imagen especular de oligonucleótidos naturales. Los espiegélmeros, o como alternativa, los aptámeros de L-ARN son una forma particular de aptámeros. Debido a sus L-nucleótidos, son muy resistentes a la degradación por nucleasas. Los espiegélmeros se consideran fármacos terapéuticos potenciales que se ensayan de forma rutinaria en ensayos clínicos.

Como ya se ha descrito, la carga o cargas superficiales diferentes de las moléculas de detección empleadas en el contexto de la presente invención tienen que diseñarse de modo que, tras la hibridación con sus secuencias diana, puedan alterar la afinidad de unión de los oligonucleótidos diana respectivos de la misma longitud en el contexto de cromatografía de líquidos de alto rendimiento de intercambio aniónico (AEX-HPLC), en particular cuando se aplican a una columna de cromatografía y posteriormente se separan por elución de la columna. El número de modificación o modificaciones químicas adicionales en la molécula de detección adecuada o necesaria para desplazar la carga superficial global del oligonucleótido diana a un intervalo cargado más positivo o negativo de cargas superficiales puede decidirse en una base de caso por caso que depende de las moléculas diana de interés a detectar. En general, las al menos tres moléculas de detección empleadas en el contexto de la presente invención pueden comprender varias y diferentes cargas superficiales de todos los tipos de grado, incluyendo cargas adicionales neutras, adicionales positivas, adicionales negativas, múltiples adicionales positivas y/o múltiples adicionales negativas.

Es decir, las moléculas de detección de la invención, preferiblemente los ácidos peptidonucleicos, pueden diferir entre sí en una, dos, tres, cuatro, cinco, seis, siete, ocho, nueve, diez, once, doce o más cargas superficiales positivas, o en una, dos, tres, cuatro, cinco, seis, siete, ocho, nueve, diez, once, doce o más cargas superficiales negativas, o en cualquier combinación de estas alternativas. Las combinaciones de diferentes cargas superficiales empleadas en el contexto de la presente invención para separar satisfactoriamente los oligonucleótidos diana de la misma longitud se describen adicionalmente en la sección de ejemplos de la presente invención, en particular en las figuras 3, 5, y 10 a 13, incluyendo las tablas 3 y 5.

5 Por consiguiente, de acuerdo con la presente invención, las diferentes cargas superficiales de las al menos tres moléculas de detección se seleccionan del grupo de cargas neutras, negativas y positivas, preferiblemente seleccionadas de una combinación de cargas neutras y negativas, neutras y positivas y/o negativas y positivas, más preferiblemente seleccionadas de múltiples cargas negativas, múltiples cargas positivas o cualquier combinación de las mismas.

10 Es decir, en una realización preferida, las diferentes cargas superficiales de las al menos tres moléculas de detección, preferiblemente de los al menos tres ácidos peptid nucleicos, se seleccionan del grupo de neutras, seis cargas negativas adicionales y cinco cargas positivas adicionales. La separación de al menos tres oligonucleótidos distintos en paralelo a partir de una muestra usando cromatografía de líquidos de alto rendimiento de intercambio aniónico (AEX-HPLC) y las moléculas de detección con esta selección de cargas superficiales se ejemplifica, por ejemplo, en la figura 3, figura 5 y tabla 3.

15 Igualmente se prefiere que las diferentes cargas superficiales de las al menos tres moléculas de detección, preferiblemente de los al menos tres ácidos peptid nucleicos, se seleccionen del grupo de neutras, cuatro cargas negativas adicionales y ocho cargas negativas adicionales. La separación de al menos tres oligonucleótidos distintos en paralelo usando cromatografía de líquidos de alto rendimiento de intercambio aniónico (AEX-HPLC) y las moléculas de detección con esta selección de cargas superficiales se ejemplifica, por ejemplo, en la figura 11, figura 12, figura 13 y tabla 5.

20 Igualmente se prefiere cualquier combinación de diferentes cargas superficiales como se resumen anteriormente. Es decir, se prevé cualquier combinación de moléculas de detección con diferentes cargas superficiales que proporcionen una separación suficiente y deseablemente alta por cromatografía de intercambio aniónico durante la elución de moléculas diana particulares y puede aplicarse en el contexto de esta invención, incluyendo la combinación de cargas superficiales neutras con múltiples negativas y/o múltiples positivas, o la combinación de múltiples cargas negativas con múltiples cargas superficiales positivas, o cualquier combinación de múltiples cargas positivas o, como alternativa, de múltiples carga superficiales negativas en solitario.

25 La expresión "múltiples cargas", como se usa en este documento, en general significa la presencia de dos, tres, cuatro, cinco, seis, siete u ocho cargas negativas y/o positivas adicionales, es decir, una diferencia en la carga neta en forma de dos, tres, cuatro, cinco, seis, siete u ocho cargas negativas y/o positivas. Preferiblemente, "múltiples cargas" de acuerdo con la presente invención también puede incluir una mayor diferencia en la carga neta de las moléculas de detección respectivas, tales como, por ejemplo, nueve, diez, once o doce cargas positivas y/o negativas adicionales.

30 Es evidente para los expertos en la materia que las diferentes cargas superficiales de las moléculas de detección empleadas en el contexto de la presente invención tienen que diseñarse de modo que la separación de los oligonucleótidos de interés por cromatografía de intercambio aniónico pueda realizarse a resolución suficientemente alta, es decir, que las afinidades de unión de las respectivas moléculas diana, en complejo con sus respectivas moléculas de detección complementarias, se alteren de tal modo que las secuencias dianas se separen de forma distintiva entre sí en el perfil de elución. Es decir, se prevé que las moléculas de detección, en particular los ácidos peptid nucleicos de la presente invención puedan comprender todos los tipos de diferentes combinaciones de modificaciones químicas que son adecuadas para alterar la carga global superficial de la molécula en consecuencia. Es decir, las al menos tres moléculas de detección, preferiblemente los al menos tres ácidos peptid nucleicos de la presente invención pueden comprender cargas neutras en combinación con varias cargas positivas y/o varias cargas negativas. Se prevé cada combinación de combinación química que es adecuada para proporcionar un perfil de separación bioquímico de alta resolución y puede aplicarse en el contexto de la presente invención. La separación cromatográfica de oligonucleótidos de la misma longitud por cromatografía de intercambio aniónico a alta resolución mediante el uso de ácidos peptid nucleicos con cargas superficial global neutra, positiva y negativa se describe, por ejemplo, en detalle en la sección de ejemplos, en particular en la figuras 10 a 13.

35 De acuerdo con la presente invención, la carga o cargas superficiales negativas se caracterizan por la presencia de al menos dos restos de aminoácido cargados negativamente incorporados o modificaciones de estructura de aminoglicina, preferiblemente en las que los restos de aminoácido cargados negativamente están en forma de ácidos glutámicos.

40 De acuerdo con la presente invención, la carga o cargas superficiales positivas se caracterizan por la presencia de al menos dos restos de aminoácido cargados positivamente incorporados o modificaciones de estructura de aminoglicina, preferiblemente en las que el resto de aminoácido cargado positivamente está en forma de lisina.

45 El ácido glutámico y la lisina son ejemplos preferidos de aminoácidos cargados que pueden usarse como modificación química para incorporar una o más cargas positivas o negativas adicionales en los ácidos peptid nucleicos, respectivamente. Otros aminoácidos que pueden cambiar la carga superficial global de la molécula de detección, en particular del ácido peptid nucleico, se prefieren igualmente. Son bien conocidos en la técnica aminoácidos de diferentes cargas y son de conocimiento común para los expertos en la materia.

Igualmente se prefiere que las cargas positivas y/o negativas adicionales se incorporen en la estructura de la molécula de detección, en particular en la estructura del ácido peptidonucleico mediante una o más modificaciones de la estructura de aminoglicina, preferiblemente mediante la posición gamma de la unidad de aminoglicina.

5 En una realización preferida, las modificaciones de aminoácido pueden combinarse con modificaciones de la estructura de aminoglicina.

Es decir, en una realización preferida, las al menos tres moléculas de detección, preferiblemente los al menos tres ácidos peptidonucleicos, comprenden modificaciones químicas en forma de aminoácidos cargados adicionalmente (cargados positivamente o negativamente, o ambos), modificaciones químicas en forma de grupos cargados adicionales unidos a la estructura de aminoglicina, preferiblemente mediante la posición gamma (cargada positivamente o negativamente, o ambas) o cualquier combinación de las mismas. En esta realización, la carga neta del ácido peptidonucleico es el criterio importante sobre el que se decide el grado de modificación química. Los ejemplos de ácidos peptidonucleicos modificados de acuerdo con la presente invención se ejemplifican adicionalmente en los ejemplos.

En el contexto de la presente invención, la expresión "formar una mezcla de hibridación" en general significa proporcionar condiciones en las que la molécula de detección marcada de forma fluorescente de la invención pueda hibridar con su secuencia oligonucleotídica diana, es decir, condiciones en que la molécula de detección pueda unirse a su secuencia diana. La hibridación entre las al menos tres moléculas de detección y sus al menos tres secuencias diana oligonucleotídicas distintas incluye la formación de pares de bases complementarias que se definen por enlace de hidrógeno e interacciones hidrófobas en equilibrio. Es decir, la hibridación y separación de las dos hebras complementarias dependen de una diversidad de factores, incluyendo temperatura, concentraciones de sal, pH, la naturaleza de las sondas y las moléculas diana, y la composición de la solución de hibridación. Las condiciones que dan lugar a una hibridación satisfactoria de acuerdo con la presente invención también incluyen el uso de tampón de hibridación que contiene reactivos para maximizar la formación de doble hélice y para inhibir la unión no específica de la molécula de detección respectiva con secuencias inespecíficas.

En el contexto de la presente invención, también se ha descubierto que formar una mezcla de hibridación en condiciones parciales de desnaturalización puede ser ventajoso por que la degradación de los restos hibridados se reduce significativamente. Por consiguiente, en una realización preferida, la mezcla de hibridación se forma en condiciones desnaturalizantes. En particular, la hibridación en condiciones desnaturalizantes de acuerdo con la presente invención puede realizarse en presencia de agentes desnaturalizantes, incluyendo, aunque sin limitación, urea, formalina, dimetilformamida (DMF), N-metil-2-pirrolidona (NMP), dimetilsulfóxido (DMSO) y tiocianato de guanidinio. La hibridación en condiciones parciales de desnaturalización se ejemplifica además por los ejemplos, incluyendo la figura 5.

Por consiguiente, en una realización preferida, la mezcla de hibridación se forma en presencia de urea a una concentración de 1 M a 5 M, más preferiblemente en presencia de urea a una concentración de 2 M a 4,5 M.

En el contexto de la presente invención, se ha descubierto además que la cromatografía de intercambio aniónico a una temperatura aumentada provoca perfiles de separación mejorados. La elución de los restos hibridados a altas temperaturas se posibilita debido a la estabilidad mejorada de las dobles hélices de ácido peptidonucleico - diana. La elución del ácido peptidonucleico hibridado - restos oligonucleotídicos a temperaturas aumentadas de acuerdo con la presente invención se ejemplifica además en la sección de ejemplos.

Por tanto, en el contexto de la presente invención, La cromatografía de líquidos de alto rendimiento de intercambio aniónico (AEX-HPLC) en la etapa c) se realiza preferiblemente a una temperatura de 30 °C a 75 °C, preferiblemente a una temperatura de 40 °C a 55 °C, más preferiblemente a una temperatura de 50 °C.

Además, la detección de la molécula de detección hibridada - restos oligonucleotídicos se realiza por lectura fluorescente cuantitativa. La lectura fluorescente cuantitativa de acuerdo con la presente invención implica el uso de patrones internos o externos. La lectura fluorescente cuantitativa mediante el uso de patrones internos se ha descrito en el contexto de la presente invención. Como alternativa, e igualmente preferido es que la lectura fluorescente cuantitativa implique el uso de patrones externos en forma de una comparación con curvas de calibración externas.

Por consiguiente, en una realización preferida, la lectura fluorescente cuantitativa de la etapa d) se caracteriza por la comparación de las señales fluorescentes de la molécula de detección hibridada - restos oligonucleotídicos con el patrón interno o con un patrón externo en forma de una curva de calibración externa.

Preferiblemente, la curva de calibración externa se obtiene de una serie de dilución de moléculas diana de concentración o concentraciones conocidas o de peso o pesos moleculares conocidos que se tratan en condiciones idénticas que las muestras de interés, en particular por hibridación de las moléculas diana con una molécula de detección marcada de forma fluorescente.

65

En este contexto, la molécula de detección marcada de forma fluorescente se selecciona preferiblemente del grupo que consiste en ácidos peptidonucleicos marcados de forma fluorescente, oligómeros morfolino de fosfordiamidato (PMO) y Ugimer.

5 Además, la curva de calibración externa de acuerdo con la presente invención se genera preferiblemente por diluciones en serie de al menos tres, preferiblemente cinco concentraciones diferentes de una mezcla que comprende la molécula diana y su molécula de detección marcada de forma fluorescente respectiva a concentraciones equimolares. La lectura fluorescente cuantitativa mediante la comparación de señales fluorescentes con una curva de calibración externa se ejemplifica por los ejemplos de la presente invención tal como, por ejemplo, en la figura 9.

10 En este contexto, la molécula de detección marcada de forma fluorescente en general se sintetiza para que acople con una secuencia de nucleótidos de interés y pueda usarse para detectar, analizar y/o visualizar dicha secuencia de nucleótidos a nivel molecular. Será evidente para los expertos en la materia que la molécula de detección de la presente invención tiene una longitud adecuada para proporcionar la especificidad requerida para la hibridación con su molécula diana. La molécula de detección está compuesta preferiblemente de al menos 10 nucleótidos, más preferiblemente de al menos 15 nucleótidos y preferiblemente comprende al menos un resto fluorescente en forma de un marcador fluorescente.

15 Se divulga un kit, que comprende (i) al menos dos moléculas de detección complementarias a al menos dos oligonucleótidos distintos de la misma longitud de interés, en el que cada molécula de detección está marcada con al menos un resto fluorescente, y en el que las moléculas de detección se caracterizan por diferentes cargas superficiales; y (ii) una mezcla de hibridación, en la que la mezcla de hibridación puede contener proteinasa K y un tampón de digestión de proteinasa K.

20 Las moléculas de detección del kit pueden seleccionarse del grupo que consiste en ácidos peptidonucleicos (PNA), oligómeros morfolino de fosfordiamidato (PMO) y Ugimer. Las moléculas de detección del kit pueden estar en forma de ácidos peptidonucleicos.

25 La expresión "mezcla de hibridación", como se usa en este documento, en general se refiere a cualquier tipo de solución acuosa, tampón o líquido que permita la suspensión de muestras biológicas, incluyendo preferiblemente la suspensión de las moléculas de detección proporcionadas y/o cualquier molécula marcada de forma fluorescente adicional. La mezcla de hibridación proporciona condiciones acuosas adecuadas para hibridar las moléculas de detección con sus secuencias diana respectivas y puede, por lo tanto, contener cualquier tipo de sal o sistema tamponante a un valor de pH particular, tal como, por ejemplo, pH 7 u 8.

30 Es obvio para un experto en la materia que el kit puede comprender además una diversidad de componentes convencionales tales como, por ejemplo, tampones y/o reactivos para detener una reacción particular. Los expertos en la materia podrán ajustar los componentes del kit al uso pretendido predominante que depende, por ejemplo, del sistema de detección, las células y/o tejidos examinados, la secuencia diana de los oligonucleótidos a detectar, el marcador o marcadores fluorescentes, etc.

35 El kit puede comprender al menos dos moléculas de detección que están marcadas cada una con al menos un resto fluorescente, en el que el resto fluorescente tiene la misma identidad. Por consiguiente, las al menos dos moléculas de detección del kit pueden estar marcadas cada una con el mismo resto fluorescente, que puede ser seleccionarse del grupo que consiste en, aunque sin limitación, Atto 425, Atto 520 y Atto 610. El uso de restos fluorescentes idénticos tiene la ventaja de que la lectura fluorescente cuantitativa puede realizarse a únicamente una longitud de onda que no solamente facilita la configuración experimental, sino que también proporciona una base mejorada para la comparación cuantitativa y la lectura fluorescente.

40 Sin embargo, las al menos dos moléculas de detección del kit pueden estar marcadas cada una con al menos dos restos fluorescentes de la misma identidad. Además, las al menos dos moléculas de detección pueden estar marcadas cada una con más de dos restos fluorescentes de la misma identidad, tal como, por ejemplo, con al menos tres, cuatro, cinco o seis restos fluorescentes de la misma identidad.

45 Como alternativa, el kit puede comprender al menos dos moléculas de detección distintas complementarias a al menos dos oligonucleótidos distintos de la misma longitud de interés, en el que las moléculas de detección están marcadas cada una con al menos un resto fluorescente de diferente identidad, tal como, por ejemplo, Atto 425 y Atto 610, Atto 425 y Atto 520 o, como alternativa, Atto 520 y 610. Debe entenderse por los expertos en la materia que la elección de la identidad de los diferentes marcadores fluorescentes dependerá de la configuración experimental individual.

50 Además, las al menos dos moléculas de detección pueden estar marcadas cada una con al menos un resto fluorescente, con al menos dos restos fluorescentes, de diferente identidad.

55 El kit puede comprender varias moléculas de detección marcadas de forma fluorescente diferentes en caso de que se prevea detección múltiple de una diversidad de oligonucleótidos diana distintos. Es decir, el kit puede comprender tres, cuatro, cinco, seis, siete, ocho, nueve o diez moléculas de detección diferentes para la detección cuantitativa paralela

de al menos tres, cuatro, cinco, seis, siete, ocho, nueve o diez oligonucleótidos distintos de la misma longitud. El kit puede comprender incluso más de 10 moléculas de detección diferentes para la detección cuantitativa paralela de incluso más de 10 oligonucleótidos diana diferentes. Es evidente para los expertos en la materia que el marcador o marcadores fluorescentes se eligen para la mejor práctica experimental, es decir, los marcadores fluorescentes pueden ser idénticos o diferentes, o ambos, lo que pueda ser adecuado para una resolución cromatográfica óptima y la separación de una selección particular de dianas distintas de interés.

El kit puede comprender además al menos una molécula marcada de forma fluorescente complementaria a un sitio de unión de las al menos dos moléculas de detección, en las que este sitio de unión no está implicado en la unión a la secuencia diana. Es decir, las al menos dos moléculas de detección se diseñan de tal manera que abarquen al menos un sitio de unión adicional para la al menos una molécula marcada de forma fluorescente, en la que este sitio de unión no es complementario a ninguna secuencia diana de interés. Por consiguiente, las al menos dos moléculas de detección pueden contener un sitio de unión que no está implicado en la unión a la secuencia diana. Además, las al menos dos moléculas de detección pueden estar marcadas con el mismo resto fluorescente que la molécula marcada de forma fluorescente.

La expresión "molécula marcada de forma fluorescente", como se usa en este documento, en general significa cualquier tipo de molécula con carga superficial neutra que pueda hibridar con un sitio de unión ubicuo particular de las moléculas de detección usadas en el ensayo particular. La hibridación de una molécula marcada de forma fluorescente adicional tiene como objetivo multiplicar la señal fluorescente generada por las moléculas de detección respectivas. En este contexto, La molécula marcada de forma fluorescente se selecciona preferiblemente del grupo que consiste en, aunque sin limitación, ácidos peptid nucleicos, oligómeros morfolino de fosfordiamidato (PMO) y Ugimer.

Mediante el uso de una o más moléculas marcadas de forma fluorescente adicionales, la sensibilidad del método descrito en este documento puede aumentarse significativamente. El uso de una o más moléculas marcadas de forma fluorescente adicionales es particularmente adecuado para detectar oligonucleótidos de interés de baja abundancia. Preferiblemente, la molécula o moléculas marcadas de forma fluorescente adicionales se diseñan de modo que la unión tenga lugar en un sitio de unión particular de la molécula de detección respectiva, preferiblemente del ácido o ácidos peptid nucleicos respectivos, que no está implicado en la unión de la secuencia diana oligonucleotídica particular de interés. Este sitio de unión puede estar en forma de un tramo de nucleótidos que está diseñado de una manera que posibilita la renaturalización y/o la hibridación de la molécula o moléculas marcadas de forma fluorescente adicionales complementarias. En el contexto de la presente invención, el sitio de unión puede estar compuesto de aproximadamente 10 a 20 nucleótidos o más, y puede revelar cualquier secuencia que se considere apropiada para establecer emparejamiento de bases complementarias con una molécula oligonucleotídica de interés. El sitio de unión preferiblemente no se refiere a la secuencia de los oligonucleótidos a detectar. Las secuencias de sitios de unión a cebador universal tales como secuencias palindrómicas son bien conocidas para los expertos en la materia y pueden, por ejemplo, obtenerse de bases de datos públicas incluyendo la genoteca del NCBI (National Center for Biotechnology Information, Maryland, EE. UU.).

En principio, el uso de dicha molécula marcada de forma fluorescente para aumentar la sensibilidad de la lectura fluorescente generada por el uso de las moléculas de detección como se define en este documento también es aplicable y se prevé en el contexto del método de la presente invención. Por tanto, en una realización preferida, el método de la presente invención comprende además la etapa de añadir una molécula marcada de forma fluorescente a la muestra biológica o a la mezcla de hibridación, en el que la molécula marcada de forma fluorescente es complementaria a un sitio de unión de las al menos tres moléculas de detección que no está implicado en la unión a la diana. En esta realización, las al menos dos moléculas de detección se marcan preferiblemente con el mismo resto fluorescente que la molécula marcada de forma fluorescente.

En un aspecto adicional, la presente invención se refiere al uso de al menos tres moléculas de detección como se define en el contexto de la presente invención para detectar de forma cuantitativa el menos tres oligonucleótidos distintos de la misma longitud en paralelo a partir de una muestra biológica mediante cromatografía de líquidos de alto rendimiento de intercambio aniónico (AEX-HPLC), en el que la detección se realiza preferiblemente como se define por cualquiera de las realizaciones descritas en este documento.

El uso de al menos tres moléculas de detección como se define en el contexto de la presente invención para detectar de forma cuantitativa al menos tres oligonucleótidos distintos de la misma longitud en paralelo a partir de una muestra biológica mediante cromatografía de líquidos de alto rendimiento de intercambio aniónico (AEX-HPLC) es particularmente adecuado en el contexto de fines de diagnóstico, tales como, por ejemplo, para el diagnóstico de una enfermedad particular que discurre con un aumento o una disminución de una o más secuencias diana particulares que, a su vez, pueden representar un biomarcador para el diagnóstico de una enfermedad particular.

Por tanto, en una realización preferida, el uso de las al menos tres moléculas de detección distintas como se define en este documento es con fines de diagnóstico, en particular para diagnosticar una enfermedad, más en particular para diagnosticar enfermedades renales tales como, por ejemplo, lesión renal aguda.

El uso de al menos tres oligonucleótidos distintos para la detección cuantitativa de al menos tres secuencias diana oligonucleotídicas de interés en el contexto de fines de diagnóstico, en particular la detección cuantitativa de secuencias diana particulares como biomarcadores para lesión renal aguda, se ejemplifica, por ejemplo, en la figura 13.

5 Las siguientes figuras y ejemplos pretenden ilustrar diversas realizaciones de la presente invención. Por tanto, las modificaciones específicas analizadas en los mismos no deben entenderse como limitaciones del alcance de la invención. Será evidente para los expertos en la materia que pueden hacerse diversos equivalentes, cambios y modificaciones sin alejarse del alcance de la invención y, por tanto, debe entenderse que dichas realizaciones equivalentes están incluidas en este documento.

Figuras

15 Figura 1 A. Representación gráfica de una modificación gamma con lisina en una estructura de ácido peptidonucleico. Figura 1 B. Representación gráfica del tinte de fluorescencia Atto425 acoplado a cisteína mediante la estructura de anillo maleimida. Figura 1 C. Representación gráfica del tinte de fluorescencia Atto425 acoplado mediante NHS éster y la estructura química del O-conector.

20 Figura 2. Influencia sobre los tiempos de retención por las cargas superficiales de los ácidos peptidonucleicos. Configuración experimental cromatográfica: HPLC sistema 1, columna DNAPac®-100 con una temperatura de columna de 50 °C, tampón pH 8 con un gradiente de un 5-55 % de tampón B en 9 minutos.

25 Figura 3. Comparación de cromatogramas obtenidos de las tres dobles hélices miR16-pos. gamma, miR16-neutro y miR16-negativo. Temperatura de hibridación de 0 °C después de calentar hasta 95 °C y temperatura ambiente (TA), respectivamente. Configuración experimental cromatográfica: HPLC sistema 1, columna DNAPac®-100 con una temperatura de columna de 50 °C, tampón pH 8 con un gradiente de un 5-55 % de tampón B en 9 minutos.

30 Figura 4. Comparación de cromatogramas de miR16-pos. gamma después de 0 h, 5,5 h y 11 h de tiempo de incubación. Configuración experimental cromatográfica: HPLC sistema 1, columna DNAPac®-100 con una temperatura de columna de 50 °C, tampón pH 8 con un gradiente de un 5-55 % de tampón B en 7 minutos e hibridación a 25 °C sin urea.

35 Figura 5. Comparación de configuraciones de hibridación con y sin urea 4,5 M usando miR16-pos. gamma, miR16-neutro y miR16-negativo. Configuración experimental cromatográfica: HPLC sistema 1, columna DNAPac®-100 con una temperatura de columna de 50 °C, tampón pH 8 con un gradiente de un 15-66 % de tampón B en 7 minutos.

40 Figura 6. Comparación de perfiles de cromatografía a diferentes temperaturas de columna usando miR-16 negativo. La cromatografía se realizó a una temperatura de columna de 30 °C, 40 °C, 50 °C, 55 °C y 60 °C, respectivamente. Configuración experimental cromatográfica: HPLC sistema 1, columna DNAPac®-100, tampón pH 8 con un gradiente de un 5-55 % de tampón B en 9 minutos e hibridación a 40 °C.

45 Figura 7. Cromatogramas de miR-16-pos. gamma, miR16-neutro y miR16-negativo. Configuración experimental cromatográfica: HPLC sistema 1, columna DNAPac®-100 con una temperatura de columna de 50 °C, tampón pH 8 con un gradiente de un 15-66 % de tampón B en 7 minutos e hibridación a 25 °C.

50 Figura 8. Cromatogramas de una mezcla de muestra de calibración 1:1:1 con miR-16-positivo gamma, miR16-neutro y miR16-negativo. Configuración experimental cromatográfica: HPLC sistema 1, columna DNAPac®-100 con una temperatura de columna de 50 °C, tampón pH 8 con un gradiente de un 15-66 % de tampón B en 7 minutos e hibridación a 25 °C en presencia de urea 4,5 M.

55 Figura 9 A. Curva de calibración de miR-16-positivo gamma. Figura 9 B. Curva de calibración de miR-16-neutro. Figura 9 C. Curva de calibración de miR-16-negativo. Configuración experimental cromatográfica en la figura 9 A, 9 B y 9 C, respectivamente: HPLC sistema 1, columna DNAPac®-100 con una temperatura de columna de 50 °C, tampón pH 8 con un gradiente de un 15-66 % de tampón B en 7 minutos e hibridación a 25 °C en presencia de urea 4,5 M.

60 Figura 10. Cromatogramas de miR-16-neutro, miR210-neutro y miR320-neutro obtenidos de tres mediciones independientes. Configuración experimental cromatográfica: HPLC sistema 2, columna DNAPac®-100 con una temperatura de columna de 50 °C, tampón pH 8 con un gradiente de un 15-66 % de tampón B en 7 minutos e hibridación a 25 °C en presencia de urea 4,5 M.

65 Figura 11. Cromatogramas de miR320-neutro, miR16 - 4x negativo y miR210 - 8x negativo. Configuración experimental cromatográfica: HPLC sistema 2, columna DNAPac®-100 con una temperatura de columna de 50 °C, tampón pH 8 con un gradiente de un 15-66 % de tampón B en 7 minutos e hibridación a 25 °C en presencia de urea 4,5 M.

Figura 12. Separación de miR320-neutro, miR16 - 4x negativo y miR210 - 8x negativo en un experimento mediante HPLC. Configuración experimental cromatográfica: HPLC sistema 2, columna DNAPac®-100 con una temperatura de columna de 50 °C, tampón pH 8 con un gradiente de un 15-66 % de tampón B en 7 minutos e hibridación a 25 °C en presencia de urea 4,5 M.

Figura 13. Comparación de cromatogramas de HPLC obtenidos de plasma del sujeto CTL8 del grupo de control y de plasma del sujeto AKT154 con lesión renal aguda. Configuración experimental cromatográfica: HPLC sistema 2 con sensibilidad del nivel de detección en el centro 16x, columna DNAPac®-100 con una temperatura de columna de 50 °C, tampón pH 8 con un gradiente de un 20-60 % de tampón B en 7 minutos e hibridación a 80 °C.

Ejemplos

Los micro-ARN (miARN) son ARN no codificantes monocatenarios cortos que contiene aproximadamente 22 nucleótidos. Tienen función reguladora con profundo impacto sobre muchos procesos biológicos en el desarrollo, diferenciación, proliferación y apoptosis. Muestran un alto potencial en el diagnóstico y tratamiento de muchas enfermedades. En este trabajo, se evaluó la relación entre tres miARN distintos, concretamente miR16, miR210 y miR320 implicados en lesión renal aguda (AKI). El ensayo desarrollado por Roehl *et al.* (documento WO 2010/043512 A1) se mejoró para permitir la detección simultánea de los tres miARN a partir de una matriz biológica. Se usó una preparación de muestras sin etapas de extracción, purificación y amplificación. La preparación de la muestra se basa en una lisis celular inicial con proteinasa K. Para la medición por AEX-HPLC, las muestras se hibridaron con los ácidos peptidonucleicos (PNA) complementarios. Los PNA representan hebras de ADN modificadas cuyas estructuras de fosfato y azúcar, que están cargadas negativamente, se remplazan por la estructura electroneutra de N-(2-aminoetil)-glicina. Los PNA se modificaron con cargas negativas o positivas para permitir la separación de los miARN en una medición de AEX-HPLC. La hibridación de PNA y miARN va seguida de la detección cuantitativa simultánea de los tres miARN en plasma humano por la técnica de AEX-HPLC y detección de fluorescencia. Los resultados mostraron que miR210 y miR320 pueden usarse como biomarcador para lesión renal aguda ya que la relación de miR210 y miR320 cambia en el caso de AKI. Por consiguiente, estos miARN podían usarse como biomarcador en el diagnóstico de lesión renal aguda.

En 2011, Roehl *et al.* desarrollaron un método simplificado para la detección de oligonucleótidos. Este método permitió la separación de metabolitos individuales mediante HPLC (Cromatografía de Líquidos de Alto Rendimiento) usando una preparación de muestra simplificada y rápida sin etapas de extracción, amplificación o purificación. En este ensayo, se realizó una digestión con proteinasa K en presencia de SDS (tampón que contiene dodecilsulfato de sodio) para evitar la degradación de los oligonucleótidos en las muestras biológicas. El SDS, que interfiere con la columna de AEX-HPLC (cromatografía de intercambio aniónico), se precipita en presencia de solución de cloruro de potasio saturada. Posteriormente, se realizó la hibridación del oligonucleótido de interés con un PNA marcado de forma fluorescente complementario. Las dobles hélices formadas se detectan por AEX-HPLC y detección de fluorescencia.

Actualmente, la detección paralela de diferentes oligonucleótidos de longitud similar mediante HPLC es posible únicamente usando moléculas de ácido peptidonucleico con diversos tintes fluorescentes. Como estos revelan diferentes factores de respuesta (sensibilidad de la detección), por lo tanto no es posible depender de una comparación directa de las áreas de pico para analizar las relaciones molares en esa muestra. La modificación de los PNA, tal como, por ejemplo, la introducción de cargas superficiales en alguno de los extremos de la hebra o dentro de la secuencia, proporciona la posibilidad de resolver este problema y detectar varios componentes en paralelo usando únicamente un tinte fluorescente.

1. Diseño de PNA

El ácido peptidonucleico (PNA) puede modificarse por varias técnicas. Por un lado, pueden introducirse cargas superficiales en cualquier extremo de la secuencia, respectivamente, en que la hebra se modifique con aminoácidos, tal como, por ejemplo, lisina o ácido glutámico. Estos aminoácidos tienen cadenas laterales cargadas a un valor de pH particular. Por otro lado, pueden generarse cargas positivas dentro de la secuencia, por ejemplo, por modificación gamma con lisina (véase la figura 1A).

Para poder usar un detector de fluorescencia altamente sensible, el ácido peptidonucleico (PNA) se modifica con un tinte de fluorescencia, tal como, por ejemplo, Atto425 en ambos extremos de la secuencia. Para esto, puede usarse Atto425 tiol-reactivo que está acoplado a las cisteínas terminales usando química de maleimida y mediante el grupo tiol para el resto de la secuencia (véase la figura 1B).

Como alternativa, puede usarse Atto425 amino-reactivo. En esta ocasión, el tinte fluorescente se une empleando química de NHS éster (éster de N-hidroxisuccinimida) mediante el grupo amino de lisina o mediante el O-conector con el resto de la cadena (véase la figura 1C).

Los ácidos peptidonucleicos forman dobles hélices con ADN o ARN complementario que tienen alta especificidad y selectividad mediante emparejamiento de bases de Watson-Crick. Los híbridos de PNA-ADN y PNA-ARN formados

de este modo revelan una alta estabilidad, ya que la repulsión electrostática entre el PNA y el ADN/ARN se evita debido a la estructura neutra del PNA (Egholm *et al.* (1993) *Nature*, 365: 566-568). Además, el ácido peptidonucleico muestra alta estabilidad contra enzimas tales como nucleasa, proteasas y peptidasas (Demidov *et al.* (1994) *Biochemical Pharmacology*, 48: 1310-1313).

5

2. Objetivo del estudio

El objetivo del estudio fue desarrollar adicionalmente el método ya existente de Roehl *et al.* (documento WO 2010/043512). El objetivo fue la detección simultánea de hasta tres miARN, tales como, por ejemplo, miR16, miR210 y miR320, mediante PNA cargados de forma diferente en el contexto del uso de únicamente un tinte fluorescente. Al inicio, la detección de dobles hélices formadas entre miR16 y los PNA modificados de forma diferente se realizó en tampón que está libre de matriz biológica. A este respecto, se usó un PNA neutro, uno cargado negativamente y un PNA modificado en gamma cargado positivamente.

10

Además, tuvo que establecerse un método de HPLC, que permitiera la detección paralela de las tres dobles hélices con un desplazamiento significativo en el tiempo de retención en únicamente una ejecución de HPLC. Posteriormente, se previó la detección de miARN a partir de matrices biológicas tales como plasma humano, usando este método recién establecido, así como prolongando la detección a miR210 y miR320.

15

3. Materiales y métodos

20

3.1 Medición de la densidad óptica

Los coeficientes de extinción de miR16, miR210 y miR320. se determinaron mediante el método del vecino más próximo (Tataurov *et al.* (2008) *Biophysical Chemistry*, 133:60-70), y las concentraciones respectivas se calcularon de acuerdo con la fórmula 1.

25

Fórmula 1: Cálculo de la concentración de miR16, miR210 y miR320, en μM mediante la densidad óptica (DO) con un coeficiente de extinción ϵ_0

30

$$\text{Concentración } [\mu\text{M}] = \frac{DO}{\epsilon_0 \left[\frac{\text{L}}{\text{mol} \times \text{cm}} \right]} \times 1000000$$

A este respecto, se diluyeron soluciones de miARN de concentración original con agua Milli-Q hasta una concentración final de aproximadamente 3 μM , respectivamente. La DO se midió tres veces con un Eppendorf BioPhotometer plus. Para esto, se usaron 200 μl de la solución 3 μM . Se calculó un valor promedio de tres mediciones independientes y la concentración se determinó usando la fórmula 1. La concentración de la solución madre puede determinarse entonces mediante el factor de dilución.

35

3.2 Preparación de muestra para medición de HPLC

La muestra se preparó basándose en la hibridación de los miARN con PNA complementarios. Para analizar miR16, en primer lugar se hizo un tampón de hibridación que estaba libre de matriz biológica. Posteriormente, la hibridación se realizó con plasma humano, y entonces también se realizó hibridación con dos miARN adicionales, miR210 y miR320.

40

3.2.1. Materiales y reactivos

Los materiales y reactivos usados para la preparación de muestra se enumeran en las tablas 1 y 2.

45

Tabla 1: Materiales usados para la hibridación

	Fabricante
Gradiente de Mastercycler	Eppendorf AG
Thermomixer comfort 1,5 ml	Eppendorf AG
miniSpin plus	Eppendorf AG
Twin tec PCR Plate 96	Eppendorf AG
LoBind Tube 0,5 ml	Eppendorf AG
LoBind Tube 1,5 ml	Eppendorf AG

50

55

Tabla 2: Reactivos usados para la hibridación

	Fabricante
Proteinasa K, 50 µg/ml	Epicentre
Solución de cloruro de potasio 3 M	Sigma-Aldrich
Solución de tampón clorhidrato Trizma®; pH 8; 1 M	Sigma-Aldrich
Urea 99,5 %	Roth
Tween 20	Sigma-Aldrich
Agua Milli-Q	Membra Pure Anlage
Solución de lisis tisular y celular	Epicentre

3.2.2 Preparación de soluciones de miARN 0,1 µM y soluciones de PNA 1 µM

5 A partir de las soluciones madre de miARN con una concentración calculada de acuerdo con la fórmula 1, en primer lugar se preparó una solución 1 µM que se diluyó posteriormente en un factor de 1:10. Se usó una solución con acetonitrilo (ACN) al 10 % en volumen y Tween 20 al 0,01 % en volumen como diluyente. Posteriormente, De cada PNA liofilizado (véase la tabla 3) obtenido de Panagene (Core del Sur), se prepararon soluciones madre 25 µM
10 añadiendo una solución con ACN al 10 % en volumen y Tween 20 al 0,01 % en volumen. La solución madre se diluyó con el mismo diluyente en un factor de 1:25 para la hibridación.

Tabla 3: Hebras de PNA modificadas con las secuencias respectivas. C = cisteína, O = O-conector, E = ácido glutámico, K = lisina, Atto425 = tinte fluorescente, t = timina, a = adenina, g = guanina, c = citosina, * = modificación gamma de lisina

PNA	Secuencia
Neutro (SEQ ID NO: 1)	(Atto425)-C-OO-gcc aat att tac gtg ctg c-O-C(Atto425)
Negativo (SEQ ID NO: 2)	(Atto425)-C-EEE-gcc aat att tac gtg ctg c-EEE-C(Atto425)
Pos. Gamma (SEQ ID NO: 3)	(Atto425)-C-OO-gcc* aat* att* tac* gtg* ctg c-O-C(Atto425)

3.2.3 Preparación del lisado sin matriz biológica

15 Inicialmente, se eligió una configuración de hibridación que estaba libre de matriz biológica. La composición del tampón de hibridación depende de un tampón de lisis con proteinasa K precipitado con SDS para células y tejido. Para 10 ml de tampón de lisis, se necesitan 33 µl de proteinasa K y 9967 µl de solución de lisis tisular y celular. El tampón de hibridación entonces se calentó durante 30 minutos a 65 °C y 350 r.p.m. usando una termomezcladora. Posteriormente, la solución se enfrió en hielo. Como el SDS como parte de la mezcla de hibridación dañaría de forma irreversible la columna de intercambio aniónico, se precipitó con 1000 µl de solución de KCl 3 M, y el precipitado entonces se centrifugó durante 15 minutos a 5 °C y 4000 r.p.m. Para uso adicional en la hibridación, el sobrenadante se separó en hielo y se descartó el sedimento de SDS.
20
25

3.2.4 Preparación de lisado con matriz biológica tal como plasma humano

30 Posteriormente, el método se amplió a la detección de miARN de plasma humano. Se adquirió plasma humano, anticoagulado mediante el uso de Na-heparina, de la empresa Dunn Labortechnik GmbH. Antes de que pueda usarse una matriz biológica en el ensayo, tienen que digerirse todas las nucleasa presentes (tales como RNasa A) mediante un tratamiento con proteinasa K en solución de lisis tisular y celular. Para esto, se digirieron 3 ml de plasma con 7 ml de tampón de lisis, que consiste en 2,9 ml de solución de lisis celular y tisular con 33 µl de proteinasa K y 4,1 ml de agua, durante 30 minutos a 65 °C. Posteriormente, el SDS se precipitó como se describe en el punto 3.2.3, se centrifugó y se descartó el sedimento.
35

3.2.5 Hibridación

40 La mezcla de hibridación se configuró de acuerdo con el esquema proporcionado en la tabla 4.

Tabla 4: Configuración de hibridación para 200 µl

ACN al 100 % [µl]	H ₂ O [µl]	PNA 1 µM [µl]	miR 0,1 µM [µl]	Tris 200 mM pH 8 [µl]	Lisado sin matriz biológica/plasma humano [µl]	Urea 8 M [µl]	Volumen total [µl]
20	23,5	4	10	10	20	112,5	200

45 La hibridación se realizó en condiciones variables. Después de un corto calentamiento de la mezcla de hibridación hasta 95 °C durante 5 minutos, la doble hélice entre el PNA y miR16 se formó en hielo. La hibridación a 25 °C se realizó sin ninguna etapa de calentamiento o enfriamiento a temperatura ambiente. En primer lugar, la hibridación se

realizó en ausencia de urea. Además, se ensayó el efecto de la urea en la etapa de hibridación. En esta ocasión, se usó urea en la mezcla de hibridación a una concentración de 2 M y 4,5 M.

3.2.6 Generación de muestras de calibración para mediciones individuales y detección en paralelo

Para la línea de calibración, se usó 0,1 µm de solución de miR16 (véase 3.2.2). Esta solución se diluyó en un factor de 1:5 en seis etapas de dilución posteriores. Se usó una solución con un 10 % en volumen de ACN y un 0,01 % en volumen de Tween 20 como diluyente. La etapa de hibridación se realizó de forma análoga al punto 3.2.5. En esta ocasión, los PNA modificados de forma diferente (véase la tabla 3) se mezclaron con plasma humano en tampón de hibridación. Las etapas de dilución individuales produjeron una fila de concentración de 0,16 a 500 fmol de miARN por 100 µl de inyección. Como este método debe permitir una detección paralela en una configuración experimental de HPLC, la soluciones hibridadas se mezclaron a una relación de 1:1:1.

3.2.7 Preparación de muestra para mediciones individuales y detección en paralelo de dobles hélices tales como miR16-neutro, miR210-neutro y miR320-neutro

La hibridación de los miARN con los PNA complementarios respectivos se realizó como se describe en el párrafo 3.2.5. En primer lugar, se eligieron los PNA complementarios sin modificación y sin ninguna carga. Para esto, se usaron las soluciones de PNA 1 µM y las soluciones de miARN 0,1 µM como se describe en 3.2.2. Para la detección en paralelo, las tres muestras se mezclaron a una relación de 1:1:1 después de hibridación.

3.2.8 Preparación de muestra para mediciones individuales y detección en paralelo de dobles hélices tales como miR320-neutro, miR16-4-x-negativo y miR210-8-x-negativo

Para obtener una mejor separación cromatográfica, se usaron PNA para la siguiente etapa de hibridación que se habían modificado por cargas negativas. En esta ocasión, la complementariedad del PNA con miR16 contenía cuatro cambios negativos, mientras que la complementariedad del PNA con miR210 contenía ocho cargas negativas. Ambos PNA se sintetizaron por la empresa

Tabla 5: Hebras de PNA modificadas con las secuencias correspondientes. C = cisteína, O = O-conector, E = ácido glutámico, K = lisina, Atto425 = tinte fluorescente, t = timina, a = adenina, g = guanina, c = citosina

PNA	Secuencia
miR320-neutro (SEQ ID NO: 4)	(Atto425)-OO-tcg ccc tct caa ccc ag-O-K(Atto425)
miR16-4-x negativo (SEQ ID NO: 5)	(Atto425)-O-EE-gcc aat att tac gtg ctg c-EE-K(Atto425)
miR210-8-x negativo (SEQ ID NO: 6)	(Atto425)-O-EEEE-cag tgt gcg gtg ggc ag -EEEE-K(Atto425)

Panagene, Corea del Sur (véase la table 5).

Para la hibridación, se usaron las soluciones de PNA 1 µM y las soluciones de miARN 0,1 µM como se describe en el párrafo 3.2.2. La hibridación se realizó para cada uno de los miARN como se describe en 3.2.5. Para la detección paralela, las tres mezclas de hibridación se mezclaron a una relación de 1:1:1.

3.3 Establecimiento del método de HPLC

3.3.1 Preparación del tampón

Los materiales y reactivos usados para la preparación de los tampones se muestran en las tablas 6 y 7.

Tabla 6: Materiales usados para la preparación de tampón

	Fabricante
Agitador magnético	RCT basic IKA Werke
Peachímetro 766 Calimatic	Knick
Cilindro medidor	Band Elerna Duran Silber
Filtro de copa superior 0,2 µm membrana PES, estéril	VWR

Tabla 7: Reactivos usados para la preparación de tampón

	Fabricante
Solución de cloruro de sodio, 5 M	AppliChem
Acetonitrilo LiChrosolv®	Merck KGaA
Agua Milli-Q	Membra Pure Anlage
Perclorato de sodio monohidrato, ACS (≥ 98,0 %)	Sigma-Aldrich
Solución de tampón clorhidrato Trizma®; pH 7; 1 M	Sigma-Aldrich
Solución de tampón clorhidrato Trizma®; pH 8; 1 M	Sigma-Aldrich
Pirofosfato de sodio decahidrato, ACS (≥ 98,0 %)	Sigma-Aldrich

5 Preparación de solución madre de perclorato de sodio 5 M: Para la solución de NaClO_4 (perclorato de sodio) 5 M, se pesó un total de 702,30 g $\text{NaClO}_4 \times \text{H}_2\text{O}$ con una masa molar de 1240,46 g/mol y se disolvió en 1 litro de agua. La solución se filtró posteriormente a través de un filtro que tenía un tamaño de poro de 0,2 μm .

Preparación de solución madre de pirofosfato de sodio 0,1 M: Para la solución de $\text{Na}_4\text{P}_2\text{O}_7$ (pirofosfato de sodio) 0,1 M, se pesó un total de 22,3 g $\text{Na}_4\text{P}_2\text{O}_7 \times 10\text{H}_2\text{O}$ con una masa molar de 446,06 g/mol y se disolvió en 500 ml H_2O .

Tampón 1 de HPLC (pH 7)

Tampón A: ACN 30 % en vol., NaCl 100 mM, Tris-HCl 10 mM pH 7
 Tampón B: ACN 30 % en vol., NaCl 900 mM, Tris-HCl 10 mM pH 7
 Tampón C: ACN al 10 % en vol., NaClO_4 4 M

10

Tampón 2 de HPLC (pH 8)

Tampón A: ACN 30 % en vol., NaCl 100 mM, Tris-HCl 10 mM pH 8
 Tampón B: ACN 30 % en vol., NaCl 900 mM, Tris-HCl 10 mM pH 8
 Tampón C: ACN al 10 % en vol., NaClO_4 4 M

3.3.2 Sistema de HPLC

Sistema 1 de HPLC

15

Para el análisis de HPLC en el contexto de establecer el método, se usó una HPLC Dionex Ultimate 3000, que abarca un desgasificador, un tomamuestras automático, un horno de columna y un sistema de bombeo. La detección se realizó usando un detector de fluorescencia RF obtenido de Dionex con una longitud de onda de excitación de 436 nm y una longitud de onda de emisión de 484 nm y con una sensibilidad de detección por defecto del centro 4x.

20

Sistema 2 de HPLC

Para análisis adicional, se usó un sistema de HPLC Dionex Ultimate 3000 con un detector de fluorescencia más sensible RF-20 A xs adquirido de la empresa Shimadzu, con una longitud de onda de excitación de 436 nm y una longitud de onda de emisión de 484 nm y con una sensibilidad por defecto del centro 16x.

25

3.3.3 Resumen de los parámetros ensayados en el contexto del establecimiento del método de HPLC.

Para establecer el método, se usó una columna DNAPac® 100 con una longitud de 250 mm y un diámetro de 4 mm. La temperatura de la columna varió entre 30 °C y 60 °C. Además, se ajustó el sistema de tampón (véase 3.3.1) y el gradiente. El volumen de inyección fue 100 μl y la medición se realizó a un caudal de 1 ml/min.

30

3.4 Determinación de la temperatura de fusión de T_m de los miARN

La temperatura de fusión T_m se define como la temperatura en el punto de inflexión de la curva de fusión, en que la sustancia está presente en monocatenaria al 50 %. El análisis de la temperatura de fusión con respecto a los miARN se realizó midiendo la absorción de UV a 260 nm usando un espectrofotómetro Beckman Counter DU800 UV/Vis. Se preparó una solución 1 μM en solución salina tamponada con fosfato (PBS) para cada miARN. Las muestras se transfirieron a microcubetas de 350 μl y se equilibraron durante tres minutos a 20 °C en el portacubetas antes de calentar hasta 80 °C a 0,5 °C/min. A una temperatura de 80 °C, las muestras se equilibraron durante cinco minutos y posteriormente se enfriaron hasta 20 °C a 0,5 °C/min. La absorción de UV se midió en el intervalo de temperatura de 20 °C a 80 °C a intervalos de 1 °C. La temperatura de fusión se determinó basándose en el máximo de la primera derivada, y esta es la temperatura a la que un 50 % de las moléculas son monocatenarias y un 50 % están estructuradas.

35

40

45

3.5 Detección de miR16, miR210 y miR320 de plasma humano

Considerándolo todo, se analizaron diez muestras de plasma, que se proporcionaron por el grupo del profesor Thum en la Hanover Medical School. Cinco de estas muestras de plasma se obtuvieron de sujetos de un grupo de control, y otras cinco muestras de plasma se obtuvieron de sujetos diagnosticados con una lesión renal aguda. El plasma se trató con tampón de lisis como se describe en el capítulo 3.2.4 y el SDS se precipitó en presencia de solución de cloruro de potasio. Posteriormente, las muestras se hibridaron a 80 °C, como se resumen en el esquema de la tabla 8.

50

55

Tabla 8: Mezclas de hibridación para la detección de miR16, miR210 y miR320 derivados de plasma humano.

ACN al 100 % [μ l]	PNA mezcla 1:1:1 [μ l]	Tris 200 mM pH 8 [μ l]	Plasma [μ l]	Urea 8 M [μ l]	Volumen total [μ l]
20	3	10	70	97	200

Se usaron los PNA de la table 5 para la hibridación. Para las mediciones de HPLC, se eligió el sistema 2 de HPLC equipado con una sensibilidad de detector del centro 16x (véase 3.3.2), y el gradiente se ajustó a un 20-60 % en tampón B en 7 minutos.

4. Resultados

4.1 Concentraciones de miARN

Los coeficientes de extinción de miR16, miR210 y miR320, determinados de acuerdo con el método del vecino más próximo, se resumen en la tabla 9.

Tabla 9: Características de las moléculas diana miR16, miR210 y miR230. U = uracilo, A = adenina, G = guanina, C = citosina, p = 5'fosfato

miARN	Coefficiente de extinción ϵ_0 [L/ (mol*cm)]	Secuencia
miR16 (SEQ ID NO: 7)	226100	5'-pUAGCAGCAGCAGUAAAUAUUGGCG-3'
miR210 (SEQ ID NO: 8)	191700	5'-pAGCCCCUGCCACCGCACACUG-3'
miR320 (SEQ ID NO: 9)	232700	5'-pAAAAGCUGGGUUGAGAGGGGCGA-3'

Para determinar la concentración exacta de los miARN, se midieron sus densidades ópticas respectivas como se describe en el capítulo 3.1. La medición produjo un total de tres valores individuales, de los que se calculó un valor promedio. Basándose en el valor promedio de la densidad óptica y los respectivos coeficientes de extinción teóricos, se calcularon las concentraciones de acuerdo con la fórmula 1 (véase 3.1).

4.2 Optimización de condiciones para hibridación

4.2.1 Influencia de las cargas de PNA sobre la separación cromatográfica

Cuando se usan PNA neutros para la detección de hebras de miARN de longitud similar, no se puede conseguir separación cromatográfica de alta calidad de las dobles hélices. Para evaluar la influencia de cargas positivas y negativas adicionales en los PNA para la separación mediante HPLC, se usaron los siguientes PNA para la detección de miR16: neutro, negativo y positivo gamma (véase la tabla 3).

Estos PNA se hibridaron todos por separado con miR16, como se describe en 3.2.5. Esta etapa de hibridación comprende un corto calentamiento de la solución hasta 95 °C durante 5 minutos, antes de que se forme la doble hélice entre el PNA y miR16 en hielo. Posteriormente, las muestras se inyectaron en la HPLC, y la cromatografía se realizó en condiciones establecidas (véase 4.3.4) a un gradiente un 5-55 % en tampón B en 9 minutos.

Como se muestra en la figura 2, el uso de diferentes cargas superficiales del PNA permitió una separación cromatográfica de estas tres dobles hélices entre miR16 y el PNA complementario respectivo. Además, se observaron picos adicionales en el área del pico principal, provocados por la hidrólisis del anillo maleimida presente en los tintes fluorescentes Atto acoplados, que produjeron cargas negativas adicionales en la doble hélice, que a su vez también influyó en el tiempo de retención.

La formación de semipicos provocó una reducción del análisis cromatográfico y una pérdida en la sensibilidad. Como las alturas de pico disminuyen mientras el área de pico total es similar, la relación de señal a ruido es más pequeña.

La hidrólisis de la estructura de anillo maleimida podría deberse a una temperatura de hibridación que es demasiado elevada, o podría ser el resultado de la composición del tampón de hibridación. Para evaluar adicionalmente estos efectos, se analizó la composición del tampón de hibridación y la influencia de la urea como parte del tampón de hibridación. Como los miARN tienen menor temperatura de fusión en presencia de urea, la etapa de hibridación también puede realizarse a temperaturas inferiores.

4.2.2 Influencia de las condiciones de hibridación en los cromatogramas de HPLC

Para evaluar el efecto de las condiciones de hibridación en los cromatogramas, se hibridó miR16 con PNA cargados de forma diferente en hielo después de que la mezcla se calentara hasta 95 °C y 25 °C, respectivamente. Las condiciones para la hibridación se describen en 3.2.5 y las condiciones para la cromatografía se describen en 4.3.4.

Disminuir la temperatura de hibridación produjo una cantidad significativamente menor de productos de hidrólisis. Por tanto, la división de los picos se minimizó significativamente, lo que a su vez provocó una intensidad de señal aumentada y, por lo tanto, una relación de señal a ruido mejorada (véase la figura 3).

- 5 En la tabla 10, los efectos de las temperaturas de hibridación inferiores se resumen una vez más. Reduciendo la temperatura de hibridación, se evitaba la hidrólisis del anillo maleimida y, por tanto, la generación de picos ensanchados dentro del cromatograma al máximo grado posible. Este efecto se confirma por los tiempos de retención más pequeños, que son mayores debido a las cargas negativas adicionales, cuando el anillo maleimida se hidroliza a 95 °C. En el caso de las áreas de pico principal, el pico ensanchado no se integraba cuando se comparaba con el área de pico total, que está constituido del área de pico principal y el área del pico ensanchado.

Tabla 10: Influencia de las condiciones de hibridación en los cromatogramas de HPLC de miR16-neutro, miR16-negativo y miR16-pos. gamma. $w_{0,5}$ = anchura de pico a mitad de altura

Doble hélice	Tiempo de retención [min]	Área de pico principal [mV*min]	Área de pico total [mV*min]	Área de pico relativa [%]	$w_{0,5}$ [min]	Altura de pico [mV]
Hibridación a 95 °C, 25 min						
miR16-neutro	8,33	4,4361	9,3205	47,60	-*	23,5796
miR16-negativo	9,50	6,0590	14,1564	42,80	0,1238	45,5080
miR16-pos. gamma	7,52	5,0343	10,4466	48,19	0,1622	30,8446
Hibridación a 25 °C, 5 min						
miR16-neutro	8,07	13,3816	15,3831	86,99	0,1053	103,9200
miR16-negativo	9,47	11,7880	15,0773	78,18	0,1132	94,7047
miR16-pos. gamma	7,25	12,3428	14,6106	84,48	0,1027	97,8214
* no analizable						

- 15 Aunque se observó aproximadamente una duplicación del área de pico principal para miR16-negativo a la temperatura de hibridación inferior, se observó un aumento de 2,5 veces para miR16-pos. gamma e incluso se observó un aumento de 3 veces del área de pico principal en el caso de miR16-neutro. Además de un aumento significativo del área de pico principal, también se observó un aumento adicional de la altura de pico. A partir de los datos de la tabla 10, puede observarse que en el caso de la doble hélice entre miR16 y el PNA negativo, la altura del pico incluso se duplicaba.
- 20 Para miR16-neutro, se alcanzó un aumento de 4 veces y para miR16-pos. gamma un aumento de 3 veces de la altura del pico en comparación con una hibridación usando una etapa de calentamiento de 95 °C.

4.2.3 Hibridación en presencia de urea

- 25 En el caso de tiempos de incubación más largos de las muestras dentro del tomamuestras automático, se observó que la hidrólisis de la estructura de anillo maleimida aumentaba. Por lo tanto, se ensayó la adición de urea a concentraciones de 2 M y 4,5 M durante la etapa de hibridación. A modo de comparación, se realizó, por lo tanto, una hibridación adicional en presencia de urea, de acuerdo con el capítulo 3.2.5. Las mezclas de hibridación se midieron posteriormente por el sistema 1 de HPLC (véase 3.3.2) en condiciones establecidas de HPLC (véase 4.3.4) después de 0 h, 5,5 h y 11 h. Para evitar cualquier hidrólisis de las muestras durante estas mediciones, el tomamuestras automático se enfrió hasta 4 °C.

- 35 En el caso de las muestras de miR16-PNA sin urea, se pudo observar un aumento significativo de la hidrólisis de la estructura de anillo maleimida con tiempos crecientes de incubación. Como puede deducirse de la figura 4, pudieron observarse dos picos ensanchados que eran visibles antes y después del pico principal en forma de productos de hidrólisis. El pico ensanchado que descansa antes del pico principal puede ser el resultado de la separación del polifosfato en el extremo 5' de miR16. El otro pico es el anillo de maleimida abierto. Con tiempo de incubación creciente, cada uno de estos picos ensanchado aumenta, lo que a su vez provoca una disminución del área de pico principal.

- 40 Como puede deducirse de la figura 5, estas dos reacciones secundarias podrían evitarse en gran medida en presencia de urea. Una comparación directa de la hibridación en ausencia de urea y en presencia de urea 4,5 M mostró un aumento significativo de la intensidad de la señal en presencia de urea.

- 45 A partir de los valores mostrados en la tabla 11, queda claro el grado al que puede evitarse la reacción de hidrólisis mediante la adición de urea. En el caso de miR16-neutro, la adición de urea 4,5 M a la mezcla de hibridación provoca un aumento del área de pico principal en un factor de 1,1, mientras que en el caso de las otras dobles hélices de miR16-negativo y miR16-pos. gamma, el aumento es en un factor de 1,2. En los tres casos, pudo observarse un aumento de los valores en un factor de 1,2 con respecto a las alturas de los picos. Por tanto, usando urea, podía reducirse significativamente la hidrólisis.

50

Tabla 11: Resultados de hibridación sin urea en comparación con hibridación en presencia de urea 4,5 M $w_{0,5}$ = anchura de pico a mitad de altura

Doble hélice	Tiempo de retención [min]	Área de pico principal [mV*min]	Área de pico total [mV*min]	Área de pico relativa [%]	$w_{0,5}$ [min]	Altura [mV]
Hibridación sin urea						
miR16-neutro	5,38	14,9111	15,9557	93,45	0,1222	97,4115
miR16-negativo	6,43	14,9110	16,3874	90,99	0,1298	93,4842
miR16-pos. gamma	4,69	12,9740	16,7800	77,32	0,1180	97,9023
Hibridación en presencia de urea 4,5 M						
miR16-neutro	5,40	16,3928	16,9169	96,90	0,1195	112,2993
miR16-negativo	6,43	18,2576	18,3925	99,27	0,1263	113,3383
miR16-pos. gamma	4,69	15,5935	18,0915	86,19	0,1177	115,1840

4.2.4 Resumen de los parámetros de hibridación optimizados

5 Los experimentos de hibridación revelaron que, en caso de las dobles hélices entre miR16 y los PNA cargados de forma diferente, la hidrólisis de los anillos maleimida no podía inhibirse completamente reduciendo la temperatura de hibridación hasta 25 °C y añadiendo 4,5 M de urea, pero podía reducirse hasta cantidades grandes.

10 4.3 Optimización del método de HPLC

4.3.1 Optimización de la temperatura de columna

15 Para evaluar la influencia de la temperatura de la columna sobre la resolución cromatográfica, se ensayaron diferentes temperaturas. Para esto, se hibridaron muestras como se describe en el párrafo 3.2.5. La hibridación tuvo lugar a 40 °C. Posteriormente, las muestras se midieron de acuerdo con los parámetros de HPLC como se describe en el párrafo 4.3.4 a una temperatura de 30 °C, 40 °C, 50 °C, 55 °C y 60 °C.

20 La figura 6 muestra la dependencia del área del pico y las alturas de pico de la temperatura de la columna a modo de ejemplo usando miR16-negativo. El aumento de la temperatura de la columna provocó una hidrólisis parcial del anillo maleimida y, de este modo, la formación de cargas negativas adicionales en el PNA. Estos efectos pudieron observarse a temperaturas por encima de 50 °C. El aumento de la temperatura de la columna de 30 °C a 50 °C, sin embargo, provocó un aumento continuo del área de pico principal y la altura del pico. En el contexto de este experimento, pudo observarse una proporcionalidad directa de los tiempos de retención de la temperatura de la columna. Por consiguiente, un aumento de la temperatura de la columna provoca mayores tiempos de retención.

25 Los datos mostrados en la tabla 12 revelan el efecto del aumento de los tiempos de retención debido a una temperatura de columna aumentada. Un aumento de la temperatura de columna de 30 °C a 60 °C provocó un aumento del tiempo de resolución de 8,89 a 9,75 minutos. Se mostró que la temperatura de columna óptima era 50 °C, ya que a esta temperatura, podía conseguirse el área de pico principal más grande de 13,6 mV*min y la altura de pico más grande de 104,9 mV.

35 Tabla 12: Influencia de la temperatura de la columna sobre el tiempo de retención miR16-negativo. $w_{0,5}$ = anchura de pico a mitad de altura.

Doble hélice	Tiempo de retención [min]	Área de pico principal [mV*min]	Área de pico total [mV*min]	Área de pico relativa [%]	$w_{0,5}$ [min]	Altura [mV]
miR16-negativo	temperatura de columna 30 °C					
	8,89	12,7723	19,9405	64,05	0,1297	89,3107
	temperatura de columna 40 °C					
	9,18	12,4783	18,2977	68,20	0,1248	90,2145
	temperatura de columna 50 °C					
	9,46	13,5899	17,0069	79,91	0,1153	104,8613
	temperatura de columna 55 °C					
	9,61	10,5933	14,5225	72,94	0,1155	83,1685
temperatura de columna 60 °C						
9,75	8,2809	11,2102	73,87	0,1098	68,9267	

4.3.2 Optimización del valor de pH

Como el pH influye en el nivel de ionización de las muestras de PNA, y de ese modo en sus tiempos de retención, la optimización del valor de pH fue la siguiente etapa con el objetivo de la separación más óptima de estas tres doble hélices. Para esto, se ensayaron tampones de columna de HPLC con un pH de 7 y pH de 8. El tampón respectivo con un pH de 7 y un pH de 8 se generará como se describe en el párrafo 3.3.1. Posteriormente, las muestras se hibridaron de acuerdo con 3.2.5 y se midieron a estos valores de pH en condiciones de HPLC optimizadas (véase 4.3.4). Estos experimentos mostraron que el aumento del valor de pH de 7 a 8 provocó tiempos de retención aumentados. Aumentando el valor de pH, pudo conseguirse una división de los picos mejorada en todo momento evitando la hidrólisis del anillo maleimida y este modo una mejor intensidad de la señal. Aumentar el valor de pH de 7 a 8 también mejoró la intensidad de la señal. La intensidad de la señal aumentó de 87,3 a 103,9 mV en el caso de miR16-neutro, de 86,3 a 94,7 mV en el caso de miR16-negativo y de 76,3 a 97,8 mV en el caso de miR16-pos. gamma. Al mismo tiempo, pudo observarse un aumento en el área de pico principal (véase la tabla 13). En el caso de miR16-neutro, el área del pico principal aumentó de 12,8 a 13,4 mV*min. En el caso de miR16-negativo, el área del pico principal aumentó de 9,9 a 11,8 y en el caso de miR16-pos. gamma, el área del pico principal aumentó de 11,6 a 12,3 mV*min.

Tabla 13: Influencia del valor de pH sobre los tiempos de retención de miR16-neutro, miR16-negativo y miR16-pos. gamma. $w_{0,5}$ = anchura de pico a mitad de altura

Doble hélice	Tiempo de retención [min]	Área de pico principal [mV*min]	Área de pico total [mV*min]	Área de pico relativa [%]	$w_{0,5}$ [min]	Altura [mV]
pH 7						
miR16-neutro	7,97	12,8299	15,5190	82,67	0,1255	87,2848
miR16-negativo	9,31	9,9024	16,8621	58,73	-	86,3418
miR16-pos. gamma	7,12	11,5928	14,7677	78,50	0,1258	76,3084
pH 8						
miR16-neutro	8,07	13,3816	15,3831	86,99	0,1053	103,9200
miR16-negativo	9,47	11,7880	15,0773	78,18	0,1132	94,7047
miR16-pos. gamma	7,25	12,3428	14,6106	84,48	0,1027	97,8214

4.3.3. Optimización de los gradientes

Después de optimizar el valor de pH, el objetivo fue ajustar el gradiente en consecuencia. En general, un gradiente plano provoca una mejor resolución. Se consiguen intensidades de señal mayores, sin embargo, con gradientes más pronunciados. Los resultados de la optimización del gradiente se muestran en la tabla 14. Inicialmente, El gradiente se realizó con una inclinación de un 5-55 % en tampón B en 9 minutos. Esto provocó tiempos de retención de las tres doble hélices en el intervalo entre 7,25 y 9,47 minutos. Después de ello, la inclinación del gradiente se aumentó de un 5,6 a un 7,3 % por minuto. Aumentando la concentración salina inicial del tampón B de un 5 a un 15 %, pudo minimizarse el tiempo total de la ejecución de 17 a 15 minutos. Los tiempos de retención respectivos estaban en el intervalo de 4,84 a 6,47 minutos.

Tabla 14: Influencia de diferentes gradientes sobre los tiempos de retención de miR16-neutro, miR16-negativo y miR16-pos. gamma

Doble hélice	Tiempo de retención [min]
5-55 % en tampón B en 9 min ($\approx 5,6$ %/min)	
miR16-neutro	8,07
miR16-negativo	9,47
miR16-pos. gamma	7,25
10-70 % en tampón B en 9 min ($\approx 6,7$ %/min)	
miR16-neutro	6,21
miR16-negativo	7,35
miR16-pos. gamma	5,45
15-80 % en tampón B en 9 min ($\approx 7,2$ %/min)	
miR16-neutro	5,42
miR16-negativo	4,85
miR16-pos. gamma	6,47
15-66 % en tampón B en 7 min ($\approx 7,3$ %/min)	
miR16-neutro	5,40
miR16-negativo	4,84
miR16-pos. gamma	6,47

4.3.4. Resumen de condiciones optimizadas de HPLC

La figura 7 muestra el cromatograma de la separación de tres dobles hélices entre miR16-ARN y los tres respectivos PNA cargados de forma diferente. En el volumen evacuado, se demuestra que es necesario un exceso de la señal del PNA aumentado para asegurar que se forma completamente la doble hélice. Estas tres dobles hélices eluyen en el intervalo de 4 y 7,5 minutos. El tampón de ejecución de HPLC tenía un pH de 8, el gradiente tenía una inclinación de un 15-66 % en tampón B en 7 minutos. Esta inclinación del gradiente también reveló la resolución requerida.

4.4 Calibración del método de HPLC

Después de optimizar las condiciones de hibridación y de HPLC, se realizó la calibración del método establecido. Para esto, se hizo una dilución en serie que permitió una calibración en el intervalo de 0,16 a 500 fmol del miARN en la columna (véase 3.2.5). Posteriormente, las muestra se hibridaron a 25 °C. Como el objetivo fue permitir una detección paralela, se midió una mezcla equimolar de las etapas de dilución en serie respectivas que se generaron después de la etapa de hibridación en condiciones de HPLC establecidas (véase 4.3.4). La figura 8 muestra los cromatogramas que se obtuvieron mediante la medición de las diluciones en serie respectivas. Esta figura muestra los cromatogramas de una mezcla 1:1:1 de las concentraciones de dilución en serie respectivas en que se inyectaron de 0,053 a 166,7 fmol. En el caso de inyectar 0,267 fmol de miR16, la relación de señal a ruido (S/N) para miR16-pos. gamma es 2,2. En caso de concentraciones similares de miR16-neutro y miR16-negativo, la relación de señal a ruido es 9,4 y 11,5, respectivamente. Por consiguiente, en caso de miR16-pos. gamma, el límite de detección (LOD) es aproximadamente 0,267 fmol, en el que ya podían definirse la misma cantidad idéntica para las otras dos dobles hélices como el límite de detección (LOD). La cantidad más baja para la calibración de 0,053 fmol no pudo analizarse ya que esta cantidad estaba por debajo del límite de detección.

Las líneas de calibración respectiva se muestran en la figura 9. En el caso de miR16-pos. gamma (figura 9 A), la inclinación es 0,1015 [(mV*min)/fmol] y el factor de correlaciones de R^2 es 0,9993. En esta ocasión, se consiguió una alta precisión, ya que el factor de correlación es casi idéntico con el valor ideal de 1.

La línea de calibración de miR16-neutro se muestra en la figura 9B. En esta ocasión, la inclinación es 0,1254 [(mV*min)/fmol] y el factor de correlación R^2 es 0,9966. La desviación del último punto de calibración de miR16-neutro puede observarse claramente, como ya se muestra en la figura 8. El factor de correlación es 0,9966 y, por lo tanto, inferior en comparación con miR16-pos. gamma. La figura 9C muestra la línea de calibración de miR16-negativo. En esta ocasión, la inclinación es 0,0889 [(mV*min)/fmol]. Con $R^2 = 0,9999$, se consiguió un factor de correlación ya ideal en este caso.

4.5 Detección paralela de miR16-neutro, miR210-neutro y miR320-neutro

Como el acoplamiento del tinte de fluorescencia mediante química de maleimida discurre con una hidrólisis que es difícil de controlar, y no logra conseguirse una represión completa de la hidrólisis, se eligió otro diseño de PNA a continuación, por el que se acopló el tinte de fluorescencia de una manera más estable a los PNA mediante química de NHS.

En la etapa siguiente, deben detectarse miR16, miR210 y miR320 en una ejecución de columna de HPLC. Para esto, las muestras se hibridaron en primer lugar con sus PNA neutros complementarios a 25 °C de acuerdo con el capítulo 3.2.7 y posteriormente se generó una mezcla 1:1:1 de estos tres miARN. Estas muestras entonces se midieron usando el sistema 2 de HPLC (véase 3.3.2) en condiciones establecidas de HPLC (véase 4.3.4).

La figura 10 muestra los cromatogramas de estas tres mediciones individuales en comparación. En esta ocasión, únicamente se observa un mala resolución de miR16-neutro y miR210-neutro. Ambas dobles hélices revelan tiempos de retención similares.

También con una mezcla 1:1:1, no pudo conseguirse una resolución satisfactoria de estas tres dobles hélices, que abarcan el PNA neutro y el miARN respectivo. El cromatograma de la mezcla de dobles hélices es de acuerdo con los picos observados en el cromatograma de cada una de las dobles hélices por separado.

4.6 Detección paralela de miR320-neutro, miR16 - 4x negativo y miR210 - 8x negativo

Para obtener la separación óptima de las tres dobles hélices, tuvieron que usarse PNA recién modificados. Para esto, se analizaron PNA nuevos que son complementarios a miR16 y miR210,. Para obtener un desplazamiento aumentado en el tiempo de retención, el PNA complementario a miR16 se modificó mediante la adición de dos restos de ácido glutámico en cada extremo de la secuencia, respectivamente, que provocó cuatro cargas negativas adicionales. El PNA complementario a miR210 se modificó de una manera similar, pero con ocho cargas negativas. el PNA para miR320 se mantuvo neutro.

Las muestras posteriormente se hibridaron a 25 °C como se describe en el capítulo 3.2.8 y después se generó una mezcla 1:1:1 de estas mezclas de hibridación. Después de ello, Las muestras se midieron usando el sistema 2 de HPLC (véase 3.3.2) en condiciones establecidas de HPLC (véase 4.3.4).

5 Como puede deducirse de la figura 11, pudo conseguirse un perfil de resolución mejorado usando este nuevo diseño de PNA. Es decir, pudo observarse una separación significativamente mejorada en comparación con la figura 10. Debido a las cargas negativas de los PNA respectivos, pudieron aumentarse los tiempos de retención respectivos, como era el objetivo.

10 Como es evidente a partir de la figura 12, estas mediciones son muy reproducibles. La separación de las dobles hélices también podía conseguirse en una mezcla 1:1:1. También es obvio a partir de la figura 12 que el área de pico de miR16-4-x negativo está significativamente reducida en comparación con las otras dos dobles hélices.

4.8 Detección de miR16, miR210 y miR320 derivados de plasma humano

15 Posteriormente, se realizó la detección de miR16, miR210 y miR320 de plasma humano, proporcionado por la Hannover Medical School. En esta ocasión, el objetivo era analizar la correlación entre lesión renal aguda y los miARN como biomarcadores putativos.

20 Por consiguiente, se digirieron cinco muestras de plasma de sujetos de un grupo de control (CTL) y cinco muestras de plasma de sujetos con lesión renal aguda (AKI), como se describe en el párrafo 3.2.4, y posteriormente se hibridaron como se describe en el capítulo 3.5. La hibridación tuvo lugar a 80 °C para destruir todas las estructuras secundarias putativas dentro de miR320. Las muestras se midieron posteriormente usando el sistema 2 de HPLC (véase 3.3.2) usando condiciones establecidas de HPLC (véase 4.3.4) con un gradiente de un 20-60 % en tampón B durante 7 minutos.

25 La figura 13 muestra los cromatogramas obtenidos de la muestra de plasma del sujeto del grupo de control (CTL 8) en comparación con el plasma del sujeto (AKI 154) con lesión renal aguda. En esta ocasión, puede observarse claramente que la emisión de miR320 en el caso de AKI 154 es significativamente mayor que en el caso del sujeto de control CTL 8, mientras que la emisión de miR210 es casi similar en ambos casos.

30 La tabla 15 resume los valores de miR16, miR210 y miR320, de plasma humano. Las relaciones respectivas de miR210 y miR320 y los valores promedios respectivos se calcularon con desviaciones típicas. Los valores de la muestra de plasma obtenida del sujeto AKI_138 no se consideraron parte de estos cálculos, ya que tienen que considerarse no representativos. El valor promedio de las mediciones con respecto a los sujetos de control está en el intervalo de 1,5 con una desviación típica relativa de un 17 %. En el caso de pacientes con lesión renal aguda, se observó un valor promedio mayor de 2,6 con una menor desviación típica de un 5 %. En resumen, todos los valores están cerca del límite de detección del detector.

40 Tabla 15: Áreas de pico para las dobles hélices de miR16, miR210 y miR320 obtenidos de plasma humano proporcionado por la Hannover Medical School con DT como desviación típica y DTR como desviación típica relativa

	Área de pico de miR210 [mV*min]	Área de pico de miR320 [mV*min]	Relación 210/320
Plasma_CTL_1	0,0053	0,0032	1,6
Plasma_CTL_4	0,0016	0,0012	1,3
Plasma_CTL_5	0,0064	0,0041	1,6
Plasma_CTL_7	0,0050	0,0028	1,8
Plasma_CTL_8	0,0046	0,0036	1,3
Valor promedio	0,0046	0,0030	1,5
DT	0,0020	0,0013	0,3
DTR [%]	44 %	43 %	17 %
Plasma_AKI_124	0,0054	0,0020	2,7
Plasma_AKI_136	0,0053	0,0022	2,4
Plasma_AKI_138	0,0062	0,0236	0,3
Plasma_AKI_152	0,0049	0,0020	2,5
Plasma_AKI_154	0,0046	0,0017	2,7
Valor promedio	0,0053	0,0020	2,6
DT	0,0007	0,0002	0,1
DTR [%]	13 %	10 %	5 %

6. SUMARIO

5 El método de HPLC recién establecido desarrollado en ese trabajo permite la detección simultánea de diferentes miARN con longitud similar en una ejecución de HPLC. En este contexto, se separaron tres miARN, concretamente miR16, miR210 y miR320, mediante AEX-HPLC después de hibridación en presencia de PNA cargados de forma diferente. En primer lugar, se eligió un diseño de PNA que permitía un acoplamiento del tinte de fluorescencia con la secuencia de PNA mediante química de maleimida. Sin embargo, esto no resultó óptimo ya que los cromatogramas, en el transcurso de la optimización de las condiciones de hibridación y HPLC, revelaron una división de los picos y, de este modo, una intensidad de señal minimizada debido a la hidrólisis del anillo maleimida. Este efecto se observó en particular a temperatura aumentadas y después de tiempos de incubación más largos de las muestras.

10 A continuación se eligió un nuevo diseño de PNA que permitiera el acoplamiento del tinte de fluorescencia mediante química de NHS-éster. Esto produjo una estabilidad de las muestras y la división del pico se evitó satisfactoriamente.

15 Usando el nuevo diseño de PNA, fue posible detectar de forma cuantitativa dos miARN (210 y 320) de plasma humano. En resumen, se observó una relación aumentada de miR210 frente a miR320 en el plasma obtenido de los sujetos con lesión renal aguda en comparación con el grupo de control. De acuerdo con las comunicaciones personales, esta tendencia se confirmó independientemente por análisis de PCR.

20 El método de detección de la presente invención, por tanto, permite usar los miARN miR210 y miR320 como biomarcador en el diagnóstico de lesión renal aguda. Como consecuencia, el método de HPLC desarrollado en el contexto de la presente invención posibilita el desarrollo de un kit de diagnóstico que permite un método rápido y simple para diagnosticar esta enfermedad particular en un estadio temprano, asegurando de este modo un tratamiento temprano de los pacientes.

25 LISTADO DE SECUENCIAS

- <110> Axolabs GmbH
- 30 <120> detección simultánea de oligonucleótidos, un kit y un uso relacionado con el mismo
- <130> A69492PC
- <150> EP 15000588.2
- 35 <151> 02/03/2015
- <160> 9
- <170> PatentIn versión 3.5
- 40 <210> 1
- <211> 19
- <212> ADN
- <213> Secuencia artificial
- 45 <220>
- <223> ácido peptidonucleico modificado (SEQ ID NO: 1)
- <220>
- 50 <221> misc_binding
- <222> (1)..(1)
- <223> sitio que se une covalentemente a otro resto en forma de Atto425 acoplado mediante cisteína y dos O-conectores
- <220>
- 55 <221> misc_binding
- <222> (19)..(19)
- <223> sitio que se une covalentemente a otro resto en forma de Atto425 acoplado mediante cisteína y un O-conector
- 60 <400> 1
- gccaatattt acgtgctgc 19
- <210> 2
- 65 <211> 19
- <212> ADN

ES 2 731 637 T3

<213> Secuencia artificial

<220>
<223> ácido peptidonucleico modificado (SEQ ID NO: 2)

5

<220>
<221 > misc_binding
<222> (1)..(1)
<223> sitio que se une covalentemente a otro resto en forma de Atto425 acoplado mediante cisteína y tres ácidos glutámicos

10

<220>
<221 > misc_binding
<222> (19)..(19)
<223> sitio que se une covalentemente a otro resto en forma de Atto425 acoplado mediante cisteína y tres ácidos glutámicos

15

<400> 2
gccaatattt acgtgctgc

20

<210> 3
<211> 19
<212> ADN
<213> Secuencia artificial

25

<220>
<223> ácido peptidonucleico modificado (SEQ ID NO: 3)

30

<220>
<221 > misc_binding
<222> (1)..(1)
<223> sitio que se une covalentemente a otro resto en forma de Atto425 acoplado mediante cisteína y dos O-conectores

35

<220>
<221 > misc_binding
<222> (3)..(3)
<223> sitio con modificación gamma de lisina

40

<220>
<221 > misc_binding
<222> (6)..(6)
<223> sitio con modificación gamma de lisina

45

<220>
<221 > misc_binding
<222> (9)..(9)
<223> sitio con modificación gamma de lisina

50

<220>
<221 > misc_binding
<222> (12)..(12)
<223> sitio con modificación gamma de lisina

55

<220>
<221 > misc_binding
<222> (15)..(15)
<223> sitio con modificación gamma de lisina

60

<220>
<221 > misc_binding
<222> (19)..(19)
<223> sitio que se une covalentemente a otro resto en forma de Atto425 acoplado mediante cisteína y un O-conector

65

<400> 3

19

ES 2 731 637 T3

gccaatattt acgtgctgc 19

<210> 4
 <211> 17
 5 <212> ADN
 <213> Secuencia artificial

<220>
 <223> ácido peptidonucleico modificado (SEQ ID NO: 4)

10 <220>
 <221 > misc_binding
 <222> (1)..(1)
 <223> sitio que se une covalentemente a otro resto en forma de Atto425 acoplado mediante dos O-conectores

15 <220>
 <221 > misc_binding
 <222> (17)..(17)
 <223> sitio que se une covalentemente a otro resto en forma de Atto425 acoplado mediante lisina y un O-conector

20 <400> 4
 tcgccctctc aaccag 17

<210> 5
 25 <211> 19
 <212> ADN
 <213> Secuencia artificial

<220>
 30 <223> ácido peptidonucleico modificado (SEQ ID NO: 5)

<220>
 <221 > misc_binding
 <222> (1)..(1)
 35 <223> sitio que se une covalentemente a otro resto en forma de Atto425 acoplado mediante un O-conector y dos ácidos glutámicos

<220>
 <221 > misc_binding
 40 <222> (19)..(19)
 <223> sitio que se une covalentemente a otro resto en forma de Atto425 acoplado mediante lisina y dos ácidos glutámicos

<400> 5
 45 gccaatattt acgtgctgc 19

<210> 6
 <211> 17
 <212> ADN
 50 <213> Secuencia artificial

<220>
 <223> ácido peptidonucleico modificado (SEQ ID NO: 6)

55 <220>
 <221 > misc_binding
 <222> (1)..(1)
 <223> sitio que se une covalentemente a otro resto en forma de Atto425 acoplado mediante un O-conector y cuatro ácidos glutámicos

60 <220>
 <221 > misc_binding
 <222> (17)..(17)
 <223> sitio que se une covalentemente a otro resto en forma de Atto425 acoplado mediante lisina y cuatro ácidos glutámicos

65

ES 2 731 637 T3

	<400> 6 cagtgtgcgg tgggcag	17
5	<210> 7 <211> 22 <212> ARN <213> <i>Homo sapiens</i>	
10	<400> 7 uagcagcacg uaaauauugg cg	22
15	<210> 8 <211> 22 <212> ARN <213> <i>Homo sapiens</i>	
20	<400> 8 agccccugcc caccgcacac ug	22
25	<210> 9 <211> 22 <212> ARN <213> <i>Homo sapiens</i>	
	<400> 9 aaaagcuggg uugagagggc ga	22

REIVINDICACIONES

1. Un método para detectar de forma cuantitativa al menos tres oligonucleótidos distintos de la misma longitud en paralelo a partir de una muestra biológica, comprendiendo dicho método las etapas de
- a) proporcionar una muestra biológica que contiene o es sospechosa de contener los al menos tres oligonucleótidos distintos de la misma longitud;
 - b) formar una mezcla de hibridación poniendo en contacto la muestra biológica con al menos tres moléculas de detección complementarias a los al menos tres oligonucleótidos distintos de la misma longitud, en el que las moléculas de detección se marcan cada una con al menos un resto fluorescente, y en el que las moléculas de detección tienen diferentes cargas superficiales, en el que las diferentes cargas superficiales de las al menos tres moléculas de detección se seleccionan del grupo de cargas neutras, negativas y positivas, en el que la carga o cargas superficiales negativas se caracterizan por la presencia de al menos dos restos de aminoácido cargados negativamente incorporados o modificaciones de la estructura de aminoglicina, y en el que la carga o cargas superficiales positivas se caracterizan por la presencia de al menos dos restos de aminoácido cargados positivamente incorporados o modificaciones de la estructura de aminoglicina;
 - c) separar las moléculas de detección hibridadas con los al menos tres oligonucleótidos distintos de la misma longitud del resto de moléculas de detección no hibridadas por cromatografía de líquidos de alto rendimiento de intercambio aniónico (AEX-HPLC);
 - d) detectar la molécula de detección hibridada - restos oligonucleótidos mediante lectura de fluorescencia cuantitativa.
2. El método de la reivindicación 1, en el que los al menos tres oligonucleótidos distintos tienen una longitud de 10 a 50 nucleótidos, preferiblemente de 12 a 40 nucleótidos, más preferiblemente de 18 a 30 nucleótidos.
3. El método de la reivindicación 1 o 2, en el que al menos tres oligonucleótidos distintos de la misma longitud se seleccionan del grupo que consiste en miARN (miARN), ARN interferentes pequeños (ARNip), ARN activadores cortos (ARNac), oligonucleótidos señuelo, oligonucleótidos de antisentido, aptámeros y espiegélmeros.
4. El método de cualquiera de las reivindicaciones 1 a 3, en el que la molécula de detección se selecciona del grupo que consiste en ácidos peptidonucleicos (PNA), oligómeros morfolino de fosfordiamidato (PMO) y Ugimer.
5. El método de cualquiera de las reivindicaciones 1 a 4, en el que las moléculas de detección tienen una longitud de 10 a 30 nucleótidos, preferiblemente una longitud de 10 a 20 nucleótidos, más preferiblemente una longitud de 15 a 20 nucleótidos.
6. El método de cualquiera de las reivindicaciones 1 a 5, en el que las al menos tres moléculas de detección están marcadas cada una con un resto fluorescente de la misma identidad.
7. El método de cualquiera de las reivindicaciones 1 a 6, en el que las diferentes cargas superficiales de las al menos tres moléculas de detección se seleccionan de una combinación de cargas neutras y negativas, cargas neutras y positivas y/o cargas negativas y positivas, preferiblemente seleccionadas de múltiples cargas negativas, múltiples cargas positivas o cualquier combinación de las mismas.
8. El método de la reivindicación 1, en el que los restos de aminoácido cargados negativamente están en forma de ácidos glutámicos.
9. El método de la reivindicación 1, en el que el resto de aminoácido cargado positivamente está en forma de lisina.
10. El método de cualquiera de las reivindicaciones 1 a 9, en el que la cromatografía de líquidos de alto rendimiento de intercambio aniónico (AEX-HPLC) de la etapa c) se realiza a una temperatura de 30 °C a 75 °C, preferiblemente a una temperatura de 40 °C a 55 °C, más preferiblemente a una temperatura de 50 °C.
11. El método de cualquiera de las reivindicaciones 1 a 10, en el que la lectura cuantitativa de la etapa d) se caracteriza por la comparación de las señales fluorescentes de la molécula de detección hibridada - restos oligonucleotídicos con un patrón interno o con un patrón externo en forma de una curva de calibración externa.
12. Uso de las al menos tres moléculas de detección con diferentes cargas superficiales para detectar de forma cuantitativa al menos tres oligonucleótidos distintos de la misma longitud en paralelo a partir de una muestra biológica mediante cromatografía de líquidos de alto rendimiento de intercambio aniónico (AEX-HPLC), en el que las diferentes cargas superficiales de las al menos tres moléculas de detección se seleccionan del grupo de cargas neutras, negativas y positivas, en el que la carga o cargas superficiales negativas se caracterizan por la presencia de al menos dos restos de aminoácido cargados negativamente incorporados o modificaciones de la estructura de aminoglicina, y en el que la carga o cargas superficiales positivas se caracterizan por la presencia de al menos dos restos de aminoácido cargados positivamente incorporados o modificaciones de la estructura de aminoglicina, preferiblemente en el que la detección se realiza como se define en cualquiera de las reivindicaciones 1 a 11.

Figura 1 A

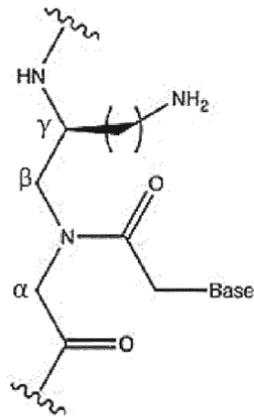


Figura 1 B

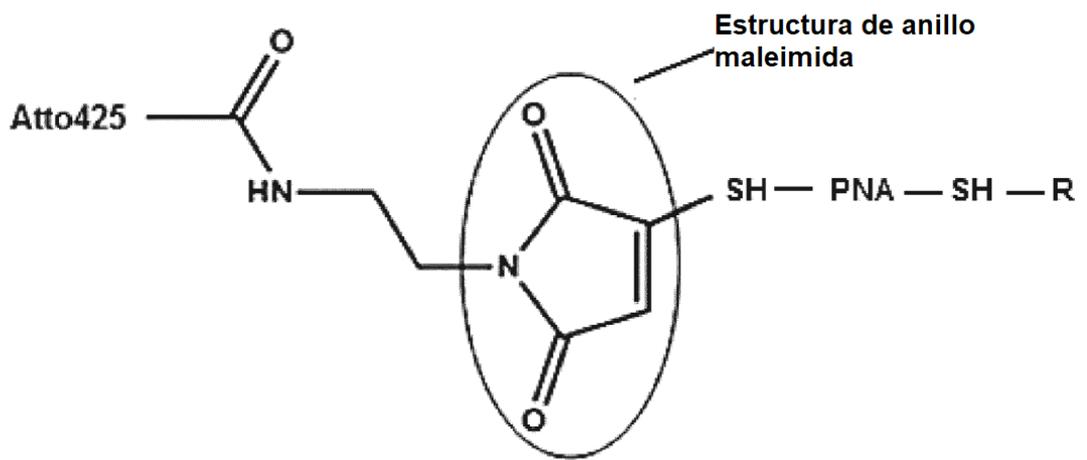


Figura 1 C

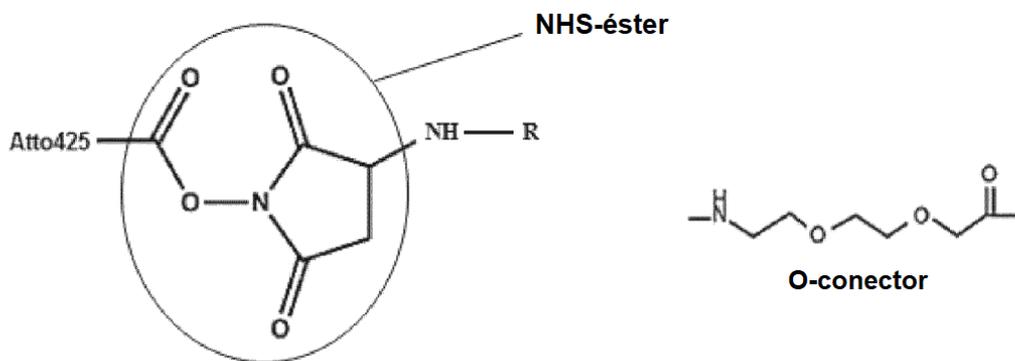


Figura 2

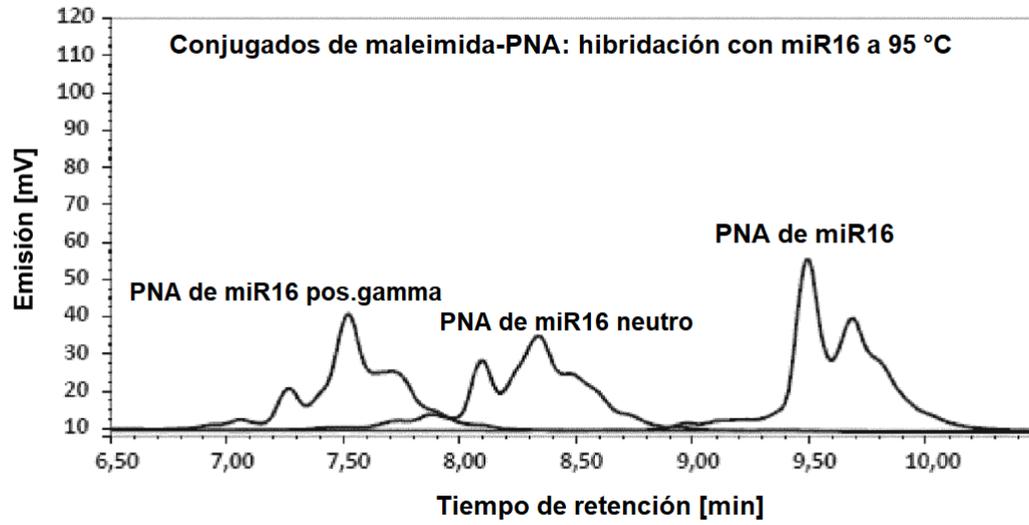


Figura 3

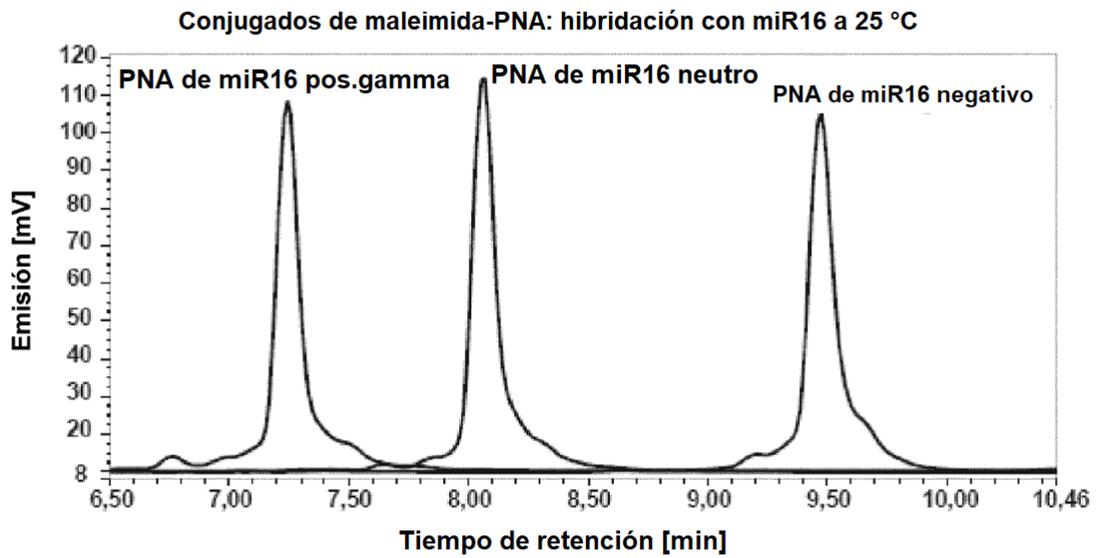


Figura 4

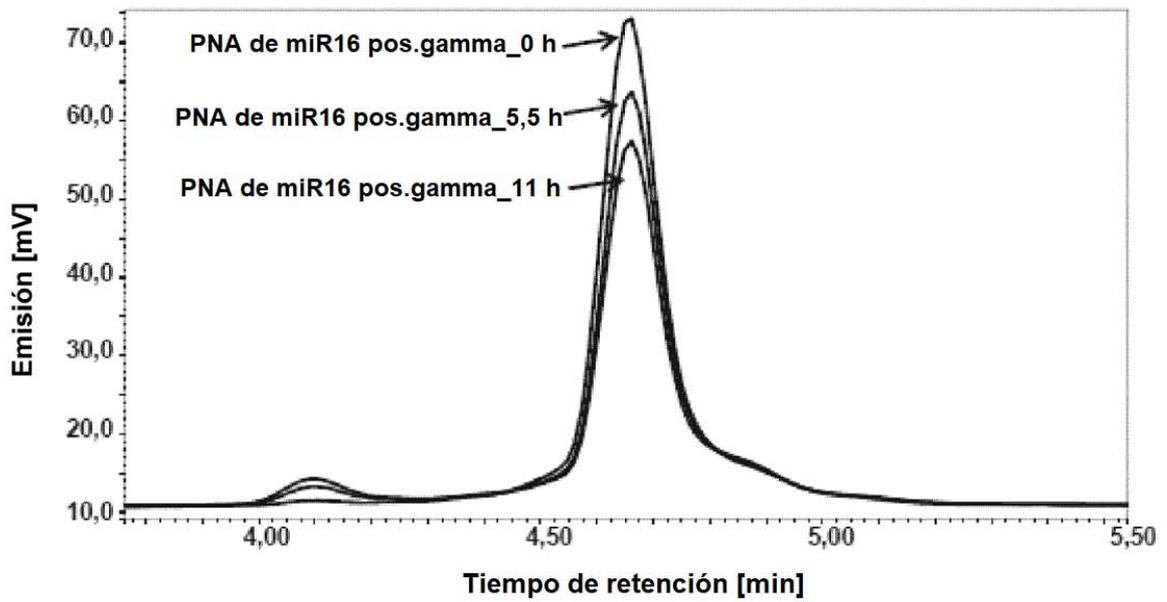


Figura 5

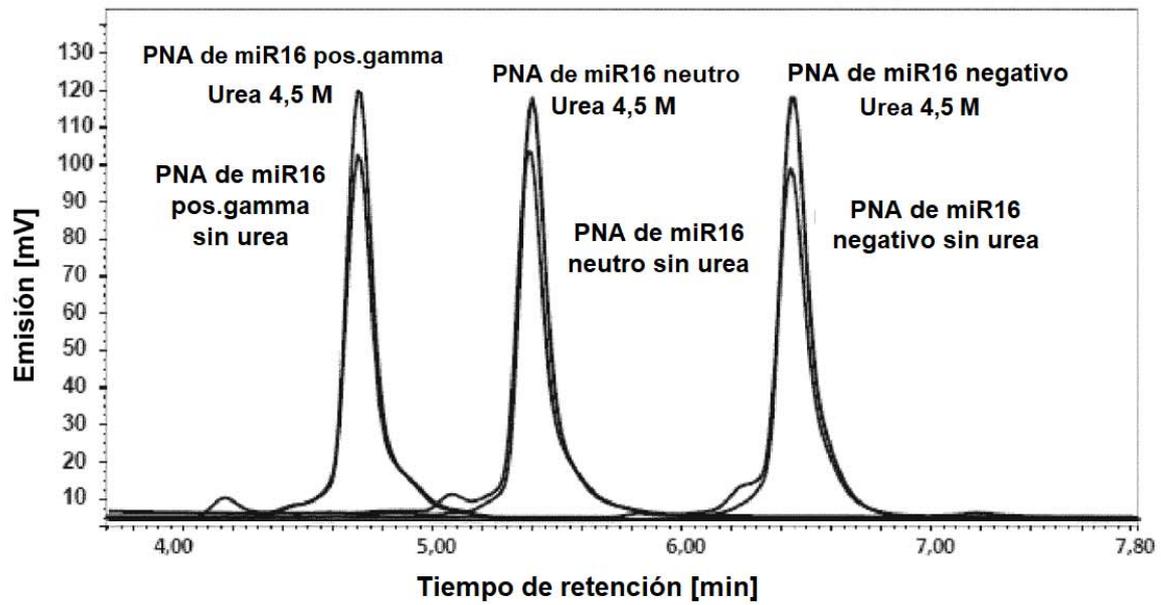


Figura 6

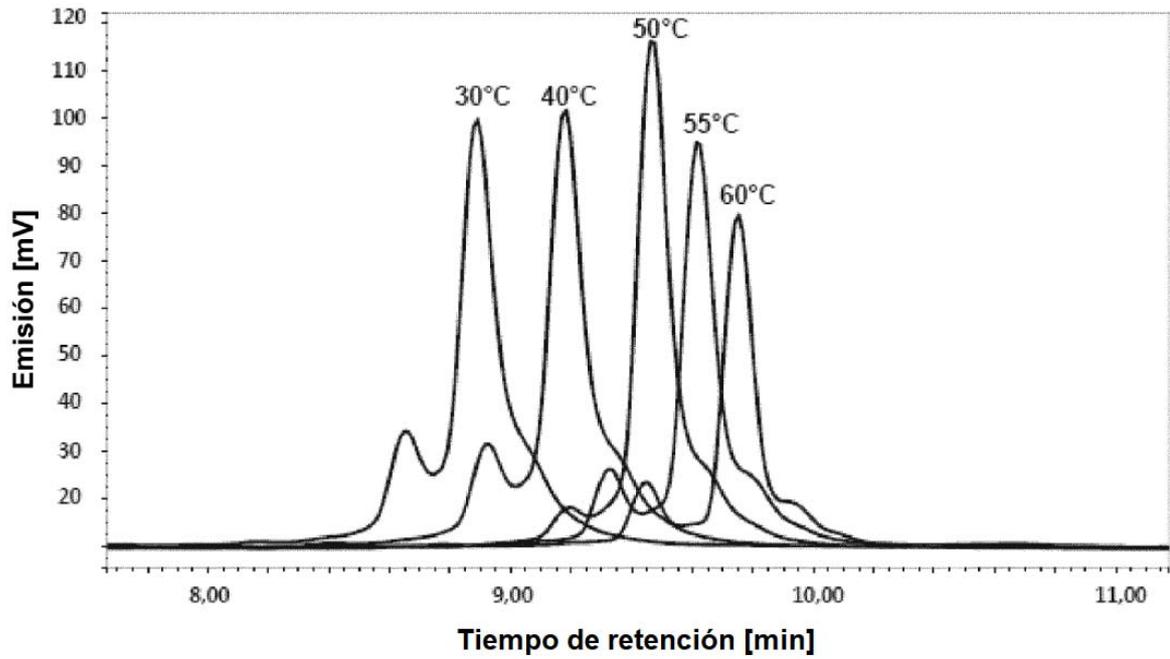


Figura 7

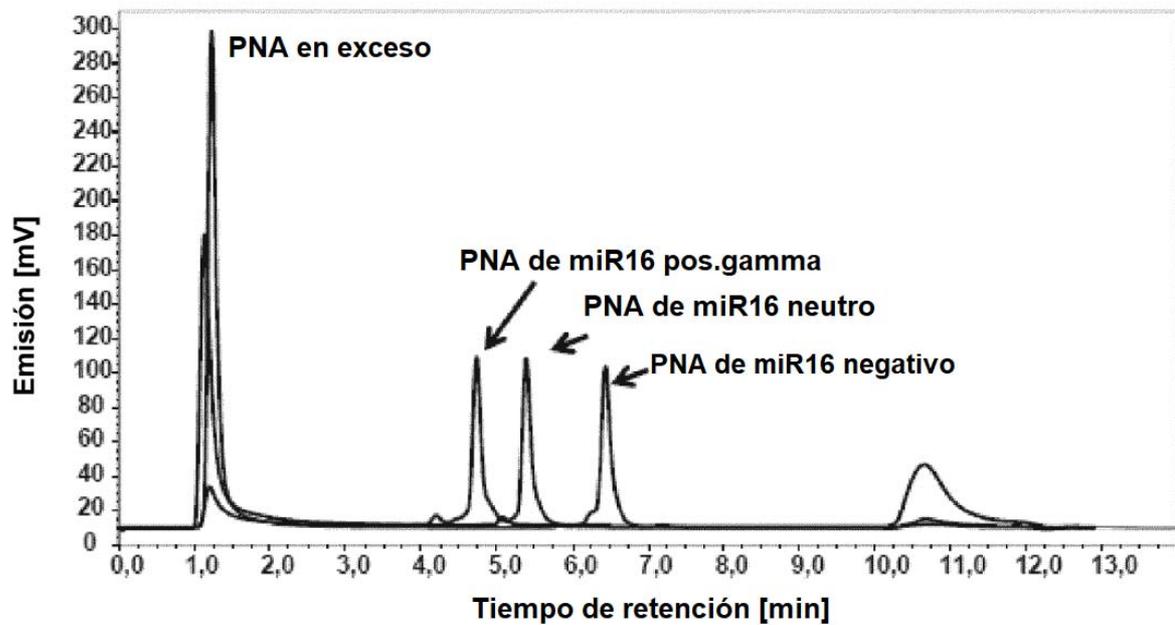


Figura 8

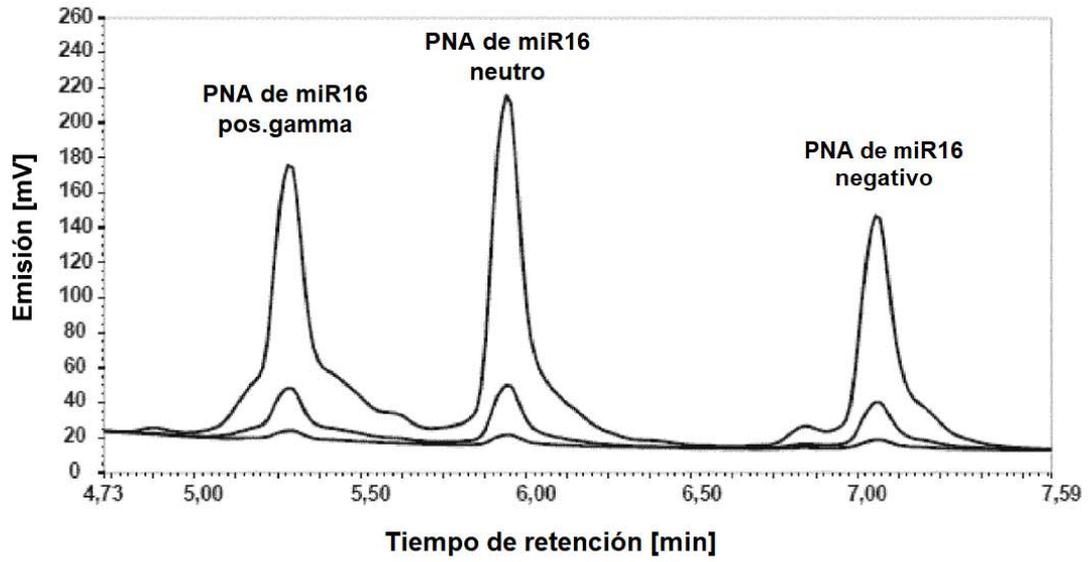


Figura 9 A

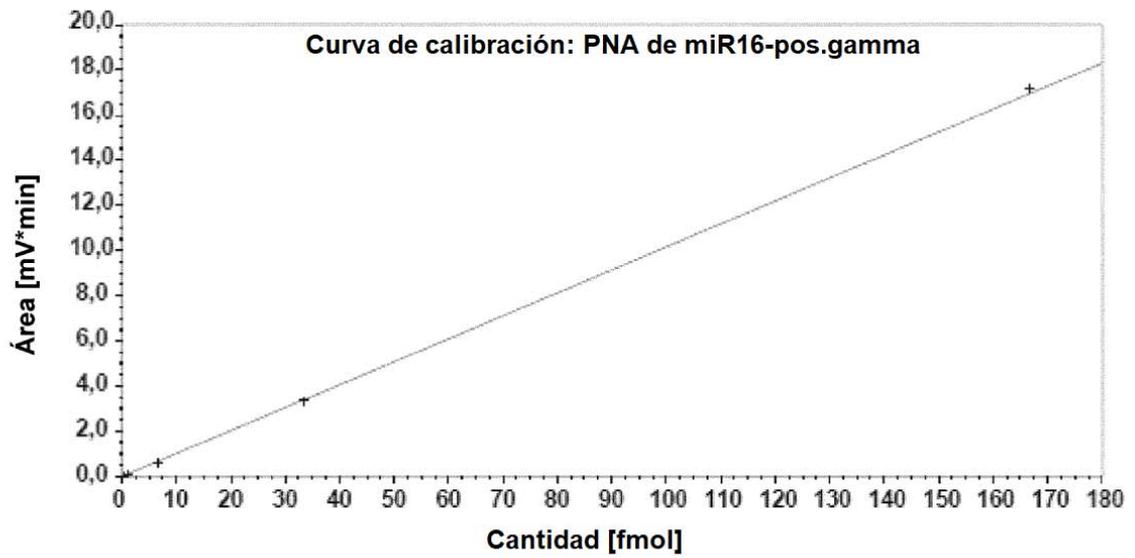


Figura 9 B

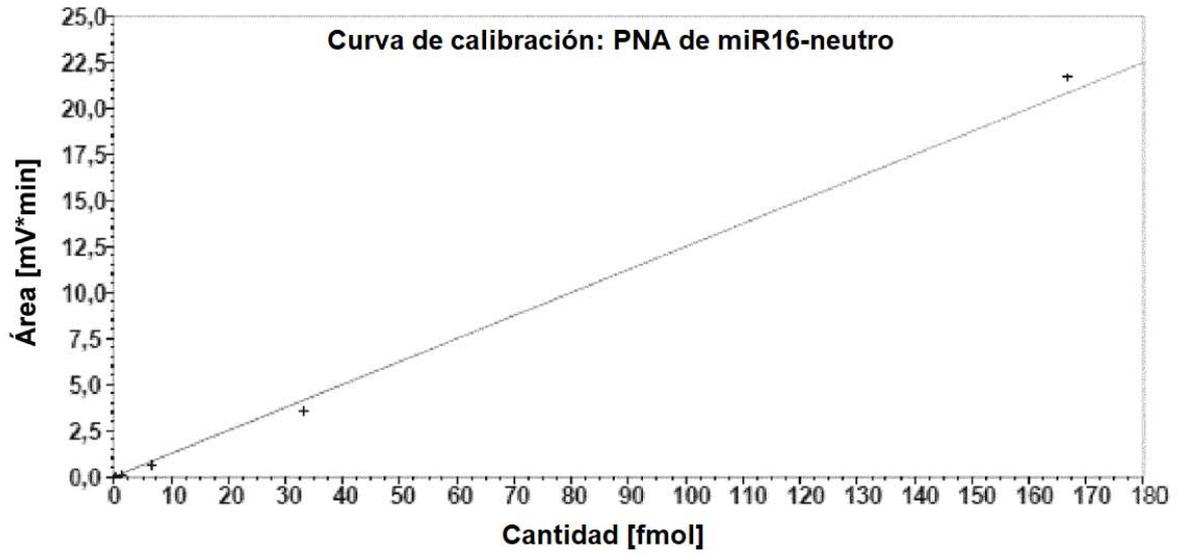


Figura 9 C

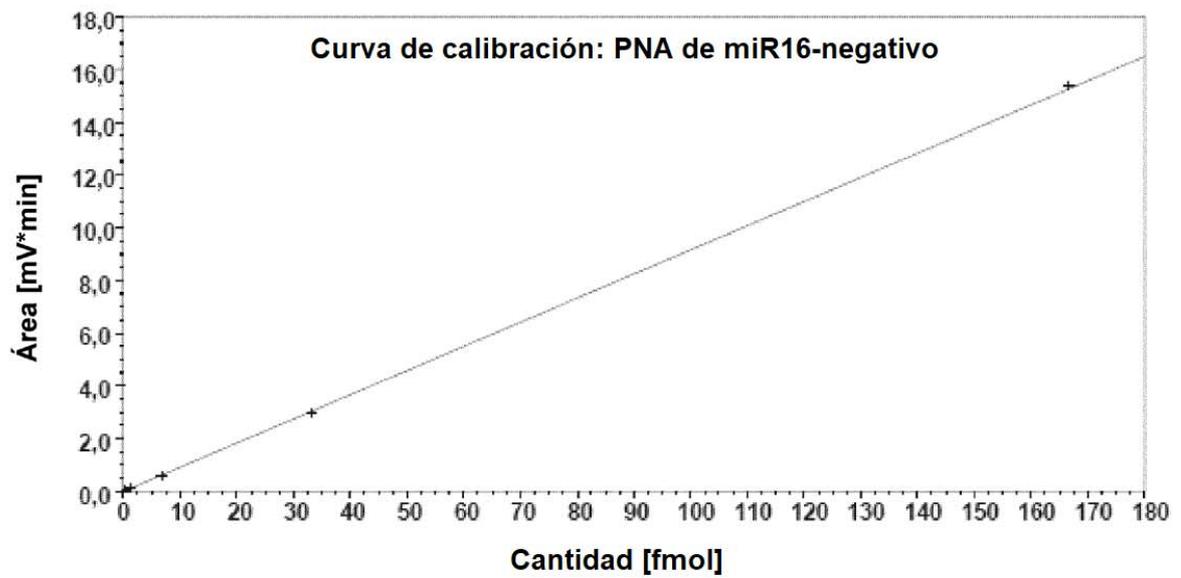


Figura 10

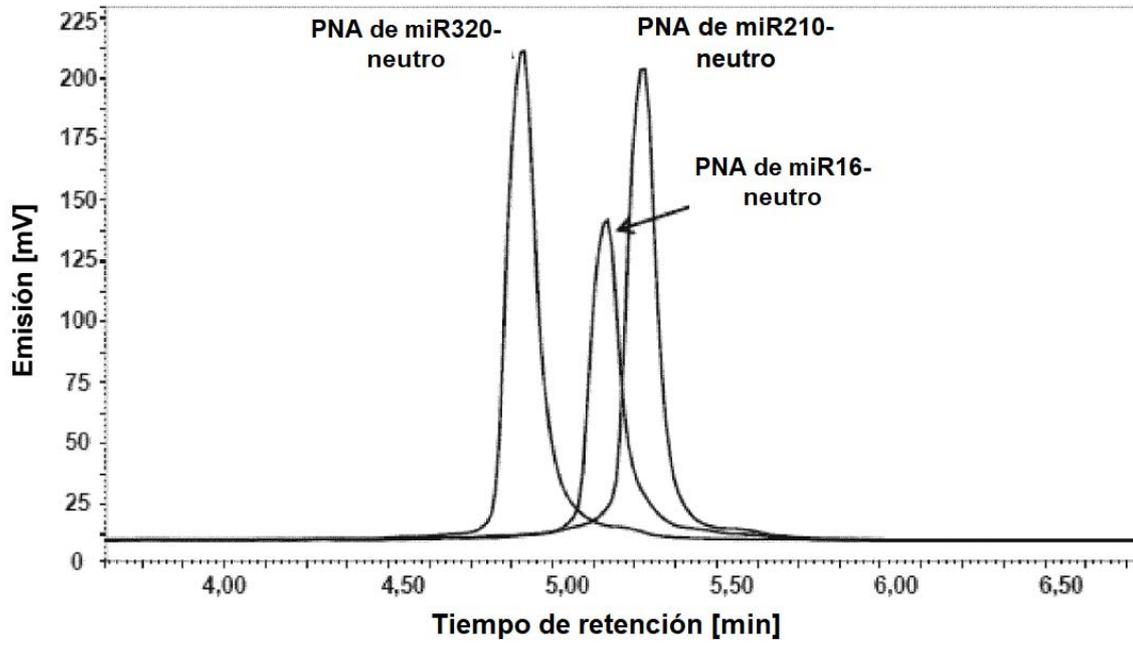


Figura 11

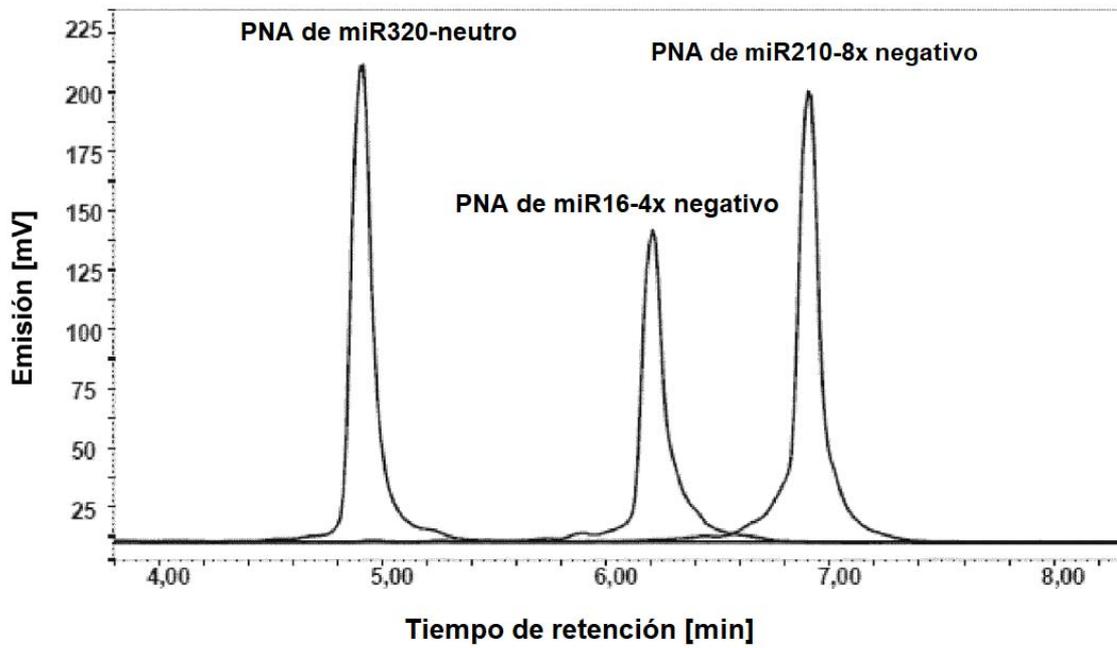


Figura 12

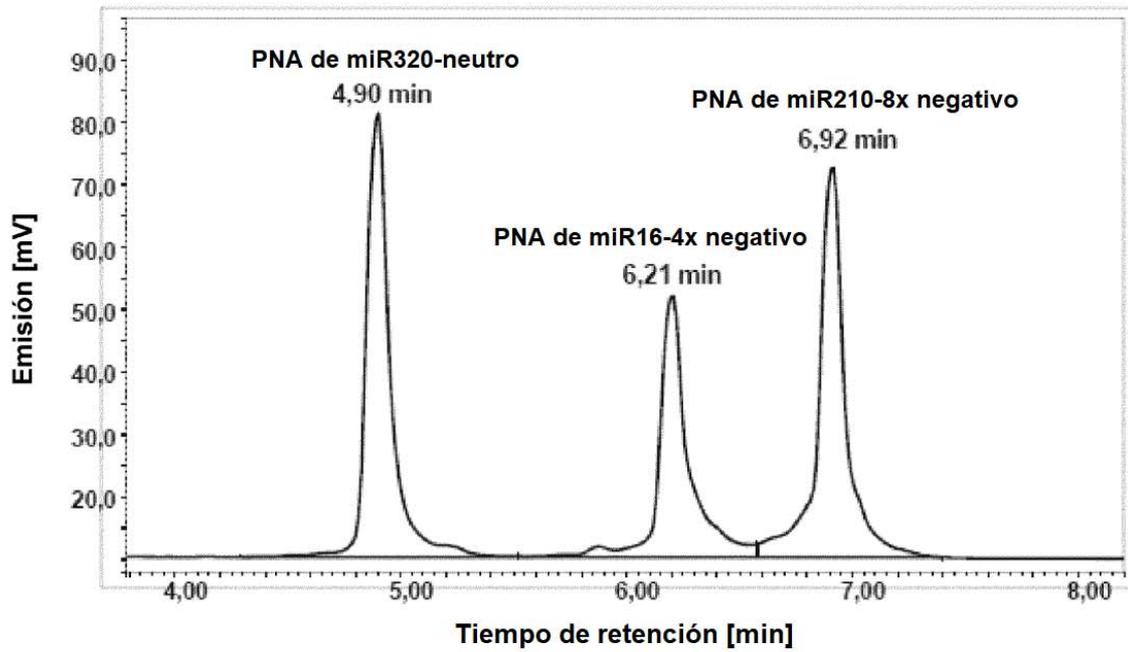


Figura 13

