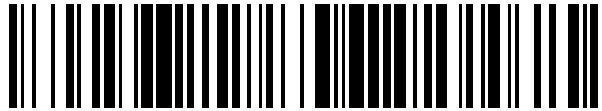


19



OFICINA ESPAÑOLA DE
PATENTES Y MARCAS

ESPAÑA



11 Número de publicación: **2 769 795**

51 Int. Cl.:

C12Q 1/6886 (2008.01)

12

TRADUCCIÓN DE PATENTE EUROPEA

T3

86 Fecha de presentación y número de la solicitud internacional: **04.01.2013 PCT/US2013/020383**

87 Fecha y número de publicación internacional: **11.07.2013 WO13103889**

96 Fecha de presentación y número de la solicitud europea: **04.01.2013 E 13733697 (0)**

97 Fecha y número de publicación de la concesión europea: **13.11.2019 EP 2809810**

54 Título: **Sistema y método de detección de RNAs alterados por cáncer de pulmón en sangre periférica**

30 Prioridad:

06.01.2012 US 201261584097 P

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

29.06.2020

73 Titular/es:

**VIOMICS INC. (100.0%)
445 North Fifth Street
Phoenix, AZ 85004, US**

72 Inventor/es:

**MORRIS, SCOTT y
MALLERY, DAVID**

74 Agente/Representante:

ELZABURU, S.L.P

ES 2 769 795 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

Sistema y método de detección de RNAs alterados por cáncer de pulmón en sangre periférica

Campo de la invención

5 Se proporcionan sistemas y métodos para detección de cáncer por ensayo de extractos de sangre de pacientes. En particular, se proporcionan métodos para detección de niveles de RNA libre circulante (cfRNA) y relaciones que son muy específicas para pacientes con ciertos cánceres.

Antecedentes

10 El cáncer es un riesgo muy importante para la salud en los Estados Unidos e internacionalmente. Existen tratamientos, pero a menudo no se administran a los pacientes hasta que la enfermedad ha progresado a un punto en el cual se ve comprometida la eficacia del tratamiento.

15 Un problema de gran importancia en el tratamiento del cáncer es la identificación precoz de los pacientes en el curso de su enfermedad. Esto es difícil con los métodos actuales, debido que inicialmente las poblaciones de células cancerosas o precancerosas precoces pueden ser asintomáticas y pueden estar localizadas en regiones que son difíciles de acceder por biopsia. Por tanto, un ensayo robusto y mínimamente invasivo que pueda utilizarse para identificar todas las etapas de la enfermedad, con inclusión de las etapas precoces que pueden ser asintomáticas, representaría un beneficio esencial para el tratamiento del cáncer.

WO03/074069 describe FPR1 como un marcador de cáncer y el análisis de la expresión de FPR1 en sangre periférica por PCT. WO03/074069 no contiene descripción alguna de la utilización de ácidos nucleicos libres circulantes de un gen FPR como marcador de cáncer, dejando aparte un marcador para detección de cáncer de pulmón.

20 US2005/153918 describe métodos y materiales diseñados para ensayar ácidos nucleicos y polipeptídicos intracelulares que están asociados con tejidos y tipos de células específicos. US2005/153918 no concierne a los niveles de transcritos FPR1 exentos de células, dejando aparte un nivel de transcritos de FPR1 libre circulante.

Compendio de la invención

25 Los sistemas, dispositivos, kits, y métodos descritos en esta memoria presentan cada uno varios aspectos, ninguno de los cuales es exclusivamente responsable de sus atributos deseables. Sin limitar el alcance de las reivindicaciones, se expondrán ahora brevemente algunos rasgos prominentes. Los componentes, aspectos, y pasos pueden estar también dispuestos y ordenados de modo diferente. Después de la consideración de esta exposición, y particularmente después de la lectura de la sección titulada "Descripción Detallada", se comprenderá el modo en que las características de los dispositivos y métodos descritos en esta memoria proporcionan ventajas sobre otros dispositivos y métodos conocidos.

30 Una realización es un método para detección de una o más moléculas de RNA en muestras tomadas de un paciente. En esta realización, sangre o un componente de sangre tal como plasma se aísla de un paciente que se sospecha padece cáncer de pulmón o cáncer de pulmón no microcítico (NSCLC). El plasma se analiza para medir el nivel de RNA libre circulante (cfRNA) de uno o más genes. En algunas realizaciones, el RNA a medir es ácido ribonucleico mensajero (mRNA), tal como mRNA perteneciente a la población de cfRNA en el plasma de un paciente. En algunas realizaciones, se mide el nivel de RNA de actina beta libre circulante (ACTB). En algunas realizaciones, se mide el nivel de RNA de HNRNPA1 libre circulante. En algunas realizaciones, se mide el nivel de RNA del gen del receptor de formilpéptido (FPR1) libre circulante. En algunas realizaciones, se compara el nivel de cfRNA de FPR1, en comparación con el nivel de cfRNA de ACTB y HNRNPA1, como se expone más adelante, para determinar si un paciente se encuentra en riesgo de padecer cáncer de pulmón o NSCLC. En algunas realizaciones, el NSCLC ensayado es NSCLC de fase I.

35 En algunas realizaciones, se sabe que al menos un subconjunto de uno o más RNAs (subconjunto #2) está presente en el plasma de individuos exentos de cáncer en cantidades relativamente consistentes, y se sabe que está presente a un nivel diferente de este nivel generalmente consistente en individuos con cáncer tal como cáncer de mama, de color o de pulmón. Por ejemplo, los niveles pueden ser consistentemente inferiores en, por ejemplo, pacientes que tienen cáncer de pulmón no microcítico (NSCLC) tal como NSCLC de fase I. En algunas realizaciones, los niveles pueden ser consistentemente mayores en pacientes que tienen cáncer, por ejemplo, pacientes que tienen cáncer de pulmón no microcítico (NSCLC), tal como NSCLC de fase I. En algunas realizaciones, el cáncer de pulmón de dichos individuos no presenta metástasis en los ganglios linfáticos. En algunas realizaciones, el o los RNA seleccionados para el subconjunto #1 puede(n) están presente(s) en niveles inferiores debido a la actividad de nucleasas, y en algunas realizaciones el RNA o región del RNA ensayada puede ser muy sensible a las nucleasas debido a la presencia de sitios de escisión por nucleasas o la presencia de estructuras secundarias (a saber, bicatenarias o monocatenarias) que son escindidas preferentemente por RNAsas. En algunas realizaciones, el RNA seleccionado para el subconjunto #1 puede estar representado en niveles mayores en ciertos pacientes de cáncer, tales como
40
45
50
55 pacientes de cáncer de pulmón. En algunas realizaciones, el cambio en los niveles de acumulación de RNA en el

subconjunto #1 puede ser debido a efectos de moléculas secretadas por cánceres o células inmunes que se encuentran en estrecha proximidad a tumores en otros tejidos no malignos.

5 En alguna realización, los RNAs en el subconjunto #1 se liberan en la sangre a niveles incrementados en pacientes de cáncer debido a uno o más de los siguientes: 1) liberación preferencial de células en la sangre, 2) abundancia incrementada en células tumorales, 3) abundancia incrementada en células próximas al tumor (es decir células reactivas o estroma), 4) abundancia incrementada de células no próximas al tumor, mediadas por señales secretadas.

Puede conocerse otro subconjunto de uno o más RNAs (subconjunto #2) que está expresado establemente en todos los individuos con indiferencia de su estado de cáncer. En algunas realizaciones, los RNAs en el subconjunto #2 son menos sensibles a las ribonucleasas.

10 En algunas realizaciones, la abundancia relativa de marcadores del subconjunto #1 y el subconjunto #2 puede ser indicativo de la presencia de células cancerosas, tumores, o células con un potencial aumentado de volverse cancerosas, y en otras realizaciones, los niveles de acumulación de marcadores en el subconjunto #1 solos pueden ser indicativos de células cancerosas, tumores, o células con un potencial aumentado de volverse cancerosas. En algunas realizaciones, los niveles de RNA de un miembro o miembros del subconjunto #2 pueden variar inversamente con los niveles de un miembro o miembros del subconjunto #1, de tal manera que la ratio de los niveles es indicativa de estado de cáncer.

20 En algunas realizaciones, se utiliza PCR digital o PCR en tiempo real como método de detección para determinar la presencia o niveles de acumulación de marcadores de RNA. En algunas realizaciones, puede utilizarse la secuenciación de DNA como método de detección para determinar la cantidad de marcadores de RNA. En otras realizaciones, la detección puede tener lugar por tecnologías de códigos de barras moleculares tecnologías tales como NanoString o nCounter.

25 En algunas realizaciones, se analizan los resultados de número de copias de RNA y/o DNA para determinar un resultado de ensayo (a saber, resultado positivo o negativo) basándose al menos en parte en distancias estadísticas entre resultados. En algunos aspectos, los pacientes pueden clasificarse en grupos de riesgo diferentes basándose al menos en parte en el análisis de la abundancia relativa de marcadores como se describe en esta memoria. Puede utilizarse la función de distribución acumulativa de la distribución normal, binomial y/o de Poisson o funciones similares para determinar la abundancia relativa de RNAs. En algunas realizaciones, el tipo de cáncer presente en un paciente puede predecirse al menos en parte sobre los resultados de la expresión de RNA.

Breve descripción de los dibujos de las Figuras

30 Las Figs. 1A, 1B y 1C representan diagramas de recuadro de niveles de acumulación para los marcadores FPR1, ACTB y HNRNPA1, respectivamente, de plasma tomado de individuos normales e individuos que se sabe tienen uno o más tumores. El eje Y indica el nivel de acumulación de transcritos por ml de plasma ensayado, normalizado contra los niveles de acumulación medidos en RNA Universal Humano de Referencia, representado en logaritmos naturales. Conforme a la convención estándar para cuadros de texto, la línea horizontal central en cada columna representa la mediana, el recuadro representa los cuartiles de 25%-75% y las barras de error indican las observaciones extremas (con exclusión de los valores aberrantes). Todas las unidades son ratios de niveles de acumulación de transcritos por ml de plasma ensayado con relación a los niveles de acumulación de transcritos similares obtenidos a partir de 1 ng de RNA Universal Humano de Agilent.

40 La Fig. 2 representa diagramas de dispersión bidimensionales de valores de ratios ACTB y HNRNPA1 normalizados para los valores de FPR1. Para cada muestra, el eje X es la ratio de FPR1/ACTB y el eje Y es la ratio de FPR1/HNRNPA1.

45 La Fig. 2A representa diagramas de dispersión bidimensionales de ratios ACTB y HNRNPA1 normalizados para los valores de FPR1, en donde los valores de la muestra están normalizados para valores determinados a partir de RNA obtenido de un control de líneas de células. La línea de trazos A separa la mayoría de los valores obtenidos a partir de pacientes Normales. La línea de trazos B separa la mayoría de los valores obtenidos a partir de pacientes de NSCLC. Los valores entre las líneas de trazos A y B representan el grado mínimo de solapamiento entre los valores Normales máximos y los valores NSCLC mínimos.

50 La Fig. 2B representa diagramas de dispersión bidimensionales de ratios ACTB y HNRNPA1 normalizados para los valores de FPR1, en donde los valores de la muestra están normalizados para valores determinados a partir de RNA obtenido de un estándar sintético. La línea diagonal de trazos que pasa por los puntos (0,1, 10), (1, 1) and (10, 0,1) separa una población de muestras normales (círculos llenos blancos) de una población de muestras predominantemente NSCLC (círculos llenos negros).

Descripción detallada

55 Una realización se refiere a sistemas y métodos para la determinación de si un paciente en riesgo de cáncer puede presentar la enfermedad por análisis de ácidos nucleicos circulantes en la sangre. La determinación de pacientes que pueden tener cáncer puede hacerse sobre especímenes derivados de sangre para ensayar los niveles de acumulación

- de RNA, y dicho análisis puede conducirse por microrredes de expresión, secuenciación, nCounter o PCR en tiempo real. En algunas realizaciones, los niveles de expresión de un primer subconjunto de ácidos nucleicos de control se comparan con niveles de expresión de un segundo subconjunto de ácidos nucleicos que se sabe están incrementados en pacientes que tienen cáncer. El primer subconjunto de ácidos nucleicos de control puede encontrarse por análisis del plasma de muchos pacientes exentos de enfermedad y selección de genes que se expresan a niveles estables en tales pacientes. Los subconjuntos pueden encontrarse también por análisis de especímenes de tejido sólido tomados de tipos de tejidos múltiples (a saber, colon, pulmón, riñón, hígado, etc.), y selección de genes que se expresan como ácidos nucleicos libres circulantes a niveles estables en la sangre de un paciente.
- En algunas realizaciones, el Subconjunto #1 puede seleccionarse por análisis de genes cuyos niveles de acumulación de transcritos aumentan en plasma o en especímenes de tumor sólido.
- En algunas realizaciones, el Subconjunto #1 incluye genes cuyos niveles de ácido nucleico libre circulante disminuyen en plasma o en especímenes de tumor sólido tomados de individuos que padecen cáncer.
- En algunas realizaciones, el Subconjunto #1 comprende genes cuyos niveles de acumulación de transcritos están inalterados en individuos normales comparados con pacientes de cáncer. El subconjunto #2 se selecciona en combinación con uno o más genes del subconjunto #1 cuyos niveles de acumulación aumentan en plasma o en especímenes de tumores sólidos.
- En alguna realización, los aspectos de la invención se refieren al descubrimiento de que los niveles de RNA del gen del receptor de formilpéptido (FPR1) en RNA libre circulante (cfRNA) cambian en los pacientes que padecen cáncer. Por ejemplo, se encontró que los niveles de cfRNA de FPR1 aumentan en pacientes que tienen cáncer de pulmón, como se describe más adelante. Además, se demostró que los niveles de cfRNA de FPR1 aumentan en comparación con los niveles de cfRNA de otros genes, tales como ACTB y HNRNPA1 u otros transcritos comprendidos en el subconjunto #2.
- Como se muestra en la Fig. 1A y se describe con referencia al Ejemplo 1, la Fig. 1A representa niveles de acumulación de transcritos para el gen FPR1 en muestras medidas de plasma tomado de pacientes clasificados en cuanto a estado de cáncer como con células normales (es decir, supuestamente exentos de cáncer) y con células tumorales (es decir, que tienen células tumorales conocidas). Los valores logarítmicos del eje Y indican que el transcrito de FPR1 se acumula como promedio a un nivel aproximadamente 100 veces mayor en los pacientes con células tumorales comparado con pacientes normales.
- Fig. 1B y Fig. 1C representan niveles de acumulación de transcritos para los genes ACTB and HNRNPA1, respectivamente, en muestras medidas de plasma tomado de pacientes clasificados en cuanto a estado de cáncer como con células normales (es decir, supuestamente exentos de cáncer) y con células tumorales (es decir, que tienen células tumorales conocidas). Los valores logarítmicos del eje Y indican que los transcritos de ACTB and HNRNPA1 se acumulan como promedio a niveles que son comparables en los pacientes normales y en aquéllos que tienen células tumorales.
- En algunas realizaciones, una vez que se conoce el subconjunto #1, puede seleccionarse el subconjunto #2 por análisis de un gran número de candidatos a partir de especímenes múltiples y selección de aquéllos para los cuales la diferencia entre el subconjunto #2 y el subconjunto #1 es máxima en plasma de pacientes de cáncer. En algunas realizaciones, el subconjunto #2 puede seleccionarse examinando los niveles de acumulación de transcritos de muchos genes y encontrando cuáles tienen la variabilidad mínima. En algunas realizaciones, los genes se seleccionan basándose no en sus niveles de acumulación individuales, sino en la falta de cambio en sus niveles de acumulación relativos en el cáncer.
- Figs. 1A-C indican que FPR1 y ACTB, FPR1 y HNRNPA1, o FPR1 y ambos ACTB y HNRNPA1 son combinaciones adecuadas de genes del subconjunto #1 y el subconjunto #2 para los métodos descritos en esta memoria.
- Una vez que el subconjunto #1 (y el subconjunto #2 en algunas realizaciones) se conocen dentro de un tipo de cáncer dado, el perfil de expresión puede medirse en plasma tomado de pacientes de cáncer y pacientes para los cuales debe ensayarse un cáncer. Dado que el plasma puede recogerse y prepararse en muchas consultas médicas de atención primaria sin plantear más riesgo que una extracción de sangre estándar, los niveles de acumulación relativos de cfRNA entre los subconjuntos #1 y #2 en algunas realizaciones pueden ser un biomarcador de cáncer valioso. Adicionalmente, si los subconjuntos #1 y #2 pueden ensayarse fiablemente en algunas realizaciones, los mismos pueden presentar numerosas ventajas sobre los ensayos de cáncer actuales. Por ejemplo, en algunas realizaciones este método puede detectar cáncer en una etapa precoz de desarrollo, cáncer que presenta pocos síntomas, cáncer que es difícil de distinguir de condiciones benignas o cáncer que puede desarrollarse en un área del cuerpo que puede no ser accesible a los ensayos de biopsia tradicionales.
- En los tumores está presente a menudo actividad de RNasa incrementada. Esta actividad de RNasa puede inhibir el crecimiento del tumor, y puede formar parte de la respuesta del sistema inmune al cáncer. Las células T citotóxicas pueden conducir a apoptosis de las células de cáncer por la vía de IFN- γ , y esta apoptosis puede dar como resultado la activación de RNasas, tales como la RNasa L. La muerte de células por necrosis, que puede estar causada por hipoxia debida a crecimiento del tumor, puede contribuir también a la liberación de RNasas. Es sabido que el plasma

de los pacientes de cáncer de pulmón tiene actividad aumentada de RNasa (Marabella et al., (1976) "Serum ribonuclease in patients with lung carcinoma," *Journal of Surgical Oncology*, 8(6):501-505; Reddi et al. (1976) "Elevated serum ribonuclease in patients with pancreatic cancer," *Proc. Nat'l. Acad. Sci. USA* 73(7):2308-2310). Se sabe también que las células de pulmón contienen RNasas similares a las encontradas en plasma (Neuwelt et al., (1978) "Possible Sites of Origin of Human Plasma Ribonucleases as Evidenced by Isolation and Partial Characterization of Ribonucleases from Several Human Tissues," *Cancer Research* 38:88-93).

Cuando están presentes niveles mayores de RNasa en plasma, cualquier RNA libre es susceptible de degradarse más rápidamente. Así, puede haber menos RNA detectable en preparaciones de RNA plasmático. Si bien todo el RNA puede estar presente a niveles reducidos, sólo es posible detectar esta diferencia con algún nivel de exactitud cuando la variabilidad normal de un gen es baja. Por ejemplo, si el intervalo normal de expresión de un gen está comprendido entre 10 y 100 unidades, puede ser difícil detectar exactamente una disminución de 1 unidad. En cambio, si la expresión de un gen está comprendida normalmente entre 10 y 11 unidades, una disminución de 1 unidad es fácilmente detectable (es decir, cualquier número por debajo de 10 unidades indicaría una disminución).

FPR1 juega papeles múltiples en los pulmones y el cáncer. FPR1 se expresa en los fibroblastos de pulmón (VanCompernelle et al. (2003) *J Immunol.* 171(4):2050-6) y es necesario para la curación de heridas en los pulmones (Shao (2011) *Am J Respir Cell Mol Biol* 44:264-269). Es sabido que los fibroblastos son importantes tanto en la atracción de células inmunes que combaten el tumor (Gemperle (2012) *PLOSOne* 7(11):1-7, e50195) como en la creación de estroma que protege el tumor (Wang (2009) *Clin Cancer Res* 15(21) 6630-6638). FPR1 puede exacerbar también la actividad de otros oncogenes en los tumores (Huang (2007) *Cancer Res* 67(12):5906-5913). No hay evidencia alguna de que el mismo se sobreexpresen en los cánceres de pulmón, pero se sabe que FPR1 está regulado por estabilización del RNA (Mandal (2007) *J Immunol* 178:2542-2548, Mandal (2005) *J Immunol* 175:6085-6091). Dados estos papeles, es posible que el RNA de FPR1 sea secretado deliberadamente por las células tumorales para aumentar el crecimiento del tumor (es decir, por activación de los sistemas de curación de heridas para su crecimiento o por crecimiento de estroma protector) o por las células inmunes para aumentar la respuesta inmune (es decir, por atracción de células inmunes adicionales).

En algunas realizaciones, el método puede comenzar por extracción de cfRNA de una muestra del paciente y ensayo del cfRNA extraído. Véase, v.g. O'Driscoll, L. et al. (2008) "Feasibility and relevance of global expression profiling of gene transcripts in serum from breast cancer patients using whole genome microarrays and quantitative RT-PCR." *Cancer Genomics Proteomics* 5:94-104. En algunas realizaciones, se utiliza un método consistente y repetible para aislar cfRNA de plasma u otra fuente de RNA a fin de asegurar la fiabilidad de los datos. Para obtener cfRNA a partir de sangre, puede utilizarse el protocolo citado más adelante, aunque se contemplan también otros métodos.

Las moléculas de cfRNA pueden purificarse a partir de plasma u otras muestras utilizando, por ejemplo, el kit de ácido nucleico circulante QIAamp de Qiagen. El protocolo en este kit se describe en el documento "QIAamp Circulating Nucleic Acid Handbook", 2ª edición, enero 2011. Este protocolo proporciona una realización de un método para purificar el ácido nucleico total circulante a partir de 1 ml de plasma. Resumidamente, se añaden reactivos de lisis y proteasas junto con RNA portador inerte. El ácido nucleico total (DNA y RNA) se fija a una columna, y la columna se lava múltiples veces, eluyéndose luego el ácido nucleico de la misma.

Por ejemplo, el protocolo puede realizarse por ejecución de los pasos siguientes. Pipetear 100 µl, 200 µl, o 300 µl de Proteinasa K QIAGEN en un tubo de centrifuga de 50 ml. Añadir 1 ml, 2 ml, o 3 ml de suero o plasma al tubo de 50 ml. Añadir 0,8 ml, 1,6 ml, o 2,4 ml de tampón ACL (que contiene 1,0 µg de RNA portador). Cerrar el tapón y mezclar agitando vorticialmente a impulsos durante 30 s, asegurándose de que se forma un remolino visible en el tubo. A fin de asegurar una lisis eficiente, mezclar concienzudamente la muestra y el tampón ACL, para producir una solución homogénea. El procedimiento no debería interrumpirse en este momento.

Para comenzar la incubación de la lisis, incubar a 60 °C durante 30 min. Poner de nuevo el tubo en el banco de laboratorio y añadir 1,8 ml, 3,6 ml, o 5,4 ml de tampón ACB al lisado en el tubo. Cerrar el tapón y mezclar concienzudamente agitando vorticialmente a impulsos durante 15-30 s. Incubar la mezcla lisado-tampón ACB en el tubo durante 5 min en hielo. Insertar la columna QIAamp Mini al conector de vacío VacConnector en el QIAvac 24 Plus. Insertar un extendedor de tubo de 20 ml en la columna QIAamp Mini abierta. Asegurarse de que el extendedor de tubo está insertado firmemente en la Columna QIAamp Mini a fin de evitar fuga de muestra.

Mantener el tubo de recogida durante la centrifugación seca, abajo. Aplicar cuidadosamente la mezcla lisado-tampón ACB en el extendedor de tubo de la Columna QIAamp Mini. Conectar la bomba de vacío. Cuando todos los lisados se han extraído completamente por medio de las columnas, desconectar la bomba de vacío y reducir la presión a 0 mbar. Retirar cuidadosamente el extendedor de tubo y desecharlo. Tener en cuenta, por favor, que volúmenes grandes de lisado de la muestra (aproximadamente 11 ml si se parte de 3 ml de muestra) pueden requerir hasta 10 min para pasar a través de la membrana Mini QIAamp por fuerza de vacío. Para una disminución rápida y cómoda de la presión de vacío, debería utilizarse el Regulador de Vacío (parte del QIAvac Connecting System). A fin de evitar la contaminación cruzada, tener cuidado de no mover los extendedores de tubo en las Columnas QIAamp Mini próximas.

Aplicar 600 µl de tampón ACW1 a la columna Mini QIAamp. Dejar la tapa de la columna abierta, y conectar la bomba de vacío. Después que ha sido aspirada la totalidad del tampón ACW1 a través de la columna Mini QIAamp,

desconectar la bomba de vacío y reducir la presión a 0 mbar. Aplicar 750 µl de tampón ACW2 a la columna QIAamp Mini. Dejar abierta la tapa de la columna, y conectar la bomba de vacío. Después que ha sido aspirada la totalidad del tampón ACW2 a través de la columna QIAamp Mini, desconectar la bomba de vacío y reducir la presión a 0 mbar. Aplicar 750 µl de etanol (96-100%) a la columna QIAamp Mini. Dejar abierta la tapa de la columna, y conectar la bomba de vacío. Después que ha sido aspirada la totalidad del etanol a través de la columna de centrifugación, desconectar la bomba de vacío y reducir la presión a 0 mbar. Cerrar la tapa de la columna QIAamp Mini. Retirar la misma del colector de vacío, y desechar el Conector de Vacío. Poner la columna QIAamp Mini en un tubo de recogida limpio de 2 ml, y centrifugar a velocidad total (20,000 x g; 14,000 rpm) durante 3 min.

Poner la columna QIAamp Mini en un tubo de recogida nuevo de 2 ml. Abrir la tapa, e incubar el conjunto a 56 °C durante 10 min para secar completamente la membrana. Poner la columna QIAamp Mini en un tubo de elución limpio de 1,5 ml (proporcionado) y desechar el tubo de recogida de 2 ml del paso 14. Aplicar cuidadosamente 20-150 µl de tampón AVE al centro de la membrana QIAamp Mini. Cerrar la tapa e incubar a la temperatura ambiente durante 3 min. Asegurarse de que el tampón de elución AVE está equilibrado a la temperatura ambiente (15-25 °C). Si la elución se hace en volúmenes pequeños (<50 µl) el tampón de elución tiene que dispensarse en el centro de la membrana para elución completa del DNA fijado. El volumen de elución es flexible y puede adaptarse conforme a los requerimientos de las aplicaciones aguas abajo. El volumen de eluato recuperado será hasta 5 µl menor que el volumen de elución aplicado a la columna QIAamp Mini. Centrifugar en una microcentrífuga a velocidad total (20.000 x g; 14.000 rpm) durante 1 min para eluir los ácidos nucleicos. El QIAamp Circulating Nucleic Acid Handbook 1/2011 del ejemplo anterior es representativo del conocimiento de un experto en la técnica, e ilustrativo más bien que limitante.

Las muestras producidas por este método pueden ser muy puras y estar exentas de inhibidores de PCR, y pueden ser adecuadas para qPCR como se utiliza en algunas realizaciones para ensayar la expresión relativa de cfrRNA como un ensayo de, por ejemplo, diversos tipos de cáncer.

En algunas realizaciones, los métodos incluyen la ejecución de PCR o qPCR para generar un amplicón. Se conocen en la técnica y se ilustran más adelante en esta memoria numerosos protocolos PCR y qPCR diferentes que pueden aplicarse directamente o adaptarse para uso utilizando las composiciones aquí descritas para la detección y/o identificación de

Algunas realizaciones proporcionan métodos que incluyen PCR cuantitativa (qPCR) (a la que se hace referencia también como PCR en tiempo real). La qPCR puede proporcionar medidas cuantitativas, y proporcionar también las ventajas de tiempo y contaminación reducidos. Como se utiliza en esta memoria, "PCR cuantitativa" ("qPCR" o más específicamente "qPCR en tiempo real") se refiere a la monitorización del progreso de una amplificación PCR directa a medida que ocurre la misma sin necesidad de muestreo repetido de los productos de reacción. En la qPCR, los productos de reacción pueden monitorizarse por un mecanismo de señalización (e.j., fluorescencia) a medida que se generan y se rastrean después que la señal aumenta por encima de un nivel de ruido de fondo, pero antes que la reacción alcance una meseta. El número de ciclos requerido para alcanzar un nivel detectable o "umbral" de fluorescencia (al que se hace referencia en esta memoria como umbral de ciclo o "CT") varía directamente con la concentración de dianas amplificables al comienzo del proceso PCR, permitiendo una medida de la intensidad de señal para proporcionar una medida de la cantidad de ácido nucleico diana en una muestra en tiempo real.

Los métodos para la preparación de PCR y qPCR son bien conocidos por los expertos en la técnica. La mezcla de reacción comprende como mínimo ácido nucleico molde (p.ej., como el que está presente en las muestras de test, excepto en el caso de un control negativo como se describe más adelante) y cebadores oligonucleotídicos y/o sondas en combinación con tampones adecuados, sales, y una concentración apropiada de una polimerasa de ácido nucleico. Como se utiliza en esta memoria, "polimerasa de ácido nucleico" se refiere a una enzima que cataliza la polimerización de nucleósido-trifosfatos. Generalmente, la enzima iniciará la síntesis en el extremo 3' del cebador reasociado a la secuencia diana, y progresará en la dirección 5'-3' a lo largo del molde hasta que termina la síntesis. Una concentración apropiada incluye una que cataliza esta reacción en los métodos descritos actualmente. DNA polimerasas conocidas útiles en los métodos descritos en esta memoria incluyen, por ejemplo, DNA polimerasa I de E. coli, DNA polimerasa T7, DNA polimerasa de Thermus thermophilus (Tth), DNA polimerasa de Bacillus stearothermophilus, DNA polimerasa de Thermococcus litoralis, DNA polimerasa de Thermus aquaticus (Taq) y DNA polimerasa de Pyrococcus furiosus (Pfu), DNA polimerasa FASTSTART™ Taq, DNA polimerasa APTATAQ™ (Roche), DNA polimerasa KLENTAQ 1™ (AB peptides Inc.), DNA polimerasa HOTGOLDSTAR™ (Eurogentec), DNA polimerasa KAPATAQ™ HotStart, DNA polimerasa KAPA2G™ Fast HotStart (Kapa Biosystemss), DNA Polimerasa PHUSION™ Hot Start (Finnzymes), o similares.

Además de los componentes anteriores, la mezcla de reacción de los presentes métodos incluye cebadores, sondas, y desoxirribonucleosido-trifosfatos (dNTPs).

Usualmente, la mezcla de reacción comprenderá además cuatro tipos diferentes de dNTPs correspondientes a las cuatro bases de nucleósidos existentes naturalmente, es decir dATP, dTTP, dCTP, y dGTP. En algunas realizaciones, cada dNTP estará presente típicamente en una cantidad que oscila desde aproximadamente 10 a 5000 µM, por lo general desde aproximadamente 20 a 1000 µM, aproximadamente 100 a 800 µM o aproximadamente 300 a 600 µM.

La mezcla de reacción puede incluir además un medio tampón acuoso que incluye una fuente de iones monovalentes, una fuente de cationes divalentes, y un agente de tamponamiento. Puede utilizarse cualquier fuente conveniente de iones monovalentes, tal como cloruro de potasio, acetato de potasio, acetato de amonio, glutamato de potasio, cloruro de amonio, o sulfato de amonio. El catión divalente puede ser magnesio, manganeso, zinc, siendo el catión típicamente magnesio. Puede utilizarse cualquier fuente conveniente de catión magnesio, con inclusión de cloruro de magnesio y acetato de magnesio. La cantidad de magnesio presente en el tampón puede estar comprendida entre 0,5 y 10 mM, y puede oscilar desde aproximadamente 1 a aproximadamente 6 mM, o aproximadamente 3 a aproximadamente 5 mM. Agentes tampón o sales representativos que pueden estar presentes en el tampón incluyen Tris, Tricina, HEPES, MOPS, donde la cantidad de agente tampón estará comprendida típicamente entre aproximadamente 5 y 150 mM, por lo general desde aproximadamente 10 a 100 mM, y será más usualmente del orden de 20 a 50 mM, donde el agente tampón estará presente en una cantidad suficiente para proporcionar un pH que oscila desde aproximadamente 6,0 a 9,5, por ejemplo, aproximadamente pH 6,0, 6,5, 7,0, 7,5, 8,0, 8,5, 9,0, o 9,5. Otros agentes que pueden estar presentes en el medio tampón incluyen agentes quelantes, tales como EDTA y EGTA. En algunas realizaciones, la mezcla de reacción puede incluir BSA, o similares. Adicionalmente, en algunas realizaciones, las reacciones pueden incluir un crioprotector, tal como trehalosa, particularmente cuando los reactivos se proporcionan como una mezcla madre, que puede guardarse a lo largo del tiempo.

En la preparación de una mezcla de reacción, los diversos componentes que la constituyen pueden combinarse en cualquier orden conveniente. Por ejemplo, el tampón puede combinarse con el cebador, la polimerasa y luego con el ácido nucleico molde, o la totalidad de los diversos componentes que constituyen la mezcla pueden combinarse al mismo tiempo para producir la mezcla de reacción.

Como alternativa, pueden utilizarse en los métodos descritos en esta memoria reactivos premezclados disponibles comercialmente, conforme a las instrucciones del fabricante, o modificarse para mejorar las condiciones de reacción (p.ej. ,modificación de la concentración de tampón, concentración de cationes, o concentración de dNTP, según sea necesario), que incluyen, por ejemplo, mezclas PCR Quantifast (Qiagen), Mezcla Madre PCR Universal TAQMAN® (Applied Biosystems), OMNIMIX® o SMARTMIX® (Cepheid), IQ™ Supermix (Bio-Rad Laboratories), FastStart LIGHTCYCLER® (Roche Applied Science, Indianapolis, IN), o Mezcla Madre QPCR BRILLIANT® (Stratagene, La Jolla, CA).

La mezcla de reacción puede someterse a condiciones de reacción con extensión de cebadores (“condiciones suficientes para proporcionar productos de amplificación de ácido nucleico basados en polimerasa”), es decir, condiciones que permiten la extensión de cebadores mediada por polimerasa por adición de nucleótidos al extremo de la molécula cebadora que utiliza la cadena molde como plantilla. En muchas realizaciones, las condiciones de la reacción de extensión de cebadores son condiciones de amplificación, condiciones que incluyen una pluralidad de ciclos de reacción, donde cada ciclo de reacción comprende: (1) un paso de desnaturalización, (2) un paso de reasociación, y (3) un paso de polimerización. Como se expone más adelante, en algunas realizaciones, el protocolo de amplificación no incluye un tiempo específicos dedicado a la reasociación, y en su lugar comprende únicamente tiempos específicos dedicados a desnaturalización y extensión. El número de ciclos de reacción variará dependiendo de la aplicación que se realice, pero usualmente será al menos 15, más usualmente al menos 20, y puede ser tan alto como 60 o mayor, estando comprendido típicamente el número de ciclos diferentes entre aproximadamente 20 y 40. Para métodos en los que se realizan más de aproximadamente 25, usualmente más de aproximadamente 30 ciclos, puede ser conveniente o deseable introducir polimerasa adicional en la mezcla de reacción a fin de que se mantengan condiciones adecuadas para la extensión de cebadores enzimáticos.

El paso de desnaturalización comprende calentar la mezcla de reacción a una temperatura elevada y mantener la mezcla a la temperatura elevada durante un periodo de tiempo suficiente para que cualquier ácido nucleico bicatenario o hibridado presente en la mezcla de reacción se disocie. Para la desnaturalización, la temperatura de la mezcla de reacción se elevará usualmente, y se mantendrá a una temperatura comprendida entre aproximadamente 85 y 100 °C, usualmente desde aproximadamente 90 a 98 °C, y más usualmente desde aproximadamente 93 a 96 °C, durante un periodo de tiempo que varía desde aproximadamente 3 a 120 s, por lo general de aproximadamente 3 s.

Después de la desnaturalización, la mezcla de reacción puede someterse a condiciones suficientes para la reasociación de los cebadores al ácido nucleico molde presente en la mezcla (si está presente ésta), y para la polimerización de nucleótidos en los extremos de los cebadores de una manera tal que el cebador se extiende en una dirección 5' a 3' utilizando el ácido nucleico al cual está hibridado el mismo como molde, es decir, condiciones suficientes para la producción enzimática del producto de extensión del cebador. En algunas realizaciones, los procesos de reasociación y extensión ocurren en el mismo paso. La temperatura a la que se reduce la mezcla de reacción para alcanzar estas condiciones se seleccionará habitualmente para proporcionar eficiencia y especificidad óptimas, y por lo general oscilará desde aproximadamente 50 a 85 °C, habitualmente desde aproximadamente 55 a 70°C, y más habitualmente desde aproximadamente 60 a 68°C. En algunas realizaciones, las condiciones de reasociación pueden mantenerse durante un periodo de tiempo que va desde aproximadamente 15 s a 30 min, por lo general desde aproximadamente 20 s a 5 min, o aproximadamente 30 s a 1 min, o aproximadamente 30 s.

Este paso puede comprender opcionalmente uno de cada uno de un paso de reasociación y un paso de extensión con variación y optimización de la temperatura y duración para cada paso. En una reasociación y extensión de dos pasos, el paso de reasociación se deja transcurrir como anteriormente. Después de la reasociación del cebador al ácido

5 nucleico molde, la mezcla de reacción se someterá ulteriormente a condiciones suficientes para proporcionar la polimerización de los nucleótidos a los extremos del cebador como anteriormente. Para alcanzar las condiciones de polimerización, la temperatura de la mezcla de reacción se elevará típicamente hasta o se mantendrá a una temperatura comprendida entre aproximadamente 65 y 75 °C, por lo general entre aproximadamente 67 y 73 °C y se mantendrá durante un periodo de tiempo comprendido entre aproximadamente 15 s y 20 min, por lo general entre aproximadamente 30 s y 5 min. En algunas realizaciones, los métodos descritos en esta memoria no incluyen un paso separado de reasociación y extensión. En lugar de ello, los métodos incluyen pasos de desnaturalización y extensión, sin paso alguno dedicado específicamente a reasociación.

10 Los ciclos anteriores de desnaturalización, reasociación, y extensión pueden realizarse utilizando un dispositivo automático, conocido típicamente como ciclador térmico. Cicladores térmicos que pueden utilizarse se describen en otro lugar de esta memoria, así como en las Patentes U.S. Núms. 5.612.473; 5.602.756; 5.538.871; y 5.475.610.

15 Los métodos descritos en esta memoria pueden utilizarse también en aplicaciones no basadas en PCR para detectar una secuencia de ácido nucleico diana, donde dicha diana puede estar inmovilizada sobre un soporte. Métodos de inmovilización de una secuencia de ácido nucleico sobre un soporte sólido se conocen en la técnica y se describen en Ausubel et al, eds. (1995) *Current Protocols in Molecular Biology* (Greene Publishing y Wiley-Interscience, NY), y en protocolos proporcionados por los fabricantes, por ejemplo, para membranas: Pall Corporation, Schleicher & Schuell; para cuentas magnéticas: Dynal; para placas de cultivo: Costar, Nalgenunc; para plataformas de redes de cuentas: Luminex y Becton Dickinson; CPG, Inc.

20 Variaciones en las cantidades exactas de los diversos reactivos y en las condiciones para la PCR u otro procedimiento de amplificación adecuado (por ejemplo, condiciones de tampón, tiempos de ciclación, etc.) que conducen a resultados similares de amplificación o detección/cuantificación son conocidas por los expertos en la técnica y se consideran equivalentes. En una realización, la detección qPCR del caso tiene una sensibilidad de detección menor que 50 copias (preferentemente menor que 25 copias, más preferentemente menor que 15 copias, todavía más preferentemente menor que 10 copias, v.g. 5, 4, 3, 2, o 1 copia) del ácido nucleico diana en una muestra.

25 En algunas realizaciones, el método puede implicar amplificación por PCR del RNA molde de cfRNA. Puede realizarse un tratamiento con DNasa para eliminar la contaminación con DNA de las muestras de RNA. El cfRNA puede convertirse en cDNA con una transcriptasa inversa, y este paso puede utilizar uno o más de los mismos cebadores utilizados en una reacción PCR. Los cDNAs diana pueden amplificarse, por ejemplo, por un método consistente y repetible para amplificar cDNA a partir de plasma u otro cDNA. En algunas realizaciones, pueden amplificarse y cuantificarse una o más dianas en cDNA por química Taqman. Este protocolo puede no ser el único protocolo adecuado para detectar la cantidad de cfRNA. Sin embargo, puede ser importante utilizar un protocolo consistente para síntesis y amplificación de cDNA, dado que las variaciones en el protocolo pueden tener un gran efecto en los resultados finales.

35 En algunas realizaciones, el método puede implicar un ensayo para cánceres de pulmón no microcíticos (NSCLC). En algunas realizaciones, un ensayo puede implicar uno o más de los genes siguientes que comprenden el subconjunto #2: PLGLB2, GABARAP, HNRNPA1, NACA, EIF1, UBB, UBC, CD81, TMBIM6, MYL12B, ACTB, HSP90B1, CLDN18, RAMP2, MFAP4, FABP4, MARCO, RGL1, ZBTB16, C10orf116, GRK5, AGER, SCGB1A1, HBB, TCF21, GMFG, HYAL1, TEK, GNG11, ADH1A, TGFBR3, INPP1, ADH1B; y uno o más de los genes siguientes que comprenden el subconjunto #1: CTSS, FPR1, FPR2, FPRL1, FPRL2, CXCR2, NCF2.

40 Puede utilizarse un ensayo R1b patentado. En esta realización, el ensayo puede ser un ensayo qPCR triplex que detecta la abundancia relativa de ACTB, HNRNPA1 y FPR1. En algunas realizaciones, ACTB y HNRNPA1 pueden cumplir los criterios para el subconjunto #2, y FPR1 puede cumplir los criterios para el subconjunto #1.

45 En algunas realizaciones, el subconjunto #2 puede consistir en ACTB y el subconjunto #1 puede consistir en FPR1. En algunas realizaciones, el subconjunto #2 puede consistir en HNRNPA1. En algunas realizaciones, el subconjunto #2 puede comprender al menos uno de ACTB y HNRNPA1. En algunas realizaciones, el subconjunto #1 es FPR1 y el subconjunto #2 es ACTB, o HNRNP1, o a la vez ACTB y HNRNP1. En algunas realizaciones, puede utilizarse el ensayo Qiagen #QF00119602 para la qPCR, utilizando los cebadores/sondas proporcionados de acuerdo con el protocolo del fabricante. Puede utilizarse RNA Universal de Agilent como estándar en la qPCR. En otra realización, el ensayo R1b que consiste en los siguientes cebadores/sondas puede ser como se indica a continuación en la Tabla 1.

Tabla 1

Cebadores de Amplificación

Gen	Cebador Directo	Sonda	Cebador Inverso
FPR1	TGACGGTGAGAGG CATCA (SEQ ID NO: 1)	[FAM] CGGTTTCATCATTGGCTTCAG CGC [BHQ1] (SEQ ID NO: 2)	GGTGGCAATAAGCCCA TAACTG (SEQ ID NO: 3)
ACTB	AGGCCAACCGCGA GAAGA (SEQ ID NO: 4)	[CAL Fluor Gold 540] TGACCCAGATCATGTTTGAG ACCTTCA [BHQ1] (SEQ ID NO: 5)	TGCCATCCTAAAAGCCA CCCCA (SEQ ID NO: 6)
HNRNP A1	GGGCTTTCCTTTG TAACCTT (SEQ ID NO: 7)	[Quasar 705] TGACGACCATGACTCCGTGG ATA [BHQ3] (SEQ ID NO: 8)	TGTGGCCATTCACAGTA TGGTA (SEQ ID NO: 9)

Puede utilizarse un estándar de RNA para estandarizar el resultado por pasos múltiples. Este estándar puede pasarse a diferentes diluciones. En algunas realizaciones, puede utilizarse un estándar sintético. Por ejemplo, los intervalos y puntos de corte para uno o más marcadores pueden examinarse, y se pueden obtener y utilizar directamente estándares sintéticos, o diluirse o combinarse de tal modo que los mismos se encuentren a niveles similares a niveles predichos, tal como niveles predichos de los marcadores. En algunas realizaciones, los estándares sintéticos están presentes a niveles que son o están dentro de un orden de magnitud de (a saber, 10 veces mayores o 10 veces menores que) los niveles predichos en una muestra de paciente. En algunas realizaciones, los estándares sintéticos están presentes a o dentro de una diferencia de 5x (5 veces mayor o 5 veces menor) que los niveles predichos para una muestra de paciente. En algunas realizaciones, los estándares sintéticos están presentes a o dentro de una diferencia de 2x (2 veces mayor o 2 veces menor) que los niveles predichos para una muestra de paciente.

Pueden utilizarse muchos métodos para determinar el nivel apropiado de cada RNA sintético en el estándar sintético. En una realización, pueden ejecutarse cierto número de muestras representativas de aquéllos y registrar los resultados (es decir, el valor Ct o valor adaptado para un estándar). Cada RNA sintético puede pasarse luego sobre el mismo ensayo y los resultados pueden medirse en la misma escala que las muestras (es decir el registro Ct o valor adaptado para un estándar). Después del examen, puede determinarse qué estándares tienen que utilizarse. Por ejemplo, pueden pasarse 50 muestras y se obtienen registros Ct que oscilan desde 33 a 38 para un gen dado. Estándares de 10^7 , 10^6 , 10^5 , 10^4 , 10^3 , 10^2 copias por μL pueden producir registros Ct de 24, 28, 32, 36, 40, o 44. Así, puede decidirse utilizar el estándar 10^5 , realizándose diluciones a 10^4 y 10^3 durante la preparación del ensayo. Utilizando esta estrategia, únicamente son necesarios el estándar original y dos diluciones para cubrir muestras futuras. Podría utilizarse un método similar para seleccionar concentraciones apropiadas para otros estándares en el mismo múltiplex. Utilizando este método, pueden utilizarse concentraciones diferentes para cada transcrito a ensayar, con lo cual se puede utilizar un solo estándar incluso cuando existen grandes discrepancias entre diferentes genes en el múltiplex. Por utilización del método descrito en esta memoria, pueden ensayarse transcritos de niveles de acumulación muy diferentes con un número reducido de reacciones de amplificación en moldes estándar.

Por ejemplo, si se espera que un gen A esté comprendido en el intervalo de 100 a 10.000 copias/ μL y un gen B lo esté en el intervalo de 1.000.000 a 100.000.000 de copias, puede crearse un estándar sintético mixto de 10.000 copias del gen A y 100.000.000 de copias del gen B, con lo cual se requieren solamente tres estándares en una serie de dilución de 10 veces para cubrir el intervalo total esperado para una muestra. La utilización de un estándar sintético de este tipo puede reducir espectacularmente en algunas realizaciones el número de muestras estándar o de control que es necesario correr en una placa de reacción qPCR para generar una curva estándar que abarca los intervalos esperados de ambos genes A y B. Este método minimizará también el riesgo de pequeños errores introducidos por pipeteado de la composición durante las diluciones en serie.

Puede utilizarse regresión para adaptar los puntos de datos generados a partir de muestras de paciente al estándar, de tal modo que los resultados se expresen en unidades estándar. En algunas realizaciones, el estándar consiste en RNA creado a partir de una o más líneas de células. En algunas realizaciones, el estándar puede consistir en RNAs sintéticos. El número de fragmentos de cada RNA en el estándar puede ser conocido, y la unidad estandarizada puede ser número de moléculas de RNA presentes para cada diana. En algunas realizaciones, el estándar puede consistir en los RNAs sintéticos siguientes:

40 diana Secuencia de RNA sintético

FPR1 5'CAUGUUGACGGUGAGAGGCAUCAUCCGGUUCAUCAUUG
 GCUUCAGCGCACCCAUGUCCAUCGUUGCUGUCAGUUAUG
 GGCUUAUUGCCACCAAGAU3'
 (SEQ ID NO: 10)

ACTB 5'CCCCAAGGCCAACCGCGAGAAGAUGACCCAGAUCAUGU
 UUGAGACCUUCAACACCCCAGCCAUGUACGUUGCUAUCC
 AGGCUGUGCUAUCCC3' (SEQ ID NO: 11)

HNRNPA1 5'AAAAGGGGCUUUGCCUUGUAACCUUUGACGACCAUGA
 CUCCGUGGAUAAGAUUGUCAUUCAGAAAUACCAUACUGU
 GAAUGGCCACAACUGU3' (SEQ ID NO: 12)

5 Los ensayos pueden implicar componentes de diferente secuencia o con diferentes etiquetas detectables
 direccionadas a regiones similares, componentes direccionados a regiones diferentes de los mismos genes, o
 componentes que direccionan las regiones de genes distintos de los enumerados anteriormente en el ensayo R1a.
 Los resultados de un test R1a pueden evaluarse utilizando las Reglas de Decisión para un Test Viomics para el cáncer
 tal como el test Viomics NSCLC. Puede crearse un diagrama en la que un eje es la ratio de FPR1 a ACTB, y el otro
 eje es la ratio de FPR1 a HNRNPA1. Un ejemplo de un diagrama de este tipo se indica en las Figs. 2A-B. El diagrama
 en la Fig. 2A representa los datos iniciales utilizando una línea de células de control, y el diagrama de la Fig. 2B
 10 representa una serie de datos independientes que utiliza un estándar sintético.

Cuando se utiliza una línea de células de control, los resultados de NSCLC y Muestra Normal son significativamente
 diferentes uno de otro. A pesar de la presencia de algún solapamiento, las muestras NSCLC exhiben consistentemente
 ratios ACTB a FPR1 y ratios HNRNPA1 a FPR1 que son significativamente mayores que las muestras sin cáncer
 cuando se adaptan a una línea de células de control.

15 Cuando se utiliza un estándar de RNA sintético en lugar de una línea de células de control, se obtienen resultados
 similares pero el grado de solapamiento disminuye sustancialmente. Este solapamiento reducido se debe a
 disminución de la variabilidad en los estándares como resultado de los números reducidos de diluciones seriadas (de
 6 a 3). Cada paso de la dilución seriada puede introducir error. En la Fig. 2B, puede trazarse una línea simple para
 20 separar la totalidad menos una de las ratios de resultados estándar sintéticos Normales de la totalidad de los resultados
 de NSCLC.

Los resultados pueden interpretarse también como una sola ratio entre una combinación lineal de los marcadores tipo
 #1 y una combinación lineal de los marcadores tipo #2. Una regla de decisión puede establecer que cualquier registro
 por encima de un umbral dado indica cáncer, mientras que un registro por debajo del umbral indica la ausencia de
 25 cáncer. Puede diseñarse un estándar sintético de tal manera que el coeficiente en cada marcador es 1, con lo que el
 registro se calcula como: Registro = FRP1/(ACTB + HNRNPA1).

Por ejemplo, los valores de acumulación de transcritos para los genes seleccionados de las listas anteriores pueden
 determinarse a partir de una muestra y compararse con niveles determinados a partir de un conjunto de estándares
 sintéticos (es decir, en una serie de dilución seriada) que abarcan el intervalo de valores que se obtienen típicamente.
 Para cada gen, el nivel de acumulación de transcritos determinado a partir de una muestra de paciente se compara
 30 con el nivel de acumulación de transcritos determinado por realización de un análisis de regresión sobre un molde
 estándar sintético para adaptar los valores de nivel de acumulación para cada gen. Los valores de regresión y
 adaptados se obtienen individualmente para cada gen. Una vez que se obtienen los valores adaptados, puede
 realizarse un análisis adicional (es decir las ratios de cálculo).

Estos registros pueden compararse con valores umbral, de tal modo que los registros por encima de un umbral son
 35 indicativos de un riesgo aumentado de cáncer de pulmón como se indica por una muestra de paciente.

Puede verse fácilmente que, cuando se utiliza este cálculo con un umbral de 1/2, es el mismo que utilizando la línea
 trazada en la Fig. 2B. Las concentraciones correctas para cada estándar, los coeficientes y el umbral pueden

determinarse recogiendo datos en un pequeño conjunto de muestras de pacientes con cáncer y pacientes sin cáncer, y utilizando luego un modelo lineal para separarlos. El modelo lineal puede generarse por un método estadístico tal como regresión logística o máquinas vectoriales de soporte con una función de núcleo lineal, o el modelo lineal puede generarse por inspección.

5 Pueden implementarse criterios de exclusión, tales que cualquier muestra que cumple los criterios de exclusión no tiene resultado comunicado alguno. Estos criterios de exclusión pueden incluir otro test realizado antes o después de una de las realizaciones descritas. Los criterios de exclusión pueden estar basados también en resultados del test propiamente dicho. Por ejemplo, en algunas realizaciones cantidades muy bajas de los marcadores indican una muestra degradada, y una ratio inesperadamente grande entre dos niveles de acumulación tales como los de ACTB y HNRNPA1, por ejemplo, puede indicar que existe contaminación. En algunas realizaciones, una muestra se excluye si la ratio de ACTB s HNRNPA1 difiere en más de 10,5,4,3, o 2 veces comparada con la ratio mediana de los niveles de acumulación de los genes. Un ejemplo de una fuente de contaminación plausible es el de los linfocitos en la muestra de plasma.

15 En algunas realizaciones, el método puede implicar una Determinación de Distancia Estadística. Dado que el cfRNA de las células de cáncer puede estar fuertemente diluido, puede requerirse un método para determinar cambios significativos en abundancia relativa. Por esta razón, en algunas realizaciones, el método determina el resultado del ensayo (es decir, resultado positivo o negativo) basado en distancias estadísticas entre resultados en oposición a un punto de corte fijo determinado únicamente por curvas ROC.

20 Basándose en la especificidad, los resultados pueden dividirse en grupos (alta confianza, baja confianza, etc.). Este número puede transformarse también por alguna fórmula simple para crear un registro numérico de confianza.

En algunas realizaciones, el método puede implicar Modelos y Derivaciones para predecir el tipo de cáncer presente en un paciente basándose en resultados de la expresión de RNA en combinación con atributo(s) demográficos o de estilo de vida.

25 En algunas realizaciones, los niveles de cfRNA pueden ensayarse utilizando tecnología de secuenciación. Ejemplos de tecnología de secuenciación incluyen una o más tecnologías tales como pirosecuenciación, v.g., 'el método '454' (Margulies et al., (2005) Genome sequencing in microfabricated high-density picolitre reactors. Nature 437:376-380; Ronaghi, et al. (1996) Real-time DNA sequencing using detection of pyrophosphate release. Anal. Biochem. 242:84-89), 'Solexa' o secuenciación de tipo Illumina (Fedurco et al., (2006), BTA, a novel reagent for DNA attachment of glass and efficient generation of solid-phase amplified DNA colonies. Nucleic Acid Research 34, e22; Turcatti et al. (2008), A new class of cleavable fluorescent nucleotides: synthesis and optimization as reversible terminators for DNA sequencing by synthesis. Nucleic Acid Research 36, e25), tecnología de secuenciación SOLiD (Shendure, J. et al. (2005) Accurate multiplex polony sequencing of an evolved bacterial genome. Science 309, 1728-1732; McKernan, K. et al, (2006) Reagents, methods, and libraries for bead-based sequencing. Solicitud de patente US 20080003571), Heliscope Technology (Harris, T.D. et al. (2008) Single- molecule DNA sequencing of a viral genome. Science 320, 106-109), Tecnología de Torrente de Iones (Rothberg et al., (2011) An integrated semiconductor device enabling non-optical genome sequencing. Nature 475, 348-352), Tecnología de Secuenciación SMRT (Pacific Biosciences), o secuenciación GridION basada en nanoporos (Oxford Nanopore Technologies; <http://www.nanoporetech.com/technology/the-gridion-system/the-gridion-system>). En algunas realizaciones puede utilizarse cualquier número de métodos de secuenciación de DNA denominados 'de próxima generación', como se describen en Shendure y Ji, "Next-generation DNA sequencing ", Nature Biotechnology 26(10): 1135-1145 (2008) o en otra técnica disponible para un experto en la técnica. Se conocen también en la técnica otros métodos para la determinación de secuencias de DNA.

45 En algunas realizaciones, los niveles de cfRNA pueden ensayarse por hibridación a una microrred, nCounter o similar. Por ejemplo, una clase de redes utilizada comúnmente en estudios de expresión diferencial incluye microrredes o redes de oligonucleótidos. Estas redes utilizan un gran número de sondas que se sintetizan directamente sobre un sustrato y se utilizan para interrogar poblaciones de RNA o mensajes complejos basados en el principio de la hibridación complementaria. Típicamente, estas microrredes proporcionan conjuntos de 16 a 20 pares de sondas de oligonucleótidos de longitud relativamente pequeña (20meros - 25meros) que abarcan una región seleccionada de un gen o una secuencia de nucleótidos de interés. Los pares de sondas utilizados en la red de oligonucleótidos pueden incluir también sondas de apareamiento perfecto y no apareados que están diseñadas para hibridarse a la misma cadena de RNA o mensaje. La sonda de apareamiento perfecto contiene una secuencia conocida que es totalmente complementaria al mensaje de interés, mientras que la sonda no apareada es similar a la sonda de apareamiento perfecto con en cuanto a su secuencia excepto que contiene al menos un nucleótido de apareamiento erróneo que difiere de la sonda de apareamiento perfecto. Durante el análisis de expresión, la eficiencia de hibridación de los mensajes de una población de nucleótidos muestra se evalúa con en cuanto a las sondas de apareamiento perfecto y no apareadas a fin de validar y cuantificar los niveles de expresión para muchos mensajes simultáneamente. En algunas realizaciones, se estampa una red entera de genes a una microrred. En algunas realizaciones, se incluye en una microrred un subconjunto de genes que comprenden FPR1 y al menos uno de ACTB y HNRNPA1. En algunas realizaciones, una microrred comprende al menos FPR1, ACTB y HNRNPA1.

Para facilitar el análisis puede utilizarse un dispositivo tal como un nCounter, ofrecido por Nanostring Technologies, por ejemplo. Un Sistema de Análisis nCounter es un sistema integrado que comprende una estación de preparación totalmente automática, un analizador digital, el CodeSet (códigos de barras moleculares) y todos los reactivos y consumibles necesarios para realizar el análisis. El análisis en el sistema nCounter consiste en hibridación en solución, procesamiento post-hibridación, adquisición de datos digitales, y normalización en un flujo de trabajo simple. En algunas realizaciones, el proceso es automático. En algunas realizaciones, pueden premezclarse conjuntos de sondas con códigos de barras personalizados o pre-diseñados con un conjunto exhaustivo de controles del sistema como parte de dicho análisis.

En esta memoria se describen varios métodos y dispositivos para obtener los datos de nivel de acumulación de transcritos de cfRNA necesarios para la realización de los métodos y para uso con las composiciones y kits.

EJEMPLOS

Ejemplo 1

Se recogió plasma de pacientes que se sabía tenían cáncer de pulmón no microcítico (“NSCLC”) y pacientes sin ningún cáncer de pulmón conocido (individuos supuestamente “sin cáncer”). Existe cierta posibilidad de que los pacientes sin ningún cáncer de pulmón conocido puedan tener de hecho un cáncer de otro tipo no detectado. La presencia de estos pacientes conducirá a una sobre-estimación de la tasa positiva falsa para este ensayo (dado que los “positivos falsos” de entre “individuos sanos” pueden representar de hecho la presencia de cáncer en estos individuos). Después de eliminar el plasma que presentaba problemas obvios, tal como color anaranjado o turbidez, quedaban 25 muestras de plasma sin cáncer y 26 NSCLC. En los 26 pacientes NSCLC estaban presentes las etapas siguientes de cáncer: 8 de etapa I, 6 de etapa II, 5 de etapa III, y 7 de etapa desconocida. Se extrajo el plasma con el kit de ácido nucleico circulante QIAamp (Qiagen #55114). Se utilizó el Kit Quantifast Probe RT-PCR Plus (Qiagen #204484) junto con los cebadores y sondas descritos anteriormente para FPR1, ACTB, y HNRNPA1 a fin de realizar una PCR Taqman cuantitativa. Se utilizó como estándar RNA Universal Humano de Referencia (Agilent #740000), y se utilizó regresión para estimar las cantidades de cada gen en la muestra (Fig. 2A). Las muestras con una ratio de ACTB/HNRNPA1 superior a 75 se eliminaron de los resultados finales, y dieron un resultado de “sin resultado”. Se obtuvieron los resultados siguientes. Obsérvese que el eje X es la ratio de FPR1/ACTB y el eje Y es la ratio de FPR1/HNRNPA1.

Como se muestra en la Fig. 1A, los niveles de acumulación medianos de FPR1 normalizados contra los niveles de acumulación medidos en RNA Universal Humano de Referencia diferían aproximadamente en 100 veces entre las poblaciones de pacientes Normales y Con Tumor. Análogamente, el límite superior del cuartil 25% de la población de pacientes Normales estaba apreciablemente por debajo del límite inferior del cuartil 75% de las medidas para la población de pacientes Con Tumor. Las medidas Normales máximas extremas más raras eran ocasionalmente tan altas como, pero no mayores que, los valores medianos de los pacientes.

Este resultado demuestra que la medida de los niveles de FPR1 en RNA libre circulante permite predecir la presencia de cáncer en un paciente.

Como se muestra en la Fig. 1B, niveles de acumulación mediana de ACTB no diferían significativamente en las poblaciones de pacientes Normales y Con Tumor. Había también un solapamiento sustancial en el intervalo de los cuartiles 25%-75% y entre los valores aberrantes extremos en los niveles de acumulación entre las poblaciones de pacientes Normales y Con Tumor.

Análogamente, en la Fig. 1C, los niveles de acumulación mediana de HNRNPA1 no diferían significativamente entre las poblaciones de pacientes Normales y Con Tumor. Había también un solapamiento sustancial en el intervalo de los cuartiles 25%-75% y entre los valores aberrantes extremos en los niveles de acumulación entre las poblaciones de pacientes Normales y Con Tumor.

Este resultado demuestra la idoneidad de ACTB y HNRNPA1 como constituyentes del subconjunto #2 o como estándares de referencia.

Como se muestra en la Fig. 2A, cuando se utilizó una línea de células de control, los resultados de las muestras de Tumor y Normales eran significativamente diferentes uno de otro. A pesar de la presencia de algún solapamiento, las muestras NSCLC exhibían consistentemente ratios FPR1 a ACTB y ratios FPR1 a HNRNPA1 que eran en general significativamente mayores que los valores correspondientes obtenidos para una línea de células de control.

Este experimento demuestra que la comparación de los niveles de FPR1 en RNA libre circulante con los niveles de HNRNPA1 o ACTB en RNA libre circulante permite predecir la presencia de cáncer en un paciente.

Ejemplo 2

Se ensayó un segundo conjunto de 6 muestras de pacientes con NSCLC y 7 de pacientes Normales utilizando un protocolo similar al expuesto en el Ejemplo 1. Se hicieron dos modificaciones técnicas: se extrajo plasma por medio del Kit QIASymphony DSP Virus/Pathogen Midi (Qiagen 937055) y se utilizó un estándar sintético como se ha descrito

anteriormente. Se excluyeron muestras adicionales después de una selección por cuestiones obvias tales como turbidez o descoloración. Se determinaron los ratios de los valores adaptados para cada gen, y se muestran en la Fig. 2B. Los ejes X e Y son las mismas ratios que se han descrito anteriormente.

5 Como se muestra en la Fig. 2B, cuando se utilizó un estándar sintético, los resultados de las Muestras NSCLC y Normales eran significativamente diferentes uno de otro. Las muestras NSCLC exhibían consistentemente ratios ACTB a FPR1 y ratios HNRNPA1 a FPR1 que eran significativamente mayores que los valores correspondientes obtenidos para plasma obtenido a partir de individuos sin cáncer. Puede trazarse una línea simple para separar todas menos una de las ratios de resultados de estándar sintético Normales de todos los resultados de NSCLC.

10 Si bien puede parecer inicialmente que existe una mayor separación entre el grupo NSCLC y el grupo sin cáncer, esto puede deberse al menor número de puntos. A medida que están presentes menos puntos, son menos probables los valores extremos. Alguna reducción en la variabilidad puede deberse también al menor número de diluciones utilizadas para la creación del estándar sintético. Esto está permitido por la posibilidad de ajuste fino de la concentración de cada gen individualmente en el estándar.

Ejemplo 3

15 Se recogió plasma de un paciente que se sospechaba padecía cáncer de pulmón. Se determinaron los niveles de acumulación de transcritos de FPR1, ACTB y HNRNPA1 en la población cfRNA de cada paciente a partir del plasma del paciente como se ha descrito anteriormente. Los niveles de acumulación de FPR1 del paciente se compararon con niveles conocidos que se correspondían con individuos sanos y con individuos que tenían cáncer, por ejemplo, los niveles de acumulación indicados en la Fig. 1A. Podrían haberse utilizado también otras medidas de referencia de la acumulación de FPR1 en cfRNA de individuos sanos y cáncer-positivos. Se asignó un valor arbitrario de 100 a la concentración total del estándar para cada gen, siendo las dos diluciones adicionales utilizadas para crear la curva estándar 10 y 1 unidades arbitrarias. Se recogió la muestra 171 de un paciente que se sabía padecía NSCLC. Se obtuvieron los valores de 18,14, 26,64 y 5,38 para FPR1, ACTB y HNRNPA1 respectivamente. Se obtuvo un registro calculado como $18,14 / (26,64 + 5,38) = 0,567$. Dado que este valor es mayor que 0,5, se obtuvo un resultado positivo para NSCLC.

20 Se recogió plasma del paciente 164 sin evidencia alguna de cáncer. Se obtuvieron los niveles de acumulación de transcritos de FPR1, ACTB y HNRNPA1 como anteriormente. Se obtuvieron los valores 3,53, 12,2 y 2,87 para FPR1, ACTB y HNRNPA1 respectivamente. Se obtuvo un registro calculado como $3,53 / (12,2 + 2,87) = 0,234$. Dado que este registro es menor que 0,5, se obtuvo un resultado negativo para NSCLC.

30 Este experimento demuestra que la determinación de los niveles de FPR1, ACTB y HNRNPA1 en RNA libre circulante permite predecir la presencia de cáncer, y particularmente cáncer de pulmón, en un paciente.

Ejemplo 4

35 Se recoge plasma de un paciente que se sospecha padece cáncer de pulmón. Se determinan los niveles de acumulación de transcritos de FPR1 en la población cfRNA de dicho paciente a partir del plasma del paciente como se ha descrito anteriormente. Los niveles acumulación de FPR1 del paciente se comparan con niveles conocidos que corresponden a individuos sanos y a individuos que padecen cáncer, por ejemplo, los niveles de acumulación indicados en la Fig. 1A. Pueden utilizarse otras medidas de referencia de acumulación de FPR1 en cfRNA de individuos sanos y positivos de cáncer. Se encuentra que los niveles son 60.000 moléculas FPR1 por ml, lo que corresponde al nivel de acumulación mediano observado para pacientes Con Tumor, pero que coincide con o es superior al valor extremo más alto medido para pacientes Normales.

40 Este nivel de acumulación de FPR1 indica con grado de confianza alto que está presente en el paciente una población de células NSCLC.

Se recoge plasma de un segundo paciente que se sospecha padece cáncer de pulmón. Se determinan los niveles acumulación de transcritos de FPR1 en la población cfRNA de dicho paciente y se comparan como anteriormente.

45 Se encuentra que los niveles son 600 moléculas FPR1 por ml, lo que corresponde al nivel de acumulación mediano observado para pacientes Normales, pero que coincide o es inferior al valor extremo más bajo medido para pacientes Con Tumor. Este nivel de acumulación de FPR1 indica con alto grado de confianza que el paciente está exento de población de células cancerosas o precancerosas detectables por este método.

50 Este experimento demuestra que la determinación de los niveles de FPR1 en RNA libre circulante permite predecir la presencia de cáncer en un paciente.

LISTA DE SECUENCIAS

- <110> Morris, Scott
Mallery, David
VIOMICS Inc.
- 5 <120> Sistema y método de detección de RNAs alterados por cáncer de pulmón en sangre periférica.
- <130> VIOMC.003WO
- 10 <140> PCT/US2013/020383
<141> 04-01-2013
- <150> 61/584,097
<151> 06-01-2012
- 15 <160> 12
- <170> FastSEQ for Windows Versión 4.0
- 20 <210> 1
<211> 18
<212> DNA
<213> Homosapiens
- 25 <400> 1
tgacggtgag aggcacca 18
- <210> 2
<211> 23
30 <212> DNA
<213> Homosapiens
- <400> 2
35 cggttcacca ttggcttcag cgc 23
- <210> 3
<211> 22
<212> DNA
<213> Homosapiens
- 40 <400> 3
ggtggcaata agcccataac tg 22
- <210> 4
45 <211> 18
<212> DNA
<213> Homosapiens
- <400> 4
50 aggccaaccg cgagaaga 18
- <210> 5
<211> 27
<212> DNA
55 <213> Homosapiens
- <400> 5
tgaccagat catgtttgag acctca 27
- 60 <210> 6
<211> 22
<212> DNA
<213> Homosapiens

ES 2 769 795 T3

<400> 6
 tgccatccta aaagccaccc ca 22

5 <210> 7
 <211> 21
 <212> DNA
 <213> Homosapiens

10 <400> 7
 gggcttgcc ttgtaacct t 21

15 <210> 8
 <211> 23
 <212> DNA
 <213> Homosapiens

<400> 8
 tgacgacat gactccgtgg ata 23

20 <210> 9
 <211> 22
 <212> DNA
 <213> Homosapiens

25 <400> 9
 tgtggcatt cacagtatgg ta 22

30 <210> 10
 <211> 96
 <212> RNA
 <213> Homosapiens

<400> 10
 cauguugacg gugagaggca ucauccgguu caucauuggc uucagcgcac ccauguccau 60
 cguugcuguc aguuaugggc uuauugccac caagau 96

35 <210> 11
 <211> 92
 <212> RNA
 <213> Homosapiens

40 <400> 11
 ccccaaggcc aaccgcgaga agaugaccca gaucauguuu gagaccuua acaccccagc 60
 cauguacguu gcuauccagg cugugcuauc cc 92

45 <210> 12
 <211> 93
 <212> RNA
 <213> Homosapiens

<400> 12
 aaaaggggcu uugccuuugu aaccuuugac gaccaugacu ccguggauaa gauugucauu 60
 50 cagaaauacc auacugugaa uggccacaac ugu 93

REIVINDICACIONES

1. Un método de ensayo en cuanto a la presencia de un cáncer de pulmón en una persona, que comprende:
 - en una muestra biológica de un paciente que se sospecha padece cáncer;
- 5 medir el nivel de derivados de un gen del receptor 1 de formilpéptido (FPR1) diana en ácidos nucleicos libres circulantes en la muestra biológica; y
 - comparar el nivel medido de derivados de dicho gen FPR1 diana en ácidos nucleicos libres circulantes con niveles conocidos de derivados de dicho gen en ácidos nucleicos libres circulantes en personas sanas,
 - en donde un nivel aumentado de derivados de dicho gen FPR1 en ácidos nucleicos libres circulantes indica la
- 10 presencia de un cáncer de pulmón asociado con dicho gen en el paciente.
 2. El método de la reivindicación 1, en donde la comparación comprende comparar electrónicamente en una computadora valores que reflejan dichos niveles de derivados de dicho gen en ácidos nucleicos libres circulantes.
 3. El método de la reivindicación 1, en donde la muestra comprende componentes de la sangre.
 4. El método de la reivindicación 1, en donde dicha medición comprende normalizar dichos niveles a un
 - 15 estándar, opcionalmente en donde dicho estándar es un estándar sintético o comprende RNA extraído de una línea de células estándar.
 5. El método de la reivindicación 1, en donde dicha medición comprende comparar dichos niveles de ácidos nucleicos libres circulantes con un nivel de una segunda población de ácidos nucleicos libres circulantes que se sabe están presentes a niveles estables con independencia del estado de cáncer.
 - 20 6. El método de la reivindicación 1, en donde el cáncer de pulmón es un cáncer de pulmón no microcítico (NSCLC).
 7. El método de la reivindicación 5, en donde los ácidos nucleicos libres circulantes comprenden ácidos ribonucleicos libres circulantes.
 8. El uso de un kit
 - 25 en el método de la reivindicación 1 de ensayo en cuanto a la presencia de un cáncer de pulmón en un paciente, que comprende:
 - un recipiente que comprende cebadores de amplificación para amplificar los derivados de un gen del receptor 1 de formilpéptido (FPR1) en ácidos libres circulantes en una muestra biológica.
 - 30 9. El uso de un kit conforme a la reivindicación 8, en donde los cebadores de amplificación tienen las secuencias de ácido nucleico de:
 - Cebador Directo: 5' TGACGGTGAGAGGCATCA 3' (SEQ ID NO: 1)
 - Cebador Inverso: 5' GGTGGCAATAAGCCATAACTG 3' (SEQ ID NO: 3)
 10. Un método de ensayo en cuanto a la presencia de cáncer de pulmón en una persona, que comprende los
 - 35 pasos de:
 - en una muestra biológica que comprende sangre o componentes de la sangre de un paciente que se sospecha padece cáncer de pulmón;
 - medir un nivel de ácidos nucleicos libres circulantes derivados de un gen del receptor 1 del formilpéptido diana (FPR1) en la muestra biológica; y
 - comparar el nivel medido de ácidos nucleicos libres circulantes derivados de dicho gen FPR1 con al menos un nivel
 - 40 de referencia de ácidos nucleicos libres circulantes derivados de un segundo gen, en donde la ratio del nivel de ácidos nucleicos libres circulantes derivados de dicho gen FPR1 diana al nivel de ácidos nucleicos libres circulantes derivados de un segundo gen de referencia indica la presencia de cáncer de pulmón en la persona.
 - 11. El método de la reivindicación 10, en donde dicho nivel de referencia de ácidos nucleicos libres circulantes
 - 45 derivados de dicho segundo gen comprende RNAs derivados de Actina B (ACTB) o HNRNPA1 o una combinación de los mismos.
 - 12. El método de la reivindicación 4, en donde dicho estándar es un estándar de referencia sintético preparado por un proceso que comprende los pasos de:

seleccionar una primera secuencia molde de RNA sintético;

seleccionar una segunda secuencia molde de RNA sintético;

5 obtener una estimación de una concentración esperada de transcritos que comprenden dicha primera secuencia molde de RNA sintético y transcritos que comprenden dicha segunda secuencia molde de RNA sintético en una muestra biológica; y

combinar dicha primera secuencia molde y dicha segunda secuencia molde en una composición tal que la concentración de cada una de dichas secuencias molde corresponde a la concentración esperada de cada una de dichas secuencias en una muestra desconocida.

10 13. El método de la reivindicación 4, en donde dicho estándar es un estándar de referencia sintético que comprende ácidos nucleicos molde a concentraciones que están dentro de un orden de magnitud de los niveles de acumulación esperados en una muestra de paciente.

15 14. El método de la reivindicación 13, en donde dicho estándar de referencia sintético comprende poblaciones de ácidos nucleicos molde correspondientes a al menos dos transcritos a ensayar en una muestra de paciente, y en donde cada una de dichas poblaciones de ácido nucleico de referencia está presente en una concentración comprendida dentro de un orden de magnitud de un nivel de acumulación esperado de un transcrito correspondiente en una muestra de paciente.

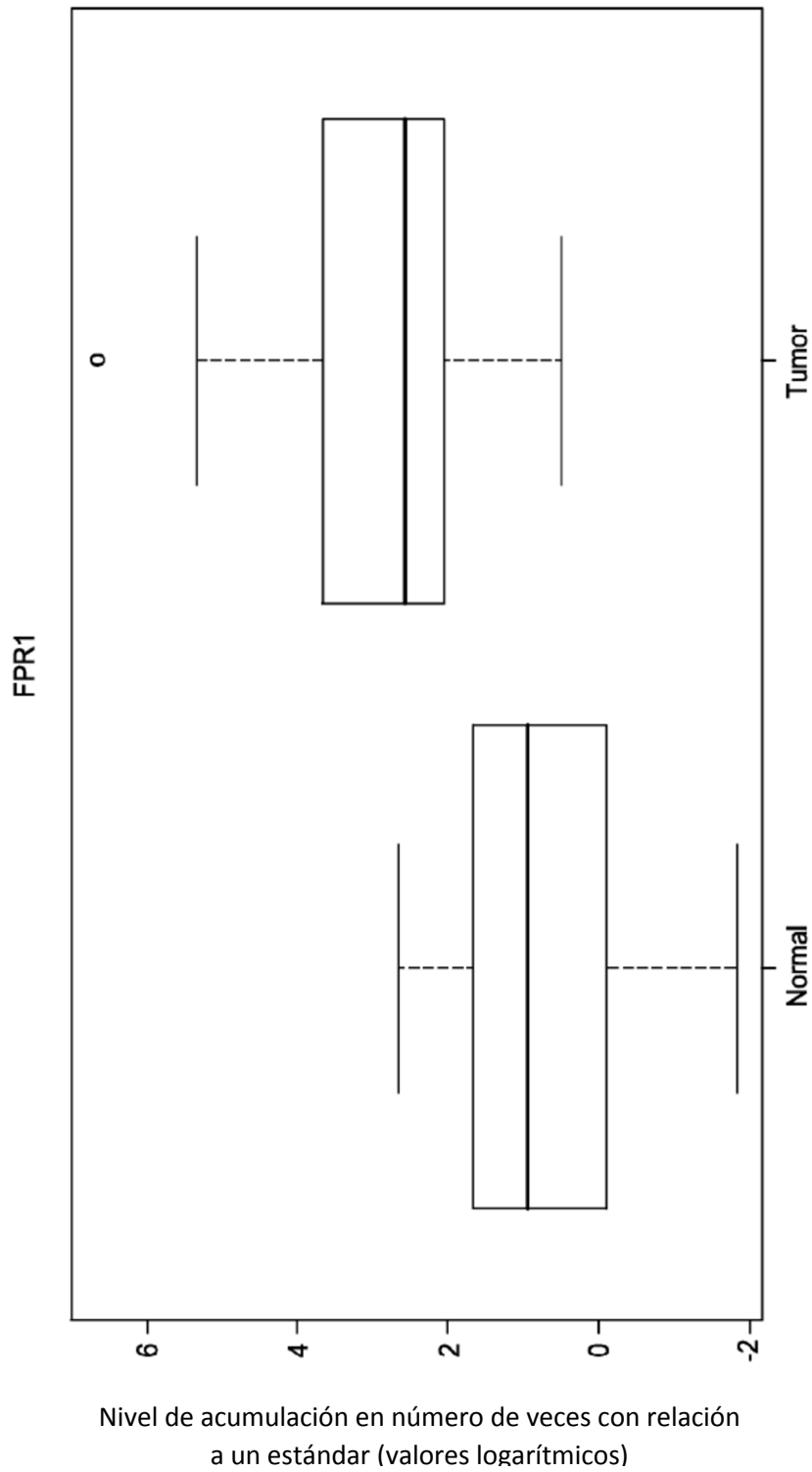


FIG. 1A

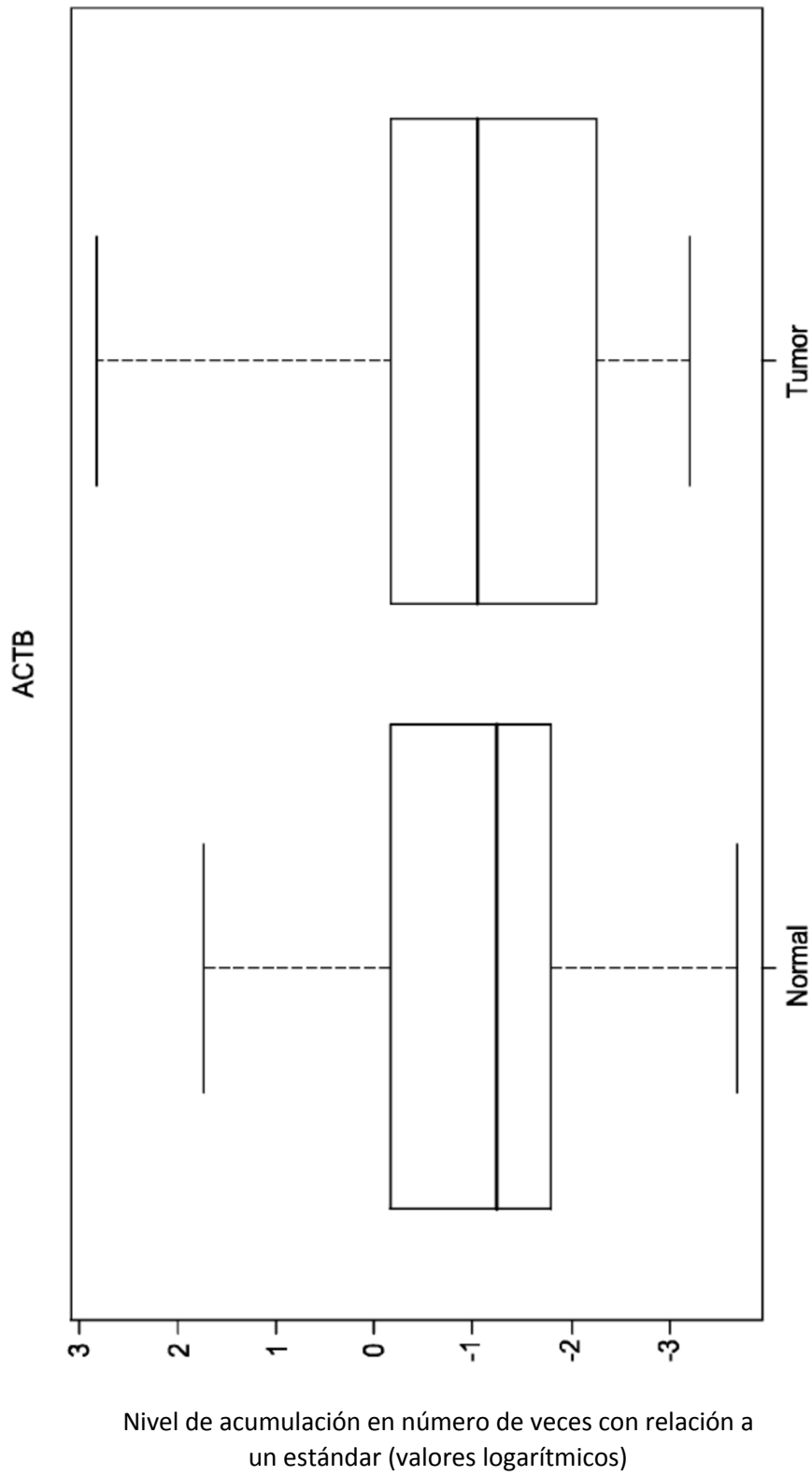


FIG. 1B

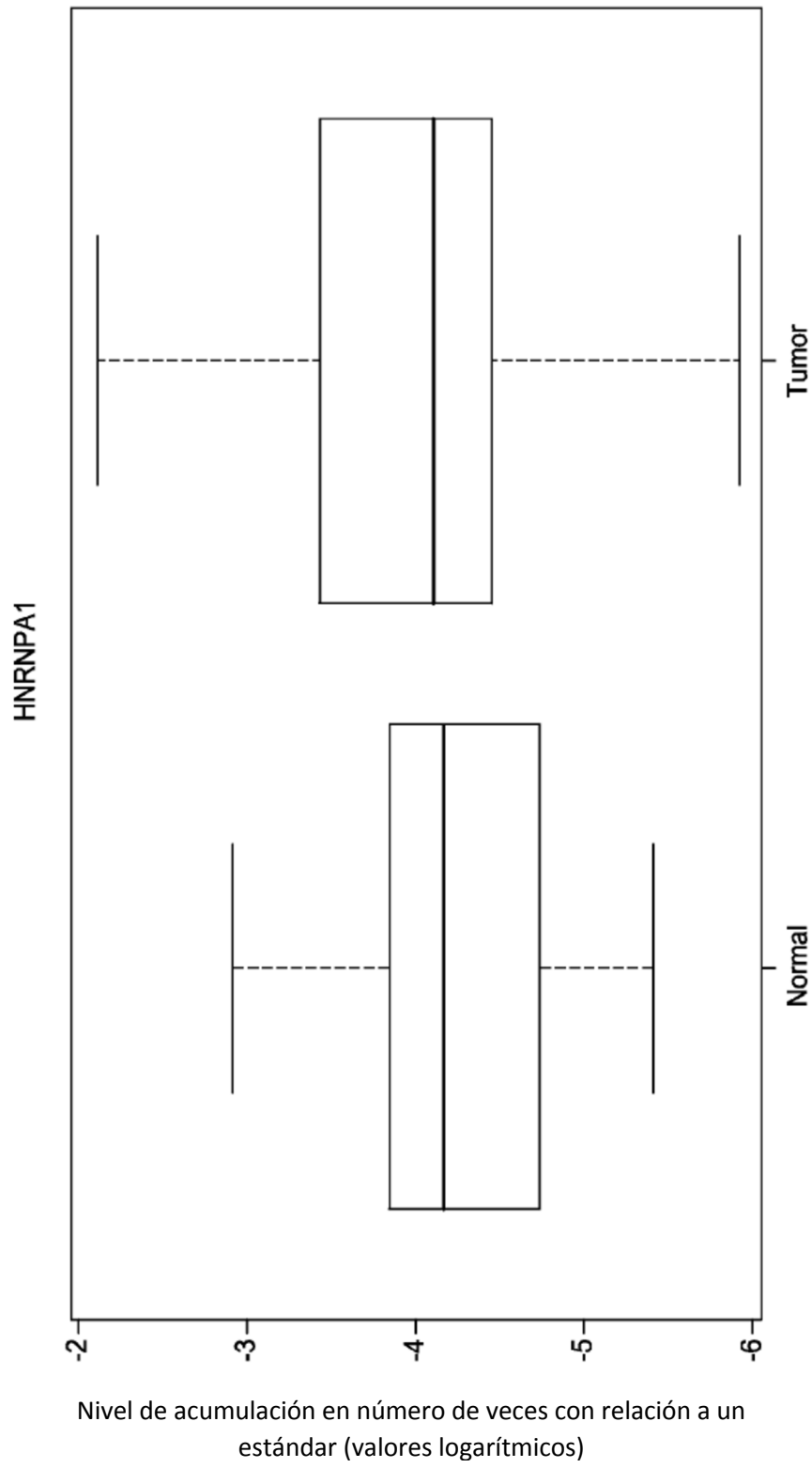


FIG. 1C

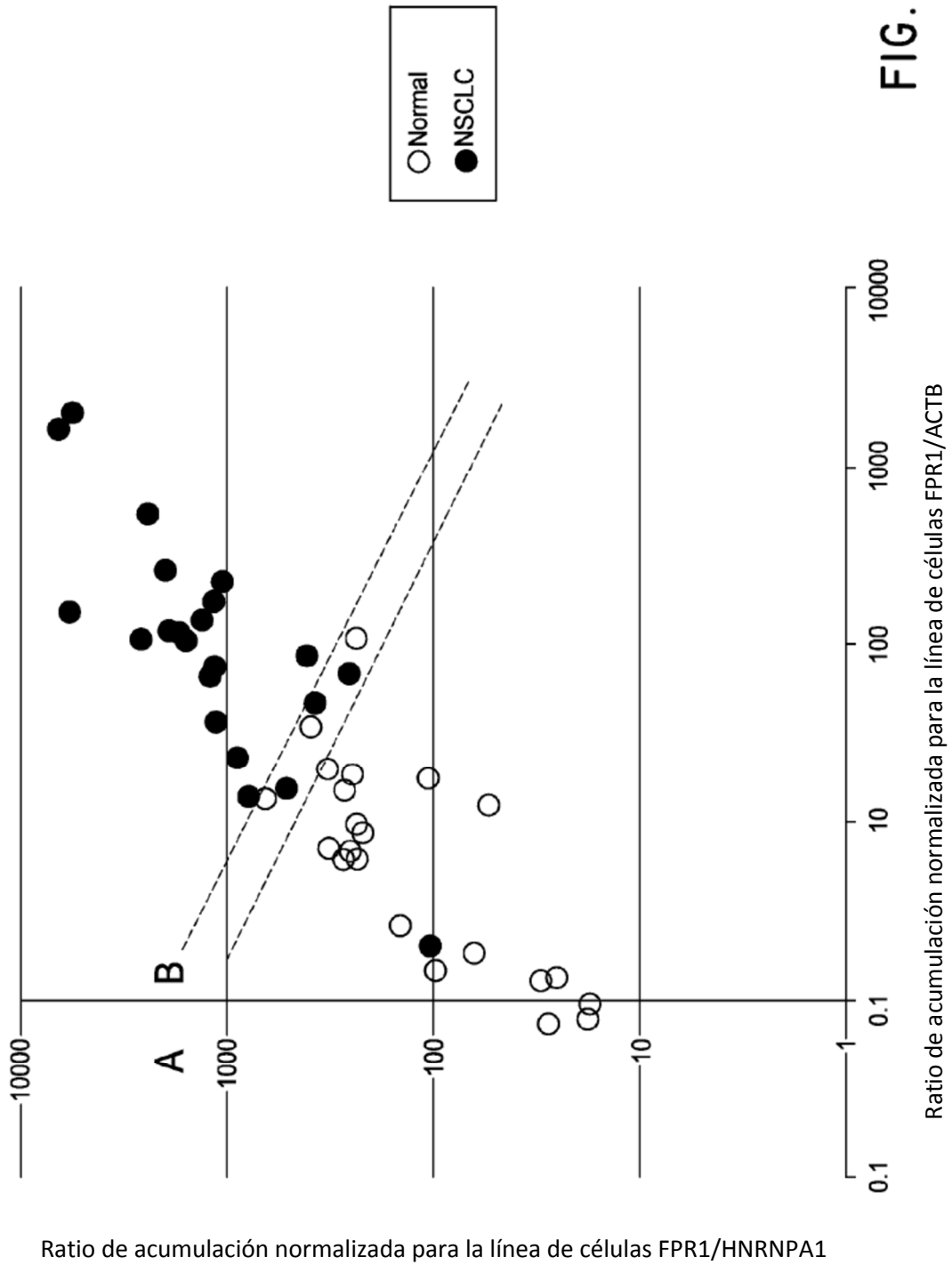
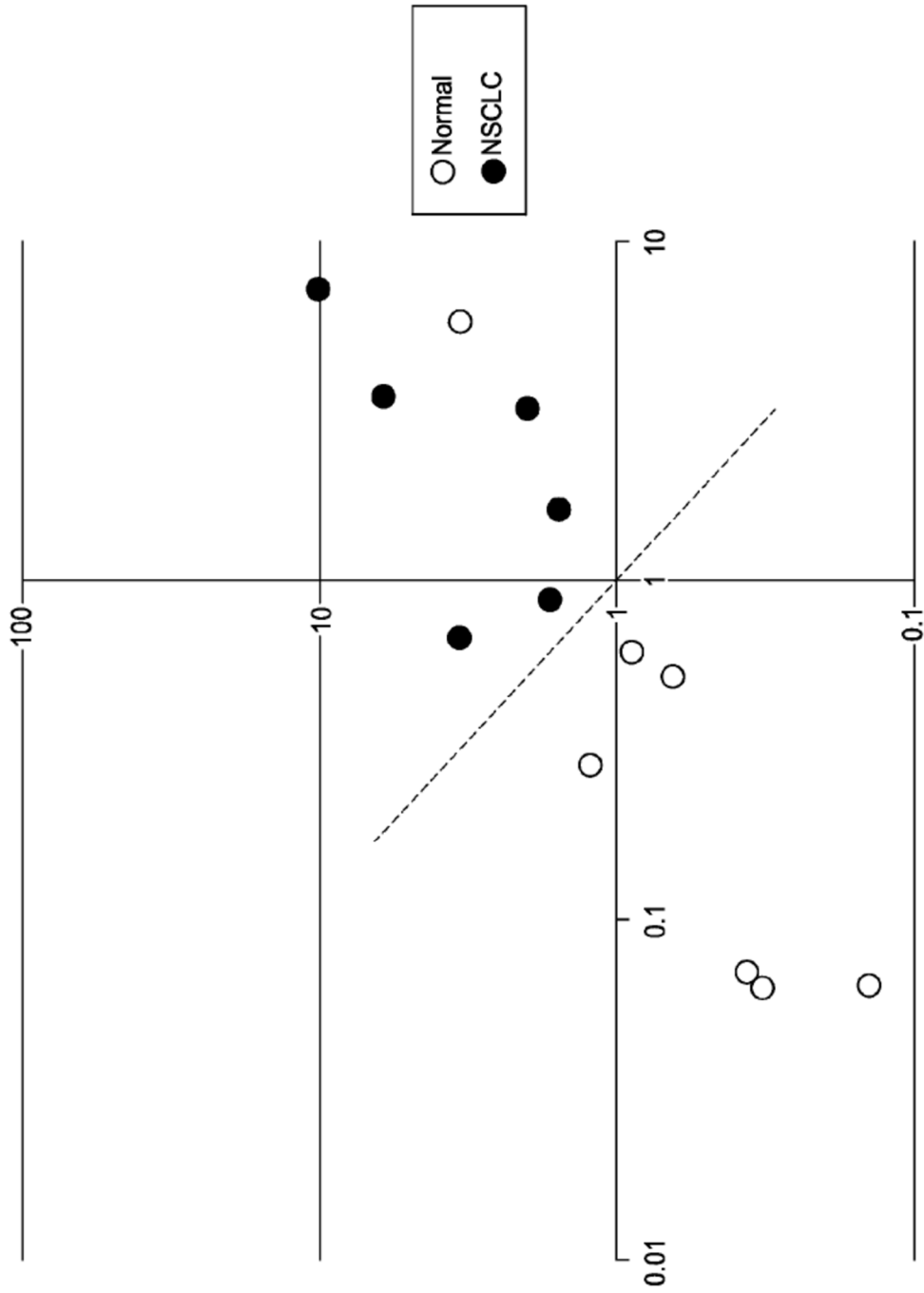


FIG. 2A



Ratio de acumulación normalizada para el estándar sintético FPR1/HNRNPA1

FIG. 2B

Ratio de acumulación normalizada para el estándar sintético FPR1/ACTB