

19



OFICINA ESPAÑOLA DE
PATENTES Y MARCAS

ESPAÑA



11 Número de publicación: **2 736 850**

51 Int. Cl.:

C12Q 1/68 (2008.01)

12

TRADUCCIÓN DE PATENTE EUROPEA

T3

86 Fecha de presentación y número de la solicitud internacional: **29.04.2016 PCT/EP2016/059604**

87 Fecha y número de publicación internacional: **03.11.2016 WO16174199**

96 Fecha de presentación y número de la solicitud europea: **29.04.2016 E 16719856 (3)**

97 Fecha y número de publicación de la concesión europea: **03.07.2019 EP 3289095**

54 Título: **Detección de moléculas de ácido nucleico**

30 Prioridad:

29.04.2015 DE 102015106646
18.11.2015 EP 15195182

45 Fecha de publicación y mención en BOPI de la traducción de la patente:
08.01.2020

73 Titular/es:

MIRDETECT GMBH (100.0%)
Am Lehester Deich 22a
28357 Bremen, DE

72 Inventor/es:

SPIEKERMANN, MEIKE;
WINTER, NINA;
FLOR, INGA y
BELGE, GAZANFER

74 Agente/Representante:

SÁEZ MAESO, Ana

ES 2 736 850 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 de moléculas de ácido nucleico

5 Campo técnico de la invención

La presente invención se refiere a métodos para la detección de moléculas de ácido nucleico en el límite inferior de detección.

10 Antecedentes de la invención

El nivel de expresión de moléculas de ácido nucleico específicas en muestras biológicas tomadas de un sujeto prueba puede ser un indicador de la presencia, ausencia y/o la extensión de enfermedades o trastornos particulares.

15 Por ejemplo, la generación de perfiles de expresión de microARN (ARNmi) ha mostrado que en diferentes enfermedades están presentes variaciones claras en la expresión de ARNmi específicos entre personas de pruebas saludables y pacientes. Los ARNmi son ARN cortos, altamente conservados, no codificantes, que desempeñan un papel importante en la compleja red de la regulación génica. Específicamente se unen ARN mensajeros (ARNm) y controlan la expresión de genes a través de la regulación de la estabilidad y traducción del ARNm. Generalmente, los ARNmi consisten en 21 a
20 23 nucleótidos.

Muchas moléculas de ácido nucleico relevantes para el diagnóstico, por ejemplo, los ARNmi específicos, son difíciles de cuantificar con precisión debido a su pequeño tamaño y sus concentraciones típicamente bajas en las muestras biológicas.

25 Para detectar el nivel de expresión de un ARNmi específico, el ARNmi se aísla usualmente de la muestra biológica y se transcribe a la inversa en ADN sintético (ADNc). Posteriormente, el nivel de expresión de ARNmi se determina mediante el uso de PCR en tiempo real cuantitativo (qRT-PCR). En algunos casos, se realiza una etapa de preamplificación antes de la medición real. Esta etapa adicional se realiza, si (i) no hay suficiente materia prima de ARNmi para el uso en varios métodos de determinación de biología molecular (PCR de tiempo real, microarreglos etc.), y/o (ii) la concentración de
30 ARNmi en la muestra es muy baja (es decir, sin preamplificación no se generaría ninguna señal durante el PCR de tiempo real).

Sin embargo, como se muestra a continuación en el ejemplo comparativo 1, este enfoque 'clásico' no permite la determinación exacta y confiable de los niveles de expresión si las moléculas de ácido nucleico dianas están presentes en cantidades en límite inferior de detección, por ejemplo, menor de 1000 moléculas por muestra.
35

En consecuencia, fue un objetivo de la presente invención proporcionar métodos que faciliten la determinación exacta y confiable del nivel de expresión de moléculas de ácido nucleico específicas, por ejemplo, ARNmi, en muestras biológicas en el límite inferior de detección.

40 Resumen de la invención

En un aspecto, la presente invención se refiere a un método de determinar el nivel de expresión de una molécula de ácido nucleico específica en una muestra biológica, el método que comprende las etapas de:

45 (i) proporcionar un lote A que comprende ADN o ADNc aislado/obtenido de la muestra biológica;
(ii) proporcionar tres o más alícuotas del lote A proporcionado en la etapa (i) y realizar unan reacción en cadena de la polimerasa independiente (PCR) con cada una de las tres o más alícuotas para amplificar la molécula de ácido nucleico específica, de esta manera proporcionando tres o más lotes B que comprenden la molécula de ácido nucleico específica amplificada; y
50 (iii) mezclar cantidades iguales de los tres o más lotes B, de esta manera proporcionando un lote C, y determinar el nivel de la molécula de ácido nucleico específica en el lote C mediante un enfoque basado en PCR, en donde el nivel determinado en la etapa (iii) corresponde al nivel de expresión de la molécula de ácido nucleico específica en la muestra biológica.

55 En otro aspecto, la presente invención se refiere a el método para determinar el nivel de expresión de una molécula de ácido nucleico específica en una muestra biológica, el método que comprende las etapas de:

(i) proporcionar un lote A que comprende ADN o ADNc aislado/obtenido de la muestra biológica;
(ii) proporcionar tres o más alícuotas del lote A proporcionado en la etapa (i) y realizar unan reacción en cadena de la polimerasa independiente (PCR) con cada una de las tres o más alícuotas para amplificar la molécula de ácido nucleico específica, de esta manera proporcionando tres o más lotes B que comprenden la molécula de ácido nucleico específica amplificada; y
60 (iii) determinar el nivel de la molécula de ácido nucleico específica en cada uno de los tres o más lotes B mediante un enfoque basado en PCR, en donde el valor medio de los niveles determinados en la etapa (iii) corresponde al nivel de expresión de la molécula de
65 ácido nucleico específica en la muestra biológica.

En una modalidad, la concentración de la molécula de ácido nucleico específica en la muestra biológica es $\leq 1 \times 10^{-11}$ M, o $\leq 1 \times 10^{-12}$ M, o $\leq 1 \times 10^{-13}$ M, o $\leq 1 \times 10^{-14}$ M, o $\leq 1 \times 10^{-15}$ M, o $\leq 1 \times 10^{-16}$ M.

5 En una modalidad, la concentración de la molécula de ácido nucleico específica en la muestra biológica está entre 1×10^{-11} M y 1×10^{-17} M, o 1×10^{-12} M y 1×10^{-17} M, o 1×10^{-13} M y 1×10^{-17} M, o 1×10^{-14} y 1×10^{-17} M, o 1×10^{-15} y 1×10^{-17} M, o 1×10^{-16} y 1×10^{-17} M.

10 En una modalidad, la molécula de ácido nucleico específica se selecciona del grupo que consiste en un ARNmi específico, un ADN circulante libre de célula específico (por ejemplo, un ADN tumoral circulante libre de célula específico), un ARNm específico, un ARNsi específico y un ARNsn específico.

En una modalidad, la molécula de ácido nucleico específica es un ARNmi específico.

15 En una modalidad, la molécula de ARNmi específico se selecciona del grupo que consiste en miR-371a-3p, miR-93-5p, miR-372, miR-373, miR-367 y miR-20a-5p.

En una modalidad, la muestra biológica se selecciona del grupo que consiste en fluido corporal, tejido, células, lisado celular y sobrenadante de cultivo celular.

20 En una modalidad, el fluido corporal se selecciona del grupo que consiste en suero sanguíneo, plasma sanguíneo, plasma seminal, fluido hidrocele, fluido espermatocèle, sangre completa, orina, fluido amniótico, exudado, esputo, saliva y fluido cerebroespinal.

25 En una modalidad, el tejido se selecciona del grupo que consiste en tejido nativo, tejido congelado a presión y tejido fijado con formalina y embebido en parafina (FFPE).

En una modalidad, el tejido es tejido tumoral.

30 En una modalidad, el lote A comprende ADNc aislado/obtenido de la muestra biológica.

En una modalidad, la etapa (i) comprende las etapas de:

(ia) aislar el ARN de la muestra biológica; y

(ib) convertir el ARN aislado en la etapa (ia) a ADNc, de esta manera proporcionando el lote A que comprende el ADNc.

35 En una modalidad, en la etapa (ii), se proporcionan tres alícuotas del lote A.

En una modalidad, el enfoque basado en PCR es PCR cuantitativa de tiempo real (qRT-PCR) o PCR digital (dPCR).

40 Breve descripción de las figuras

La Figura 1 muestra una representación esquemática de un método de acuerdo con la presente invención (Ejemplo 1). Después de tres qRT-PCR, el valor de la media aritmética se calcula para la evaluación de los datos.

45 La Figura 2 muestra una representación esquemática de un método de acuerdo con la presente invención (Ejemplo 2). Sólo un qRT-PCR se lleva a cabo con una mezcla de iguales cantidades de tres reacciones independientes de preamplificación para obtener el valor medio medido para la evaluación de los datos.

Descripción detallada de la invención

50 Aunque la presente invención se describe en detalle anteriormente y a continuación, debe entenderse que esta invención no se limita a las metodologías particulares, protocolos y reactivos descritos en la presente descripción ya que estos pueden variar. Debe entenderse, además, que la terminología que se usa en la presente descripción es para el propósito de describir modalidades particulares solamente, y no pretende ser limitante del alcance de la presente invención la cual se limitará solamente por las reivindicaciones anexas. A menos que se defina de otra manera, todos los términos técnicos y científicos que se usan en la presente descripción tienen el mismo significado que el que entiende comúnmente un experto en la técnica.

60 En lo siguiente, se describirán ciertos elementos de la presente invención. Estos elementos pueden enumerarse con modalidades específicas, sin embargo, debe entenderse que pueden combinarse de cualquier manera y en cualquier número para crear modalidades adicionales. Los ejemplos y las modalidades preferidas descritos de manera diversa no deben interpretarse para limitar la presente invención a sólo las modalidades descritas explícitamente. Debe entenderse que esta descripción apoya y abarca las modalidades, que combinan las modalidades descritas explícitamente con cualquier número de los elementos descritos y/o preferidos. Además, cualquiera de las permutaciones y combinaciones de todos los elementos descritos en esta solicitud deben considerarse descritas por la descripción de la presente solicitud a menos que el contexto lo indique de cualquier otra manera.

65

Preferentemente, los términos usados en la presente descripción se definen como se describe en "A multilingual glossary of biotechnological terms (IUPAC Recommendations)", H.G.W. Leuenberger, B. Nagel, y H. Kölbl, Eds., Helvetica Chimica Acta, CH-4010 Basel, Switzerland, (1995).

5 La práctica de la presente invención empleará, a menos que se indique de otra forma, métodos convencionales de química, bioquímica, biología celular, inmunología, y técnicas de ADN recombinante que se explican en la literatura del campo (comparar con, por ejemplo, *Molecular Cloning: A Laboratory Manual*, 3ra Edición, J. Sambrook y otros eds., Cold Spring Harbor Laboratory Press, Cold Spring Harbor 2000).

10 A lo largo de esta descripción y de las reivindicaciones que siguen, a menos que el contexto lo requiera de otra manera, la palabra "comprender", y variaciones tales como "comprende" y "que comprende", se entenderá que implican la inclusión de un miembro declarado, entero o etapa o grupo de miembros, enteros o etapas pero no la exclusión de ningún otro miembro, entero o etapa o grupo de miembros, enteros o etapas aunque en algunas modalidades tal otro miembro entero, o etapa o grupo de miembros, enteros o etapas pueden excluirse, es decir, el tema consiste en la inclusión de un miembro
15 declarado, entero o etapa o grupo de miembros, enteros o etapas. Los términos "un" y "una" y "el/la" y referentes similares usados en el contexto para describir la invención (especialmente en el contexto de las reivindicaciones) se deben interpretar para cubrir tanto el singular como el plural, a menos que se indique de cualquier otra forma en la presente descripción o claramente se contradiga por el contexto. La enumeración de los intervalos de valores en la presente descripción pretende servir simplemente como un método abreviado para referirse individualmente a cada valor separado
20 que se encuentra dentro del intervalo. A menos que se indique de otra manera en la presente descripción, cada valor individual se incorpora en la descripción como si se enumerara individualmente en la presente descripción. Todos los métodos que se describen en la presente descripción pueden llevarse a cabo en cualquier orden adecuado a menos que se indique de otra manera en la presente descripción o que el contexto lo contradiga claramente de otra manera. El uso de cualquiera y de todos los ejemplos, o lenguaje ilustrativo (por ejemplo, "tal como") que se proporciona en la presente descripción simplemente tiene el propósito de ilustrar mejor la invención y no representa una limitación en el alcance de la invención que se reivindica de otra manera. El lenguaje en la descripción no deberá interpretarse como indicación de cualquier elemento no reivindicado esencial para la práctica de la invención.

30 El término "nivel de expresión", como se usa en la presente descripción, puede referirse al nivel de expresión relativo, es decir, el nivel de expresión de la molécula de ácido nucleico específica con relación al (a los) nivel (es) de expresión de una o más moléculas de ácido nucleico de referencia, o al nivel de expresión absoluto, es decir, la cantidad real de la molécula de ácido nucleico específica. De acuerdo con la presente invención, "determinar el nivel de expresión de una molécula de ácido nucleico específica en una muestra biológica" puede ser "determinar la presencia o ausencia de una molécula de ácido nucleico específica en una muestra biológica". En una modalidad, el nivel de expresión (o la presencia o ausencia) de la molécula de ácido nucleico específica en la muestra biológica es indicativo de la presencia, ausencia y/o extensión/progresión de una enfermedad o trastorno en un sujeto del cual se obtiene la muestra biológica. En una modalidad, la enfermedad o trastorno es cáncer, por ejemplo, un cáncer como se define en la presente descripción.

40 Una molécula de ácido nucleico específica puede, de acuerdo con la invención, estar en la forma de una molécula, que es de cadena sencilla o de doble cadena y lineal o cerrada covalentemente para formar un círculo. En una modalidad, la molécula de ácido nucleico específica es ADN o ARN.

45 En el contexto de la presente invención, el término "ADN" se refiere a una molécula, que comprende residuos de desoxirribonucleótidos y está preferentemente compuesta completamente o sustancialmente de residuos de desoxirribonucleótidos. "Desoxirribonucleótido" se refiere a un nucleótido, que carece de un grupo hidroxilo en la posición 2' de un grupo de β -D-ribofuranosilo. El término "ADN complementario (ADNc)", como se usa en la presente descripción, se refiere un ADN de doble cadena sintetizado a partir de un molde de ARN en una reacción catalizada por la enzima transcriptasa inversa.

50 En el contexto de la presente invención, el término "ARN" se refiere a una molécula, que comprende residuos de ribonucleótidos y está preferentemente compuesta completamente o sustancialmente de residuos de ribonucleótidos. "Ribonucleótido" se refiere a un nucleótido con un grupo hidroxilo en la posición 2' de un grupo β -D-ribofuranosa.

55 En una modalidad, la molécula de ácido nucleico específica se selecciona del grupo que consiste en un ARNmi específico, un ADN circulante libre de célula específico (por ejemplo, un ADN tumoral circulante libre de célula específico), un ARNm específico, un ARNsi específico y un ARNsn específico.

60 Los micro ARN (ARNmi) son moléculas de ARN pequeñas no codificantes que consisten en 21 a 23 ribonucleótidos, que funcionan en el silenciamiento del ARN y la regulación postranscripcional de la expresión de genes.

El término "ADN tumoral circulante libre de célula (ADNct)" se refiere a pequeñas piezas de ADN tumoral que se liberan por las células tumorales que mueren hacia el torrente sanguíneo. El tamizaje de/para ADNct permite detectar y seguir la progresión de un tumor del paciente.

65 El ARN mensajero (ARNm) transporta información genética desde el ADN al ribosoma, donde especifica la secuencia de aminoácidos de los productos proteicos de la expresión de genes.

- El ARN pequeño de interferencia (ARNsi) es una clase de moléculas de ARN de doble cadena, 20-25 pares de base en longitud, que interfiere con la expresión de genes específicos con secuencias de nucleótidos complementarias (referido como ARN de interferencia, ARNi).
- 5 Los ARN pequeños nucleares (ARNsn) son moléculas de ARN pequeñas con una longitud promedio de aproximadamente de 150 nucleótidos que, por ejemplo, están implicados en el procesamiento del ARN premensajero (ARNhn) en el núcleo celular de las células eucarióticas. También se incluye por este término los ARN pequeños nucleolares (ARNsno).
- 10 En una modalidad, la molécula de ácido nucleico específica es una molécula específica de ADN o ARN, preferentemente una molécula específica de ARN, con una longitud de menos de 500 (desoxi)ribonucleótidos, o menos de 400 (desoxi)ribonucleótidos, o menos de 300 (desoxi)ribonucleótidos, o menos de 200 (desoxi)ribonucleótidos, o menos de 100 (desoxi)ribonucleótidos, o menos de 50 (desoxi)ribonucleótidos.
- 15 En una modalidad, la molécula de ácido nucleico específica es un ARNmi específico, en donde, preferentemente, la molécula específica de ARNmi se selecciona del grupo que consiste en miR-371a-3p, miR-93-5p, miR-372, miR-373, miR-367 y miR-20a-5p. En una modalidad, el ARNmi específico es miR-371a-3p.
- 20 Los métodos de acuerdo con la presente invención permiten la detección de moléculas de ácido nucleico específicas en el límite inferior de detección. En una modalidad, el término "límite inferior de detección" se refiere al límite inferior de detección proporcionado mediante un enfoque basado en PCR, tal como PCR cuantitativa de tiempo real (qRT-PCR) o PCR digital (dPCR).
- 25 En una modalidad, el término "límite inferior de detección" significa que la concentración de la molécula de ácido nucleico específica en la muestra biológica es $\leq 1 \times 10^{-11}$ M, o $\leq 1 \times 10^{-12}$ M, o $\leq 1 \times 10^{-13}$ M, o $\leq 1 \times 10^{-14}$ M, o $\leq 1 \times 10^{-15}$ M, o $\leq 1 \times 10^{-16}$ M. En una modalidad, el término "límite inferior de detección" significa que la concentración de la molécula de ácido nucleico específica en la muestra biológica está entre 1×10^{-11} M y 1×10^{-17} M, o 1×10^{-12} M y 1×10^{-17} M, o 1×10^{-13} M y 1×10^{-17} M, o 1×10^{-14} y 1×10^{-17} M, o 1×10^{-15} y 1×10^{-17} M, o 1×10^{-16} y 1×10^{-17} M.
- 30 En una modalidad, el término "límite inferior de detección" significa que el número de las moléculas de ácido nucleico específicas en la muestra biológica es $\leq 10\ 000$, o ≤ 5000 , o ≤ 2500 , o ≤ 1000 , o ≤ 500 , o ≤ 250 . En una modalidad, el término "límite inferior de detección" significa que el número de las moléculas de ácido nucleico específicas en la muestra biológica está entre 20 y 10 000, o 20 y 5000, o 20 y 2500, o 20 y 1000, o 20 y 500, o 20 y 250. En una modalidad, el término "límite inferior de detección" significa que el número de las moléculas de ácido nucleico específicas en la muestra biológica está entre 50 y 10 000, o 50 y 5000, o 50 y 2500, o 50 y 1000, o 50 y 500, o 50 y 250. En una modalidad, el término "límite inferior de detección" significa que el número de las moléculas de ácido nucleico específicas en la muestra biológica está entre 100 y 10 000, o 100 y 5000, o 100 y 2500, o 100 y 1000, o 100 y 500, o 100 y 250.
- 40 En una modalidad, las concentraciones o números de la(s) molécula(s) de ácido nucleico específica(s) que se mencionan en la presente descripción se refieren a las concentraciones o números de la(s) molécula(s) de ácido nucleico específica(s) en el lote A que comprende ADN o ADNc aislado/obtenido de la muestra biológica (en donde una molécula específica de ARN se convierte a la molécula correspondiente de ADNc). En una modalidad, las concentraciones o números de la(s) molécula(s) de ácido nucleico específica(s) que se mencionan en la presente descripción se refieren a las concentraciones o números de la(s) molécula(s) de ácido nucleico específica(s) en el ARN aislado/extraído de la muestra biológica.
- 45 En una modalidad, la PCR independiente realizada con cada una de las tres o más alícuotas en la etapa (ii) de los métodos de acuerdo con la presente invención es una reacción de preamplificación de PCR.
- 50 Las muestras biológicas preferidas de acuerdo con la presente invención se seleccionan del grupo que consiste en fluido corporal, tejido, células, lisado celular y sobrenadante de cultivo celular.
- Los fluidos corporales preferidos se seleccionan del grupo que consiste en suero sanguíneo, plasma sanguíneo, fluido hidrocele, fluido espermatocelo, sangre completa, orina, fluido amniótico, exudado, esputo, saliva y fluido cerebrospinal. En una modalidad, el fluido corporal es suero sanguíneo.
- 55 Los tejidos se seleccionan preferentemente del grupo que consiste en tejido nativo, tejido congelado a presión y tejido fijado en formalina y embebido en parafina (FFPE).
- 60 En modalidades particulares, el tejido es tejido tumoral.
- El término "tumor", como se usa en la presente descripción, se refiere a una masa basada en el crecimiento y proliferación de células neoplásicas ya sea maligno (canceroso) o benigno. En una modalidad, el tumor es un tumor sólido. En una modalidad, el tumor se deriva de un cáncer seleccionado del grupo que consiste en leucemias, seminomas, melanomas, teratomas, linfomas, neuroblastomas, gliomas, cáncer testicular, cáncer de vejiga, cáncer rectal, cáncer de endometrio, cáncer de riñón, cáncer adrenal, cáncer de tiroides, cáncer de la sangre, cáncer de piel, cáncer del cerebro, cáncer cervical, cáncer intestinal, cáncer del hígado, cáncer de colon, cáncer del estómago, cáncer del intestino, cáncer de

cabeza y cuello, cáncer gastrointestinal, cáncer del ganglio linfático, cáncer de esófago, cáncer colorrectal, cáncer de páncreas, cáncer de oído, nariz y garganta (ENT), cáncer de mama, cáncer de próstata, cáncer del útero, cáncer de ovarios y cáncer de pulmón y sus metástasis. En una modalidad, el cáncer es cáncer testicular.

5 En una modalidad, el lote A comprende ADNc aislado/obtenido de la muestra biológica.

En una modalidad, la etapa (i) comprende las etapas de:

(ia) aislar el ARN de la muestra biológica; y

(ib) convertir el ARN aislado en la etapa (ia) a ADNc, de esta manera proporcionando el lote A que comprende el ADNc.

10

Los medio y métodos para el aislamiento (o extracción) de ARN, por ejemplo, ARN total o ARNmi, de una muestra biológica se conocen por un experto en la técnica e incluyen kits disponibles comercialmente, tales como el RNeasy Mini Kit y el miRNeasy Mini Kit (ambos de Qiagen).

15

La etapa de convertir el ARN a ADNc se realiza preferentemente mediante transcripción inversa (RT) mediante el uso de la enzima transcriptasa inversa. Los medios y métodos para la transcripción inversa y la síntesis de ADNc se conocen por el experto en la técnica e incluyen kits disponibles comercialmente, tal como el kit TaqMan® microARN RT (Life Technologies).

20

Los enfoques basados en PCR preferidos de acuerdo con la presente invención son PCR cuantitativa de tiempo real (qRT-PCR) y PCR digital (dPCR).

25

En una modalidad, la qRT-PCR es qRT-PCR basada en fluorescencia que comprende el uso de una sonda marcada fluorescentemente. En una modalidad, la sonda marcada fluorescentemente consiste en un oligonucleótido marcado con un colorante fluorescente reportero y un colorante desactivador (= sonda de marcador dual). Los colorantes/porciones fluorescentes reporteras y desactivadoras adecuados se conocen por un experto en la técnica e incluyen, pero no se limitan a los colorantes/porciones reporteras 6-FAM™, JOE™, Cy5® y Cy3® y los colorantes/porciones desactivadoras dabcyf, TAMRA™ y BHQ™-1, -2 o -3. La amplificación del producto específico de la sonda provoca la escisión de la sonda (= desplazamiento de la sonda mediado por la amplificación), de esta manera se genera un aumento en la fluorescencia del reportero. Otros colorantes fluorescentes adecuados para su uso en qRT-PCR basada en fluorescencia incluyen EvaGreen® y SYBR® Green. En general, el aumento de la fluorescencia en la reacción (medido en tiempo real) es directamente proporcional al aumento de los amplificados dianas.

35

La dPCR es un método alternativo a la qRT-PCR convencional para la cuantificación absoluta y detección de las moléculas de ácido nucleico. La dPCR funciona al particionar una muestra de ADN o ADNc en muchas reacciones de PCR individuales, paralelas; algunas de estas reacciones contienen la molécula de ácido nucleico diana (positivas) mientras que otras no (negativas). Una molécula única puede amplificarse un millón de veces o más. Durante la amplificación, se usan sondas marcadas con colorantes para detectar dianas de secuencia específica. Cuando no está presente la secuencia diana, no se acumula señal. Después del análisis de PCR, se usa la fracción de reacciones negativas para generar un conteo absoluto del número de moléculas diana en la muestra, sin la necesidad de estándares o controles endógenos.

40

También se describe en la presente descripción un método para detectar una enfermedad o trastorno en un sujeto o para determinar la extensión/progresión de una enfermedad o trastorno en un sujeto, el método que comprende (a) obtener una muestra biológica del sujeto, y (b) determinar el nivel de expresión de una molécula de ácido nucleico específica en la muestra biológica con un método como se define en la presente descripción, en donde el nivel de expresión de la molécula de ácido nucleico específica en la muestra biológica es indicativo de la presencia, ausencia y/o extensión/progresión de la enfermedad o trastorno en el sujeto. En una modalidad, la enfermedad o trastorno es cáncer, por ejemplo, un cáncer como se define en la presente descripción.

50

El término "sujeto", como se usa en la presente descripción, se refiere a cualquier organismo tal como un vertebrado, particularmente cualquier mamífero, que incluye un humano y otro mamífero, por ejemplo, un animal tal como un roedor, un conejo, o un primate no humano (por ejemplo, un mono). El roedor puede ser un ratón, una rata, un hámster, un cobayo, o una chinchilla. Preferentemente, el sujeto es un humano. En una modalidad, un sujeto es un sujeto con o sospechoso de tener una enfermedad o trastorno, en particular una enfermedad o trastorno como se define en la presente descripción, también designado "paciente" en la presente descripción.

55

La presente invención además se ilustra mediante los siguientes ejemplos, que no deben interpretarse como limitantes del alcance de la invención.

60

EJEMPLOS

Ejemplo Comparativo 1

65

a) aislamiento de ARN

A partir de muestras de suero, se aisló ARN total mediante el uso del kit QIAGEN miRNeasy Mini de acuerdo con las instrucciones del fabricante con menores modificaciones para las muestras de suero: para 200 µl de suero, se usaron 1 ml de QIAzol y 200 µl de cloroformo.

5 b) síntesis de ADNc

Para la cuantificación de miR-371a-3p en las muestras de suero, 6 µl de ARN total se transcribieron de manera inversa mediante el uso del kit TaqMan® microARN RT (Life Technologies) y un conjunto de cebadores que consisten en 1 µl de cada uno de los cebadores en horquilla para miR-371a-3p y miR-93-5p (para normalización) (Life Technologies, ID de ensayo: 002124 (miR-371a-3p) y 000432 (miR-93-5p)).

c) Preamplificación

Debido a la concentración baja de ARN/ARNmi en suero, se realizó una etapa de preamplificación antes de la qRT-PCR. La reacción de preamplificación consistió en 4 µl del producto de la transcripción inversa (RT), 1,12 µl de ensayo (diluido 1:100) cada uno de miR-371a-3p y miR-93-5p, 4 µl de 5x Real Time ready ADNc Pre-Amp Master (Roche, Mannheim, Alemania) y agua libre de nucleasa para adicionar hasta un volumen de reacción total de 20 µl. La preamplificación se realizó a 95 °C durante 1 min, seguido por 14 ciclos de 95 °C durante 15 s y 60 °C durante 4 min. El producto de la preamplificación se diluyó después 1:2 en agua libre de nucleasas y 5 µl del producto de la preamplificación diluido se usaron para la qRT-PCR.

d) Detección de ARNmi mediante PCR cuantitativa de tiempo real (qRT-PCR) mediante el uso de sondas TaqMan®

La reacción de qRT-PCR consistió en 10 µl del FASTstart Universal Probe Master (Roche, Mannheim, Alemania), 1 µl del ensayo específico, y agua libre de nucleasas en un volumen de reacción total de 20 µl. La qRT-PCR se realizó en el Sistema 7500 Fast Real-Time PCR (Life Technologies) con las siguientes condiciones de ciclo: 10 min a 95 °C, después 40 ciclos de 15 s a 95 °C y 1 min a 60° C. La cantidad relativa (RQ) se calculó mediante el uso del método $\Delta\Delta Ct$.

Durante la etapa de preamplificación, a menudo se producen problemas, si la determinación tiene lugar en el límite inferior de detección del método de la qRT-PCR. Las moléculas de ARNmi se pipetearon hacia la síntesis de ADNc y se transcribió 1:1 en moléculas de ADNc. Eso significa que si inicialmente hay sólo una cantidad pequeña de moléculas de ARNmi, esto también resulta sólo en la misma cantidad pequeña de ADNc. Es estadísticamente imposible pipetear nuevamente la misma cantidad exacta de moléculas de ADNc/ARNmi al tubo de reacción para la preamplificación, si los resultados son para ser reproducidos durante otro experimento. La explicación para esto es, que, por ejemplo, están presentes 10 moléculas de ARNmi o ADNc en el tubo completo de reacción. Si una cierta alícuota se pipetea fuera de ese tubo al siguiente tubo de reacción para la preamplificación, debido a la probabilidad estadística, no es posible extraer la misma cantidad de moléculas de ADNc/ARNmi cada vez. Debido a esto es posible que, durante una etapa de pipeteo, 5 moléculas de ADNc/ARNmi, 8 moléculas, 3 moléculas o incluso ninguna de las moléculas se transfieran a la siguiente reacción de preamplificación. Nuestros experimentos han mostrado, que esto es la razón de por qué resultados reproducibles en el límite inferior de detección son muy difíciles o incluso imposible.

En la Tabla 1, se muestran los resultados del análisis de ARNmi de una muestra, que se procesó después del aislamiento del ARN dos veces (A y B) por separado mediante una síntesis individual de ADNc, preamplificación y qRT-PCR. Aquí, puede verse claramente que los valores de Ct del ARNmi-371a-3p de la muestra en la corrida "A" difieren sustancialmente de aquellos obtenidos en la corrida "B". Por el contrario, los valores de Ct del ARNmi-93 de la misma muestra son casi idénticos en cada corrida. Esto resulta en niveles de expresión completamente diferente para la corrida "A" y "B" del ARNmi-371a-3p diana para la misma muestra. Este fenómeno se debe a la distribución estadística de la cantidad extremadamente pequeña de moléculas de ARNmi: si hay, por ejemplo, 1002 moléculas de ARNmi en comparación con 1005 moléculas usadas para la síntesis de ADNc, la diferencia en los valores de Ct después de la preamplificación y qRT-PCR es casi invisible. Pero si hay sólo 2 en comparación con 5 moléculas pipeteadas a la reacción de preamplificación, la diferencia crece exponencialmente durante los ciclos (por ejemplo, 14 ciclos) del proceso de preamplificación, y se detecta una gran diferencia en los niveles de expresión, respectivamente en los valores de Ct después de la qRT-PCR. Asumiendo 100 % de eficiencia de la duplicación durante cada ciclo, después de 14 ciclos de preamplificación 2 moléculas se convierten en 16 384 moléculas y 5 moléculas se convierten en 6 103 515 625 moléculas.

Tabla 1: Resumen de los experimentos que prueba la reproducibilidad de las mediciones en la qRT-PCR (A y B son corridas diferentes de la misma muestra); Nombre de la Diana = ARNmi medido; Ct = Ciclo Umbral; Ct Medio = valor medio de los triplicados de la qRT-PCR).

Nombre de la Muestra	Nombre de la Diana	Ct	Ct medio
8594 A	miR-371a-3p	43,377	43,458
8594 A	miR-371a-3p	43,520	43,458
8594 A	miR-371a-3p	43,476	43,458

ES 2 736 850 T3

5	8594 B	miR-371a-3p	29,493	29,460
	8594 B	miR-371a-3p	29,479	29,460
	8594 B	miR-371a-3p	29,408	29,460
	8594 A	miR-93-5p	12,780	12,791
10	8594 A	miR-93-5p	12,814	12,791
	8594 A	miR-93-5p	12,779	12,791
	8594 B	miR-93-5p	12,580	12,631
	8594 B	miR-93-5p	12,644	12,631
15	8594 B	miR-93-5p	12,670	12,631

Estas diferencias también pueden verse en la Tabla 2, donde se diluye una línea celular (HT 27), que expresa normalmente ARNmi-371a-3p a un nivel muy alto, hasta que se alcanza el límite inferior de detección, de manera que se producen variaciones de los valores de Ct.

Tabla 2: Serie de dilución de un ARNmi; Nombre de la Diana = ARNmi medido; Ct = Ciclo Umbral; Ct Medio = valor medio de los duplicados de la qRT-PCR; indetectable = sin señal detectable durante la qRT-PCR).

Nombre de la Muestra	Nombre de la Diana	Ct	Ct medio	Dilución
1) HT 27 (1)	miR-371a-3p	11,931	11,883	1:250
1) HT 27 (1)	miR-371a-3p	11,836	11,883	
1) HT 27 (2)	miR-371a-3p	12,101	11,998	
1) HT 27 (2)	miR-371a-3p	11,896	11,998	
1) HT 27 (3)	miR-371a-3p	11,985	11,975	
1) HT 27 (3)	miR-371a-3p	11,964	11,975	
2) HT 27 (1)	miR-371a-3p	15,277	15,310	1:2500
2) HT 27 (1)	miR-371a-3p	15,342	15,310	
2) HT 27 (2)	miR-371a-3p	15,394	15,386	
2) HT 27 (2)	miR-371a-3p	15,378	15,386	
2) HT 27 (3)	miR-371a-3p	15,426	15,419	
2) HT 27 (3)	miR-371a-3p	15,412	15,419	
3) HT 27 (1)	miR-371a-3p	18,596	18,582	1:25 000
3) HT 27 (1)	miR-371a-3p	18,569	18,582	
3) HT 27 (2)	miR-371a-3p	18,552	18,548	
3) HT 27 (2)	miR-371a-3p	18,544	18,548	
3) HT 27 (3)	miR-371a-3p	18,797	18,758	
3) HT 27 (3)	miR-371a-3p	18,720	18,758	
4) HT 27 (1)	miR-371a-3p	22,241	22,258	1:250 000
4) HT 27 (1)	miR-371a-3p	22,274	22,258	
4) HT 27 (2)	miR-371a-3p	21,958	21,924	
4) HT 27 (2)	miR-371a-3p	21,889	21,924	
4) HT 27 (3)	miR-371a-3p	21,961	21,958	
4) HT 27 (3)	miR-371a-3p	21,955	21,958	

	5) HT 27 (1)	miR-371a-3p	25,487	25,516	1:2 500 000
5	5) HT 27 (1)	miR-371a-3p	25,546	25,516	
	5) HT 27 (2)	miR-371a-3p	25,355	25,328	
	5) HT 27 (2)	miR-371a-3p	25,301	25,328	
10	5) HT 27 (3)	miR-371a-3p	25,064	25,038	
	5) HT 27 (3)	miR-371a-3p	25,013	25,038	
	6) HT 27 (1)	miR-371a-3p	26,831	26,826	1:25 000 000
15	6) HT 27 (1)	miR-371a-3p	26,820	26,826	
	6) HT 27 (2)	miR-371a-3p	34,186	34,218	
	6) HT 27 (2)	miR-371a-3p	34,251	34,218	
20	6) HT 27 (3)	miR-371a-3p	29,800	29,785	
	6) HT 27 (3)	miR-371a-3p	29,769	29,785	
	7) HT 27 (1)	miR-371a-3p	Indetectable	Indetectable	1:250 000 000
25	7) HT 27 (2)	miR-371a-3p	Indetectable	Indetectable	
	7) HT 27 (2)	miR-371a-3p	Indetectable	Indetectable	
	7) HT 27 (3)	miR-371a-3p	Indetectable	Indetectable	
	7) HT 27 (3)	miR-371a-3p	Indetectable	Indetectable	

30 En otro experimento se usan cantidades definidas de un ARNmi artificial, también llamado cel-ARNmi-39, ilustrativamente para la síntesis de ADNc. Los resultados se muestran en la Tabla 3. Una vez más, se puede ver que a aproximadamente 100 moléculas de ARNmi (aproximadamente 0,000000002 picomol) ocurren diferencias importantes con respecto a los valores de Ct.

35 Tabla 3: dilución de ARNmi cel-ARNmi-39 a nivel molecular; Nombre de la Diana = ARNmi medido; Ct = Ciclo Umbral; Ct Medio = valor medio de los duplicados de la qRT-PCR; Ct MV = valor medio de las tres corridas de preamplificación de la misma muestra; Ct Teórico = valor de Ct, que se determinó matemáticamente, basado en el valor de la concentración más alta; ud = Indetectable, sin señal detectable durante la qRT-PCR).

40

45

50

55

60

65

Nombre de la Muestra	Número de moléculas	Número de moléculas [picomol, pmol]	Concentración [M]	Nombre de la Diana	Ct	Ct medio	Ct MV	Ct Teórico
1. (1)				cel-miR-39-3p	4,067	4,154		
1. (1)				cel-miR-39-3p	4,241	4,154		
1. (2)				cel-miR-39-3p	4,171	4,214		
1. (2)				cel-miR-39-3p	4,257	4,214		
1. (3)				cel-miR 39-3p	4,334	4,308		
1. (3)	$1 \cdot 10^8 = 100\ 000\ 000$	0,00016605388	$4,15 \cdot 10^{-11}$	cel-miR-39-3p	4,283	4,308	4,23	4,20
5. (1)				cel-miR-39-3p	18,928	18,961		
5. (1)				cel-miR-39-3p	18,994	18,961		
5. (2)				cel-miR-39-3p	19,145	19,145		
5. (2)				cel-miR-39-3p	19,145	19,145		
5. (3)				cel-miR-39-3p	19,318	19,335		
5. (3)	$1 \cdot 10^4 = 10\ 000$	0,0000001661	$4,15 \cdot 10^{-15}$	cel-miR-39-3p	19,351	19,335	19,15	17,40
6. (1)				cel-miR-39-3p	22,598	22,578		
6. (1)				cel-miR-39-3p	22,557	22,578		
6. (3)				cel-miR-39-3p	23,052	23,029		

6. (3)					cel-miR-39-3p	23,005	23,029		
6. (2)					cel-miR-39-3p	23,127	23,122		
6. (2)	$1 \cdot 10^3 = 1000$	0,00000000166	$4,15 \cdot 10^{-16}$		cel-miR-39-3p	23,116	23,122	22,91	20,70
7. (1)					cel-miR 39-3p	24,781	24,822		
7. (1)					cel-miR-39-3p	24,863	24,822		
7. (2)					cel-miR-39-3p	27,048	27,042		
7. (2)					cel-miR-39-3p	27,037	27,042		
7. (3)					cel-miR-39-3p	26,229	26,234		
7. (3)	$1 \cdot 10^2 = 100$	0,00000000017	$4,15 \cdot 10^{-17}$		cel-miR-39-3p	26,240	26,234	26,03	24,00
8. (1)					cel-miR-39-3p	ud			
8. (1)					cel-miR-39-3p	ud			
8. (2)					cel-miR-39-3p	ud			
8. (2)					cel-miR-39-3p	ud			
8. (3)					cel-miR-39-3p	ud			
8. (3)	10	0,00000000002	$4,15 \cdot 10^{-18}$		cel-miR-39-3p	ud		ud	27,30
9. (1)					cel-miR-39-3p	ud			

9. (1)					cel-miR-39-3p	ud			
9. (2)					cel-miR-39-3p	ud			
9. (2)					cel-miR-39-3p	ud			
9. (3)					cel-miR-39-3p	ud			
9. (3)	0	0	0	0	cel-miR-39-3p	ud	ud	ud	ud

e) Resumen

Los datos anteriores muestran que el problema de producir resultados confiables en el límite inferior de detección se relaciona con la etapa de preamplificación. Si se realiza una preamplificación para una muestra y se mide este producto de la preamplificación mediante el uso de la qRT-PCR, después esto conduce a resultados cada vez (ver triplicados/duplicados de los ensayos de qRT-PCR en la Tabla 1, Tabla 2, y Tabla 3). Sin embargo, si se realizan varias preamplificaciones de un tubo de reacción de ADNc, y estas preamplificaciones incluyen diferentes cantidades de moléculas de ADNc de acuerdo con la estadística, después esto conduce a diferencias notables en los valores de Ct en las qRT-PCR posteriores. A pesar de los mejores procedimientos de mezcla no es posible distribuir la cantidad pequeña de moléculas de ADNc de la síntesis de ADNc en partes iguales a los tubos de reacción de la preamplificación. Posteriormente, el error aparece y hay una alta variación de los valores de Ct. Esto se explica por la duplicación del número de moléculas con cada uno de los 14 ciclos.

Ejemplo 1

Durante el proceso de preamplificación, la muestra se dividió en tres tubos de reacción después de la síntesis de ADNc. Posteriormente, una qRT-PCR se realizó de manera separada con cada uno de los tres tubos de reacción (ver Tabla 4 y Figura 1). Para considerar la desviación de los valores de Ct y los niveles de expresión diferentes resultantes (aquí ilustrativamente para miR-371a-3p), el valor medio de los tres valores de RQ se determinó matemáticamente (media aritmética) (RQ = cantidad relativa = expresión).

Tabla 4: Resultados de la qRT-PCR; RQ = cantidad relativa; RQ-MV Ct matemático = valor medio matemático de RQ; Media = valor medio de los triplicados de qRT-PCR; indetectable = sin señal detectable durante la qRT-PCR.

Muestra	RQ	RQ-MV Matemática	Ct medio 371a-3p	Ct medio 93
90 (1)	0.000		Indetectable	11.179
90 (2)	9.389	3.130	30.289	11.442
90 (3)	0.000		Indetectable	11.548
71 (1)	14.986		31.809	13.637
71 (2)	22.193	12.393	31.249	13.644
71 (3)	0.000		Indetectable	13.651

Ejemplo 2

La muestra se dividió después de la síntesis de ADNc en tres tubos de reacción para la preamplificación como en el Ejemplo 1. Después de esto, se extrajo un volumen idéntico de cada uno de los tres tubos de reacción de preamplificación y se pipeteó juntos en un tubo de reacción y se mezcló bien para una única qRT-PCR posterior (ver Figura 2).

La preamplificación por triplicado se hizo para compensar las diferencias en los valores de Ct y determinar los niveles de expresión, respectivamente. Estas diferencias pueden compensarse mediante el cálculo del valor medio de los valores de RQ (Ejemplo 1 = valor medio calculado/media aritmética) o, como en el Ejemplo 2, mediante la mezcla de las tres reacciones de preamplificación y mediante el uso de la mezcla en el análisis posterior de la qRT-PCR, de manera que se genera un valor medio metódico/media medida para la interpretación de los resultados. Los resultados de este estudio se enumeran en la Tabla 5.

Tabla 5: Resultados de la qRT-PCR; RQ = cantidad relativa; RQ-MV Ct matemático = valor medio matemático de RQ; Ct Medio = valor medio de los triplicados de la qRT-PCR; indetectable = sin señal detectable durante la qRT-PCR; Zus = la muestra se procesó de acuerdo con el protocolo del Ejemplo 2 (valor medio metódico).

Muestra	RQ	RQ MV Matemática (1),(2),(3)	Ct medio 371a-3p	Ct medio 93
80 (1)	1060,735		24,605	12,578
80 (2)	1853,232		23,906	12,684
80 (3)	1365,875		24,292	12,630
80 Zus (1,2,3)	1582,389	1426,614	24,033	12,583

ES 2 736 850 T3

	129 (1)	154,021		27,944	13,133
	129 (2)	244,851		27,287	13,146
5	129 (3)	420,644		26,453	13,092
	129 Zus (1,2,3)	278,655	273,172	27,084	13,129
	112 (1)	0,000			13,204
10	112 (2)	0,000			13,336
	112 (3)	0,000			13,264
	112 Zus (1,2,3)	0,000	0,000		13,373
15	90 (1)	0,000			11,179
	90 (2)	9,389		30,289	11,442
	90 (3)	0,000			11,548
20	90 Zus (1,2,3)	2,708	3,130	32,007	11,367
	119 (1)	79,004		30,596	14,822
	119 (2)	5,524		34,343	14,731
25	119 (3)	0,000			14,874
	119 Zus (1,2,3)	31,989	28,176	31,995	14,917

30 Tomados en conjunto, los métodos de la presente invención brindan la posibilidad de analizar moléculas de ácido nucleico específicas incluso en el límite inferior de detección de $\sim 0,0000000002$ picomol de una manera exacta y confiable.

REIVINDICACIONES

1. Un método para determinar el nivel de expresión de una molécula de ácido nucleico específica en una muestra biológica, el método que comprende las etapas de:
 - (i) proporcionar un lote A que comprende ADN o ADNc aislado/obtenido de la muestra biológica;
 - (ii) proporcionar tres o más alícuotas del lote A proporcionado en la etapa (i) y realizar una reacción en cadena de la polimerasa independiente (PCR) con cada una de las tres o más alícuotas para amplificar la molécula de ácido nucleico específica, de esta manera proporcionando tres o más lotes B que comprenden la molécula de ácido nucleico específica amplificada; y
 - (iii) mezclar cantidades iguales de los tres o más lotes B, de esta manera proporcionando un lote C, y determinar el nivel de la molécula de ácido nucleico específica en el lote C mediante un enfoque basado en PCR, en donde el nivel determinado en la etapa (iii) corresponde al nivel de expresión de la molécula de ácido nucleico específica en la muestra biológica.
2. Un método para determinar el nivel de expresión de una molécula de ácido nucleico específica en una muestra biológica, el método que comprende las etapas de:
 - (i) proporcionar un lote A que comprende ADN o ADNc aislado/obtenido de la muestra biológica;
 - (ii) proporcionar tres o más alícuotas del lote A proporcionado en la etapa (i) y realizar una reacción en cadena de la polimerasa independiente (PCR) con cada una de las tres o más alícuotas para amplificar la molécula de ácido nucleico específica, de esta manera proporcionando tres o más lotes B que comprenden la molécula de ácido nucleico específica amplificada; y
 - (iii) determinar el nivel de la molécula de ácido nucleico específica en cada uno de los tres o más lotes B mediante un enfoque basado en PCR, en donde el valor medio de los niveles determinados en la etapa (iii) corresponde al nivel de expresión de la molécula de ácido nucleico específica en la muestra biológica.
3. El método de la reivindicación 1 o 2, en donde la concentración de la molécula de ácido nucleico específica en la muestra biológica es $\leq 1 \times 10^{-11}$ M, o $\leq 1 \times 10^{-12}$ M, o $\leq 1 \times 10^{-13}$ M, o $\leq 1 \times 10^{-14}$ M, o $\leq 1 \times 10^{-15}$ M, o $\leq 1 \times 10^{-16}$ M.
4. El método de la reivindicación 3, en donde la concentración de la molécula de ácido nucleico específica en la muestra biológica está entre 1×10^{-11} M y 1×10^{-17} M, o 1×10^{-12} M y 1×10^{-17} M, o 1×10^{-13} M y 1×10^{-17} M, o 1×10^{-14} M y 1×10^{-17} M, o 1×10^{-15} M y 1×10^{-17} M, o 1×10^{-16} M y 1×10^{-17} M.
5. El método de cualquiera de las reivindicaciones 1 a 4, en donde la molécula de ácido nucleico específica se selecciona del grupo que consiste en un ARNmi específico, un ADN circulante libre de célula específico (por ejemplo, un ADN tumoral circulante libre de célula), un ARNm específico, un ARNsi específico y un ARNsn específico.
6. El método de la reivindicación 5, en donde la molécula de ácido nucleico específica es un ARNmi específico, en donde, preferentemente, el ARNmi específico se selecciona del grupo que consiste en miR-371a-3p, miR-93-5p, miR-372, miR-373, miR-367 y miR-20a-5p.
7. El método de cualquiera de las reivindicaciones 1 a 6, en donde la muestra biológica se selecciona del grupo que consiste en fluido corporal, tejido, células, lisado celular y sobrenadante de cultivo celular.
8. El método de la reivindicación 7, en donde el fluido corporal se selecciona del grupo que consiste en suero sanguíneo, plasma sanguíneo, plasma seminal, fluido hidrocele, fluido espermatocele, sangre completa, orina, fluido amniótico, exudado, esputo, saliva y fluido cerebrospinal.
9. El método de la reivindicación 7, en donde el tejido se selecciona del grupo que consiste en tejido nativo, tejido congelado a presión y tejido fijado con formalina y embebido en parafina (FFPE).
10. El método de la reivindicación 7 o 9, en donde el tejido es tejido tumoral.
11. El método de cualquiera de las reivindicaciones 1 a 10, en donde el lote A comprende ADNc aislado/obtenido de la muestra biológica.
12. El método de la reivindicación 11, en donde la etapa (i) comprende las etapas de:
 - (ia) aislar el ARN de la muestra biológica; y
 - (ib) convertir el ARN aislado en la etapa (ia) a ADNc, de esta manera proporcionando el lote A que comprende el ADNc.
13. El método de cualquiera de las reivindicaciones 1 a 12, en donde, en la etapa (ii), se proporcionan tres alícuotas del lote A.

14. El método de cualquiera de las reivindicaciones 1 a 13, en donde el enfoque basado en PCR es PCR cuantitativa de tiempo real (qRT-PCR) o PCR digital (dPCR).
- 5 15. Un método para detectar una enfermedad o trastorno en un sujeto o para determinar la extensión/progresión de una enfermedad o trastorno en un sujeto, el método que comprende determinar el nivel de expresión de una molécula de ácido nucleico específica en una muestra biológica obtenida del sujeto con el método de cualquiera de las reivindicaciones 1 a 14, en donde el nivel de expresión de la molécula de ácido nucleico específica en la muestra biológica es indicativo de la presencia, ausencia y/o extensión/progresión de la enfermedad o trastorno en el sujeto.

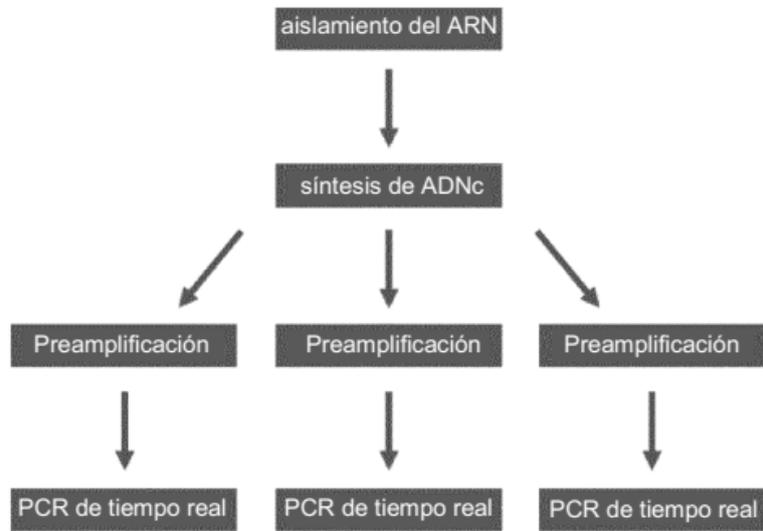


Figura 1

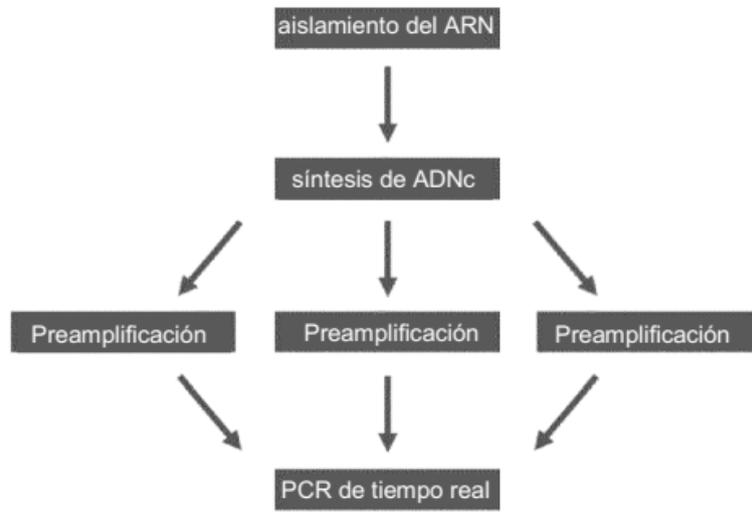


Figura 2