

19



OFICINA ESPAÑOLA DE
PATENTES Y MARCAS

ESPAÑA



11 Número de publicación: **2 832 748**

51 Int. Cl.:

C12Q 1/6853 (2008.01)

C12P 1/00 (2006.01)

12

TRADUCCIÓN DE PATENTE EUROPEA

T3

86 Fecha de presentación y número de la solicitud internacional: **19.08.2015 PCT/IB2015/001851**

87 Fecha y número de publicación internacional: **25.02.2016 WO16027162**

96 Fecha de presentación y número de la solicitud europea: **19.08.2015 E 15816216 (4)**

97 Fecha y número de publicación de la concesión europea: **23.09.2020 EP 3183054**

54 Título: **Procedimientos y composiciones para la detección de ácidos nucleicos**

30 Prioridad:

19.08.2014 US 201462039207 P

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

11.06.2021

73 Titular/es:

F. HOFFMANN-LA ROCHE AG (100.0%)

Grenzacherstrasse 124

4070 Basel, CH

72 Inventor/es:

KUBISTA, MIKAEL y

SJÖBACK, ROBERT

74 Agente/Representante:

LINAGE GONZÁLEZ, Rafael

ES 2 832 748 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

Procedimientos y composiciones para la detección de ácidos nucleicos

5 ANTECEDENTES DE LA INVENCION

Los ARN no codificantes pequeños funcionan como importantes reguladores de la expresión génica en muchos organismos. He *et al.*, Nat Rev Genetics 2004, 5(7): 522-31. Por ejemplo, se han identificado varios cientos de microARN (miARN) en plantas y animales, incluyendo seres humanos, ratones, *Drosophila* y *C. elegans* (Bino *et al.*, 2004, PLoS Biol. 2(11): e363). Específicamente, se ha demostrado que los miARN monocatenarios se asocian con diversas enfermedades humanas, tales como anomalías en procesos biológicos, tales como apoptosis, proliferación, morfogénesis de células epiteliales, diferenciación de células neurales y musculares, homeostasis de grasa/colesterol/glucosa e infección vírica. Véanse, por ejemplo, Esquela-Kerscher A y Slack FJ, Nat. Rev. Cancer, 2006, 6(4): 259-69; Michael *et al.*, Mol. Cancer Res., 2003, 1(12): 882-91; Dimmeler S y Nicotera P, EMBO Mol. Med. 2013, 5(2): 180-90. Los recientes hallazgos sugieren que muchos miARN que tienen un impacto en estos procesos son abundantes y estables en el aparato circulatorio, lo que hace que los miARN y otros ARN no codificantes pequeños reguladores similares sean biomarcadores inestimables para el diagnóstico e identificación de enfermedades, así como potenciales dianas para los tratamientos. Brase JC *et al.*, Mol. Cancer 2010, 26(9): 306; Chen *et al.*, Cell Res. 2008, 18(10): 997-1006.

Sin embargo, los ARN pequeños, incluyendo los microARN, son complicados de detectar y cuantificar por muchos motivos. En primer lugar, los ARN pequeños son cortos; por ejemplo, los microARN típicamente son de aproximadamente 20 nucleótidos de largo, lo que, más o menos, es la longitud de un cebador para PCR convencional. Esto hace que la amplificación por PCR, que es un importante procedimiento para la detección y cuantificación, sea muy difícil. En segundo lugar, muchos ARN pequeños están relacionados estrechamente; por ejemplo, muchos miembros de la misma familia de miARN están bien conservados y difieren a veces en solo un nucleótido. Esto hace que analizar con exactitud el impacto de un ARN pequeño particular sea difícil.

Se han ideado varias técnicas convencionales para abordar esta necesidad y todas adolecen de una serie de profundas desventajas. Por ejemplo, el primer enfoque es la RT-PCR basada en tallo-bucle. Chen *et al.*, Nucleic Acids Res. 2005, 33(20): e179. En este enfoque, un cebador para RT en la conformación de un tallo-bucle se une a los últimos seis nucleótidos de un miARN y genera un ADNc alargado. Este ADNc alargado, a continuación, se amplifica por un cebador directo específico para miARN y un cebador inverso universal. Durante la RT-PCR, la exactitud de la cuantificación se asegura supuestamente por una sonda TaqMan. Sin embargo, la desventaja para usar este procedimiento es que existe una carencia de especificidad, puesto que el usuario no puede utilizar un análisis de la curva de fusión para controlar la especificidad. Además, la sonda TaqMan se une a la secuencia a la que contribuye el cebador para RT, que no es necesariamente única para el miARN. El documento EP2653559 describe un polinucleótido que incluye al menos dos regiones complementarias que son complementarias a un ácido nucleico diana y tienen una configuración inversa y usos del mismo.

El segundo enfoque utiliza una cola de poli-A para el miARN y usa cebadores con poli-T marcados para RT. Shi *et al.*, Biotechniques 2005, 39(4): 519-25. Sin embargo, las desventajas para usar este enfoque son numerosas. En primer lugar, los ARN pequeños con extremos 3' comunes se pueden poliadenilar por error. En segundo lugar, se desconoce la eficacia de la poliadenilación. En tercer lugar, las modificaciones 2'-oximetilo en los extremos de los ARN pequeños bloquean esta poliadenilación. Por ejemplo, los miARN vegetales tienen esta modificación 2'-oximetilo. Por tanto, existe una necesidad considerable de obtener un sistema alternativo que pueda abordar una o más de estas desventajas.

SUMARIO DE LA INVENCION

Un sistema y/o procedimiento ventajoso que pueda detectar y/o cuantificar específicamente, con exactitud y/o económicamente ARN no codificantes pequeños superaría uno o más de los obstáculos técnicos mencionados anteriormente. Dichos sistemas y/o procedimientos facilitarían en gran medida el aprovechamiento del potencial completo de los ARN no codificantes pequeños para aplicaciones de diagnóstico u otras aplicaciones clínicas. El alcance de la invención se define por las reivindicaciones adjuntas.

En consecuencia, la presente divulgación proporciona procedimientos, composiciones, mezclas de reacción, kits y/o sistemas para producir una secuencia complementaria a una región en un polinucleótido diana en una muestra. Estos procedimientos, composiciones, mezclas de reacción, kits y/o sistemas son, en particular, útiles para detectar ácidos nucleicos cortos. En un aspecto, la presente divulgación proporciona un procedimiento para producir una secuencia complementaria a una región en un polinucleótido diana en una muestra, comprendiendo el procedimiento someter la muestra a una reacción de amplificación de ácido nucleico en una mezcla de reacción en condiciones para proporcionar la secuencia completa con respecto a la región del polinucleótido diana, en el que la mezcla de reacción comprende: (a) un cebador en bucle que comprende una secuencia A, una secuencia de conector D y una secuencia B, orientadas desde 5' hacia 3' en una única hebra; en el que el cebador en bucle se hibrida específicamente al polinucleótido diana por medio de (i) complementariedad de secuencia entre la secuencia A del cebador en bucle y la secuencia A' en el polinucleótido diana, y (ii) complementariedad de secuencia entre la secuencia B del cebador en

bucle y la secuencia B' en el polinucleótido diana, en el que la secuencia A' y la secuencia B' están orientadas desde 5' hacia 3' en el polinucleótido diana; y (b) una polimerasa que extiende la secuencia B del cebador en bucle desde 5' hacia 3' a lo largo del polinucleótido diana que sirve como molde para la extensión del cebador dirigida por molde para producir la secuencia complementaria del polinucleótido diana.

5 En un modo de realización, el procedimiento comprende además amplificar la secuencia complementaria a una región en un polinucleótido diana en una muestra en presencia de un cebador inverso y opcionalmente un cebador directo, en el que el cebador inverso y el cebador directo presentan complementariedad de secuencia con el producto amplificado y el cebador en bucle, respectivamente. En algunos modos de realización, el cebador directo se hibrida específicamente a una secuencia en la secuencia de conector. En algunos modos de realización, el cebador inverso se hibrida específicamente a una secuencia que es complementaria a una porción del polinucleótido diana que está en 5' con respecto a la secuencia A' o B'. En algunos modos de realización, el procedimiento comprende además detectar un producto de la amplificación de ácido nucleico de producción de una secuencia complementaria a una región en un polinucleótido diana en una muestra. En algunos modos de realización, la etapa de detección comprende detectar una señal de una sonda en la mezcla de reacción que tiene complementariedad de secuencia con el producto. En algunos modos de realización, la secuencia A tiene de 2 nt a aproximadamente 10 nt de longitud y la secuencia B tiene de 2 nt a aproximadamente 10 nt de longitud. En algunos modos de realización, la longitud combinada de las secuencias A y B es de aproximadamente 5 nt a aproximadamente 20 nt. En algunos modos de realización, la longitud combinada de las secuencias A y B es suficiente para hibridarse específicamente al polinucleótido diana para efectuar la extensión del cebador en bucle. En algunos modos de realización, una concatenación lineal de las secuencias B y A es al menos un 80 % complementaria a una concatenación lineal de las secuencias A' y B' cuando se alinean de forma óptima. En algunos modos de realización, una concatenación lineal de las secuencias B y A es al menos un 90 % complementaria a una concatenación lineal de las secuencias A' y B'. En algunos modos de realización, el extremo 3' de la secuencia A' está dentro de 1 nt a aproximadamente 5 nt de la secuencia B'. En algunos modos de realización, la secuencia de conector comprende uno o más elementos de secuencia seleccionados del grupo que consiste en: una o más secuencias de código de barras, una o más secuencias de reconocimiento para enzimas de restricción, una o más secuencias de unión a sonda oligonucleotídica o complementos de las mismas, una o más secuencias de hibridación a cebador de secuenciación o complementos de las mismas, y una combinación de estas. En algunos modos de realización, la secuencia de conector comprende una secuencia universal común a múltiples cebadores en bucle diferentes.

En otro aspecto, la presente divulgación proporciona un procedimiento para producir una secuencia complementaria a una región en un polinucleótido diana en una muestra, comprendiendo el procedimiento someter la muestra a una reacción de amplificación de ácido nucleico que tiene un cebador en bucle, un cebador directo, un cebador inverso y una polimerasa en condiciones para proporcionar la secuencia completa con respecto a la región del polinucleótido diana, en el que la mezcla de reacción comprende: (a) el cebador en bucle que comprende una secuencia A, una secuencia de conector D y una secuencia B, orientadas desde 5' hacia 3' en una única hebra; en el que el cebador en bucle se hibrida específicamente al polinucleótido diana por medio de (i) complementariedad de secuencia entre la secuencia A del cebador en bucle y la secuencia A' en el polinucleótido diana, y (ii) complementariedad de secuencia entre la secuencia B y la secuencia B' en el polinucleótido diana, en el que la secuencia A' y la secuencia B' están orientadas desde 5' hacia 3' en el polinucleótido diana; (b) la polimerasa que extiende la secuencia B del cebador en bucle desde 5' hacia 3' a lo largo del polinucleótido diana que sirve como molde para una extensión del cebador dirigida por molde para producir la secuencia complementaria del polinucleótido diana; (c) el cebador inverso que presenta homología de secuencia con una secuencia en el polinucleótido diana localizada en 5' con respecto a la secuencia A' o B'; y (d) el cebador directo que se hibrida específicamente a una secuencia complementaria al cebador en bucle. En un modo de realización, el procedimiento comprende además detectar un producto de la amplificación de ácido nucleico. En algunos modos de realización, la etapa de detección comprende detectar una señal de una sonda en la mezcla de reacción que tiene complementariedad de secuencia con el producto. En algunos modos de realización, la secuencia A tiene de 2 nt a aproximadamente 10 nt de longitud y la secuencia B tiene de 2 nt a aproximadamente 10 nt de longitud. En algunos modos de realización, la longitud combinada de las secuencias A y B es de aproximadamente 5 nt a aproximadamente 20 nt. En algunos modos de realización, la longitud combinada de las secuencias A y B es suficiente para hibridarse específicamente al polinucleótido diana para efectuar la extensión del cebador en bucle. En algunos modos de realización, una concatenación lineal de las secuencias B y A es al menos un 80 % complementaria a una concatenación lineal de las secuencias A' y B' cuando se alinean de forma óptima. En algunos modos de realización, una concatenación lineal de las secuencias B y A es al menos un 90 % complementaria a una concatenación lineal de las secuencias A' y B'. En algunos modos de realización, el extremo 3' de la secuencia A' está dentro de 1 nt a aproximadamente 5 nt de la secuencia B'. En algunos modos de realización, la secuencia de conector comprende uno o más elementos de secuencia seleccionados del grupo que consiste en: una o más secuencias de código de barras, una o más secuencias de reconocimiento para enzimas de restricción, una o más secuencias de unión a sonda oligonucleotídica o complementos de las mismas, una o más secuencias de hibridación a cebador de secuenciación o complementos de las mismas, y una combinación de estas. En algunos modos de realización, la secuencia de conector comprende una secuencia universal común a múltiples cebadores en bucle diferentes.

65 En algunos modos de realización, el procedimiento comprende producir una secuencia complementaria a una región en un polinucleótido diana en una muestra en una única mezcla de reacción en condiciones para proporcionar la

5 secuencia completa con respecto a la región del polinucleótido diana, en el que la mezcla de reacción comprende: (a) el cebador en bucle que comprende una secuencia A, una secuencia de conector D y una secuencia B, orientadas desde 5' hacia 3' en una única hebra; en el que el cebador en bucle se hibrida específicamente al polinucleótido diana por medio de (i) complementariedad de secuencia entre la secuencia A del cebador en bucle y la secuencia A' en el polinucleótido diana, y (ii) complementariedad de secuencia entre la secuencia B y la secuencia B' en el polinucleótido diana, en el que la secuencia A' y la secuencia B' están orientadas desde 5' hacia 3' en el polinucleótido diana; (b) la polimerasa que extiende la secuencia B del cebador en bucle desde 5' hacia 3' a lo largo del polinucleótido diana que sirve como molde para una extensión del cebador dirigida por molde para producir la secuencia complementaria del polinucleótido diana; (c) el cebador inverso que presenta homología de secuencia con una secuencia en el polinucleótido diana localizada en 5' con respecto a la secuencia A' o B'; y (d) el cebador directo que se hibrida específicamente a una secuencia complementaria al cebador en bucle.

15 En un aspecto, la divulgación proporciona un procedimiento para detectar la presencia en una muestra de un alelo minoritario que es una variante de secuencia que difiere de un alelo correspondiente más abundante en una posición de base única. Los alelos diferentes se pueden detectar en la misma reacción o en reacciones diferentes, en las que cada alelo se detecta usando un cebador en bucle específico para uno de los alelos. En un modo de realización, el procedimiento comprende someter la muestra a una reacción de amplificación de ácido nucleico en una mezcla de reacción en condiciones para amplificar una región del alelo minoritario y el alelo más abundante que comprende la variante de secuencia usando un par de cebadores en bucle, en el que la mezcla de reacción comprende: (a) un primer cebador en bucle que comprende una secuencia A1, una secuencia de conector D1 y una secuencia B1, orientadas desde 5' hacia 3' en una única hebra; en el que el primer cebador en bucle se hibrida específicamente al alelo minoritario por medio de (i) complementariedad de secuencia entre la secuencia A1 del cebador en bucle y la secuencia A1' en el alelo minoritario, y (ii) complementariedad de secuencia entre la secuencia B1 del cebador en bucle y la secuencia B1' en el alelo minoritario, en el que la secuencia A1' y la secuencia B1' están orientadas desde 5' hacia 3' en el alelo minoritario; (b) un segundo cebador en bucle que comprende una secuencia A2, una secuencia de conector D2 y una secuencia B2, orientadas desde 5' hacia 3' en una única hebra; en el que el segundo cebador en bucle se hibrida específicamente al alelo más abundante por medio de (i) complementariedad de secuencia entre la secuencia A2 del cebador en bucle y la secuencia A2' en el alelo más abundante, y (ii) complementariedad de secuencia entre la secuencia B2 del cebador en bucle y la secuencia B2' en el alelo más abundante, en el que la secuencia A2' y la secuencia B2' están orientadas desde 5' hacia 3' en el alelo más abundante; y (c) una polimerasa que extiende la secuencia B1 y la secuencia B2 de los primer y segundo cebadores en bucle desde 5' hacia 3' a lo largo del alelo respectivo que sirve como molde para la extensión del cebador dirigida por molde para producir la secuencia complementaria de los alelos respectivos. En otro modo de realización, el procedimiento comprende someter porciones de la muestra a reacciones de amplificación de ácido nucleico en mezclas de reacción en condiciones para amplificar una región del alelo minoritario y el alelo más abundante que comprende la variante de secuencia usando un par de cebadores en bucle; en el que una primera mezcla de reacción comprende un primer cebador en bucle y una polimerasa, una segunda mezcla de reacción comprende un segundo cebador en bucle y una polimerasa, y además en el que: (a) el primer cebador en bucle comprende una secuencia A1, una secuencia de conector D1 y una secuencia B1, orientadas desde 5' hacia 3' en una única hebra; en el que el primer cebador en bucle se hibrida específicamente al alelo minoritario por medio de (i) complementariedad de secuencia entre la secuencia A1 del cebador en bucle y la secuencia A1' en el alelo minoritario, y (ii) complementariedad de secuencia entre la secuencia B1 del cebador en bucle y la secuencia B1' en el alelo minoritario, en el que la secuencia A1' y la secuencia B1' están orientadas desde 5' hacia 3' en el alelo minoritario; (b) el segundo cebador en bucle comprende una secuencia A2, una secuencia de conector D2 y una secuencia B2, orientadas desde 5' hacia 3' en una única hebra; en el que el segundo cebador en bucle se hibrida específicamente al alelo más abundante por medio de (i) complementariedad de secuencia entre la secuencia A2 del cebador en bucle y la secuencia A2' en el alelo más abundante, y (ii) complementariedad de secuencia entre la secuencia B2 del cebador en bucle y la secuencia B2' en el alelo más abundante, en el que la secuencia A2' y la secuencia B2' están orientadas desde 5' hacia 3' en el alelo más abundante; y (c) una polimerasa extiende la secuencia B1 o la secuencia B2 del primer o segundo cebador en bucle desde 5' hacia 3' a lo largo del alelo respectivo que sirve como molde para la extensión del cebador dirigida por molde para producir la secuencia complementaria de los alelos respectivos. En algunos modos de realización, la posición de base única en la que difieren los dos alelos está abarcada por A1/A2 o B1/B2. En algunos modos de realización, los dos alelos difieren en dos posiciones, donde una posición está abarcada por A1/A2 y una segunda posición está abarcada por B1/B2. La secuencia de D1 puede ser la misma o diferente de la secuencia de D2. Cuando las secuencias de D1 y D2 difieren, los productos de amplificación de los primer y segundo cebadores en bucle se pueden amplificar y/o detectar selectivamente. La amplificación y detección de productos de amplificación producidos usando el par de cebadores en bucle se pueden realizar de acuerdo con cualquier procedimiento adecuado descrito en el presente documento.

60 En la práctica de cualquiera de los procedimientos divulgados en el presente documento, el polinucleótido diana puede ser una molécula de ADN. En algunos modos de realización, el polinucleótido diana es una molécula de ARN. En algunos modos de realización, el polinucleótido diana es una molécula de ARN no codificante. En algunos modos de realización, la molécula de ARN no codificante se selecciona del grupo que consiste en: una molécula de microARN maduro, una molécula de pre-microARN, una molécula de microARN primario, una molécula de ARNip, una molécula de piARN, un piwiARN, un ARNnci, un ARNnr y una molécula de ARNhc. En algunos modos de realización, el polinucleótido diana tiene menos de 100 nt de longitud. En algunos modos de realización, el polinucleótido diana tiene

menos de 50 nt de longitud.

En otro aspecto, la presente divulgación proporciona una prueba para determinar una variación mononucleotídica en base a un par de cebadores en bucle que difieren en una posición de base en las secuencias A y B, de modo que uno reconozca un alelo de la secuencia diana y el otro reconozca un alelo diferente de la secuencia diana. Los cebadores en bucle también difieren en la secuencia de bucle D y se pueden amplificar y/o detectar selectivamente.

En otro aspecto, la presente divulgación proporciona una composición para producir una secuencia complementaria a una región en un polinucleótido diana en una muestra, comprendiendo la composición un cebador en bucle, un cebador directo y un cebador inverso, en la que: (a) el cebador en bucle que comprende una secuencia A, una secuencia de conector y una secuencia B, orientadas desde 5' hacia 3' en una única hebra; en la que el cebador en bucle se hibrida específicamente al polinucleótido diana por medio de (i) complementariedad de secuencia entre la secuencia A y la secuencia A' en el polinucleótido diana, y (ii) complementariedad de secuencia entre la secuencia B y la secuencia B' en el polinucleótido diana, en la que la secuencia A' y la secuencia B' están orientadas desde 5' hacia 3' en el polinucleótido diana; (b) el cebador inverso que presenta homología de secuencia con una secuencia en el polinucleótido diana localizada en 5' con respecto a la secuencia A'; y (c) el cebador directo que se hibrida específicamente a una secuencia en la secuencia de conector. En un modo de realización, la composición comprende además una sonda de detección que tiene complementariedad de secuencia con la secuencia complementaria del polinucleótido diana producido por extensión del cebador inverso o del cebador directo. En algunos modos de realización, la secuencia A tiene de 2 nt a aproximadamente 10 nt de longitud y la secuencia B tiene de 2 nt a aproximadamente 10 nt de longitud. En algunos modos de realización, la longitud combinada de las secuencias A y B es de aproximadamente 5 nt a aproximadamente 20 nt. En algunos modos de realización, la longitud combinada de las secuencias A y B es suficiente para hibridarse específicamente al polinucleótido diana para efectuar la extensión del cebador en bucle. En algunos modos de realización, una concatenación lineal de las secuencias B y A es al menos un 80 % complementaria a una concatenación lineal de las secuencias A' y B' cuando se alinean de forma óptima. En algunos modos de realización, una concatenación lineal de las secuencias B y A es al menos un 90 % complementaria a una concatenación lineal de las secuencias A' y B'. En algunos modos de realización, el extremo 3' de la secuencia A' está dentro de 1 nt a aproximadamente 5 nt de la secuencia B'. En algunos modos de realización, el polinucleótido diana es una molécula de ADN. En algunos modos de realización, el polinucleótido diana es una molécula de ARN. En algunos modos de realización, el polinucleótido diana cuando se utiliza en la composición objeto es una molécula de ARN no codificante. En algunos modos de realización, la molécula de ARN no codificante se selecciona del grupo que consiste en: una molécula de microARN maduro, una molécula de pre-microARN, una molécula de microARN primario, una molécula de ARNip, una molécula de piARN, un piwiARN, un ARNncl, un ARNr y una molécula de ARNhc. En algunos modos de realización, la secuencia de conector comprende uno o más elementos de secuencia seleccionados del grupo que consiste en: una o más secuencias de código de barras, una o más secuencias de reconocimiento para enzimas de restricción, una o más secuencias de unión a sonda oligonucleotídica o complementos de las mismas, una o más secuencias de hibridación a cebador de secuenciación o complementos de las mismas, y una combinación de estas. En algunos modos de realización, la secuencia de conector comprende una secuencia universal común a múltiples cebadores en bucle diferentes.

En algunos modos de realización, la composición para producir una secuencia complementaria a una región en un polinucleótido diana en una muestra está en un recipiente. En algunos modos de realización, el recipiente es un pocillo, una placa, un tubo, una cámara, una cubeta de lectura o un chip. En algunos modos de realización, la composición para producir una secuencia complementaria a una región en un polinucleótido diana en una muestra está en forma deshidratada. En algunos modos de realización, la composición para producir una secuencia complementaria a una región en un polinucleótido diana en una muestra está en forma de un kit. En algunos modos de realización, la presente divulgación proporciona un procedimiento de uso de la forma de kit de la composición para producir una secuencia complementaria a una región en un polinucleótido diana en una muestra que comprende realizar una reacción de amplificación de ácido nucleico en una mezcla de reacción que comprende un polinucleótido diana, el cebador en bucle, el cebador directo, el cebador inverso y una polimerasa para proporcionar una cantidad detectable de un amplicón, en el que el polinucleótido diana tiene menos de aproximadamente 100 nt de longitud. En algunos modos de realización, un procedimiento de uso de la forma de kit de la composición para producir una secuencia complementaria a una región en un polinucleótido diana en una muestra comprende además realizar una reacción de amplificación de ácido nucleico en una mezcla de reacción que comprende un polinucleótido diana, el cebador en bucle, el cebador directo, el cebador inverso y una polimerasa para proporcionar una cantidad detectable de un amplicón, en el que el polinucleótido diana tiene menos de aproximadamente 100 nt de longitud y la reacción de amplificación tiene un umbral de ciclo (C_T) de menos de 30.

En otro aspecto, la presente divulgación proporciona una mezcla de reacción para producir una secuencia complementaria a una región en un polinucleótido diana en una muestra, comprendiendo la mezcla de reacción un cebador en bucle, un cebador directo, un cebador inverso y una polimerasa, en la que: (a) el cebador en bucle que comprende una secuencia A, una secuencia de conector y una secuencia B, orientadas desde 5' hacia 3' en una única hebra; en la que el cebador en bucle se hibrida específicamente al polinucleótido diana por medio de (i) complementariedad de secuencia entre la secuencia A y la secuencia A' en el polinucleótido diana, y (ii) complementariedad de secuencia entre la secuencia B y la secuencia B' en el polinucleótido diana, en la que la secuencia A' y la secuencia B' están orientadas desde 5' hacia 3' en el polinucleótido diana; (b) el cebador inverso que

5 presenta homología de secuencia con una secuencia en el polinucleótido diana localizada en 5' con respecto a la secuencia A'; y (c) el cebador directo que se hibrida específicamente a una secuencia en la secuencia de conector. En un modo de realización, la mezcla de reacción comprende además una sonda de detección que tiene complementariedad de secuencia con la secuencia complementaria del polinucleótido diana producido por extensión del cebador inverso o del cebador directo. En algunos modos de realización, la secuencia A tiene de 2 nt a aproximadamente 10 nt de longitud y la secuencia B tiene de 2 nt a aproximadamente 10 nt de longitud. En algunos modos de realización, la longitud combinada de las secuencias A y B es de aproximadamente 5 nt a aproximadamente 20 nt. En algunos modos de realización, la longitud combinada de las secuencias A y B es suficiente para hibridarse específicamente al polinucleótido diana para efectuar la extensión del cebador en bucle. En algunos modos de realización, una concatenación lineal de las secuencias B y A es al menos un 80 % complementaria a una concatenación lineal de las secuencias A' y B' cuando se alinean de forma óptima. En algunos modos de realización, una concatenación lineal de las secuencias B y A es al menos un 90 % complementaria a una concatenación lineal de las secuencias A' y B'. En algunos modos de realización, el extremo 3' de la secuencia A' está dentro de 1 nt a aproximadamente 5 nt de la secuencia B'. En algunos modos de realización, el polinucleótido diana es una molécula de ADN. En algunos modos de realización, el polinucleótido diana es una molécula de ARN. En algunos modos de realización, el polinucleótido diana cuando se utiliza en la composición objeto es una molécula de ARN no codificante. En algunos modos de realización, la molécula de ARN no codificante se selecciona del grupo que consiste en: una molécula de microARN maduro, una molécula de pre-microARN, una molécula de microARN primario, una molécula de ARNip, una molécula de piARN, un piwiARN, un ARNnci, un ARNr y una molécula de ARNhc. En algunos modos de realización, la secuencia de conector comprende uno o más elementos de secuencia seleccionados del grupo que consiste en: una o más secuencias de código de barras, una o más secuencias de reconocimiento para enzimas de restricción, una o más secuencias de unión a sonda oligonucleotídica o complementos de las mismas, una o más secuencias de hibridación a cebador de secuenciación o complementos de las mismas, y una combinación de estas. En algunos modos de realización, la secuencia de conector comprende una secuencia universal común a múltiples cebadores en bucle diferentes.

10 En algunos modos de realización, la mezcla de reacción para producir una secuencia complementaria a una región en un polinucleótido diana en una muestra está en un recipiente. En algunos modos de realización, el recipiente es un pocillo, una placa, un tubo, una cámara, una cubeta de lectura o un chip. En algunos modos de realización, la mezcla de reacción para producir una secuencia complementaria a una región en un polinucleótido diana en una muestra está en forma deshidratada. En algunos modos de realización, la mezcla de reacción para producir una secuencia complementaria a una región en un polinucleótido diana en una muestra está en forma de un kit.

15 En algunos modos de realización, un procedimiento de uso del kit objeto comprende realizar una reacción de amplificación de ácido nucleico en una mezcla de reacción que comprende un polinucleótido diana, el cebador en bucle, el cebador directo, el cebador inverso y una polimerasa para proporcionar una cantidad detectable de un amplicón, en el que el polinucleótido diana tiene menos de aproximadamente 100 nt de longitud. En algunos modos de realización, el polinucleótido diana tiene menos de aproximadamente 100 nt de longitud y la reacción de amplificación tiene un umbral de ciclo (C_T) de menos de 30.

20 En otro aspecto, la presente divulgación proporciona un sistema para detectar un polinucleótido diana en una muestra, comprendiendo el sistema: (a) un ordenador configurado para recibir una solicitud de un cliente para realizar una reacción de detección en una muestra; (b) un sistema de amplificación que realiza una reacción de amplificación de ácido nucleico en una mezcla de reacción de la reivindicación 37 para producir un producto amplificado; y (c) un generador de informes que envía un informe a un destinatario, en el que el informe contiene resultados para la detección de una señal de detección correspondiente a la cantidad del producto amplificado. En un modo de realización, el destinatario es el cliente. En algunos modos de realización, un medio legible por ordenador comprende códigos que, tras la ejecución por uno o más procesadores, implementan un procedimiento de detección de un polinucleótido diana en una muestra, comprendiendo el procedimiento: (a) recibir una solicitud de un cliente para realizar una reacción de detección en una muestra; (b) realizar una reacción de amplificación de ácido nucleico en una mezcla de reacción de la reivindicación 40 para producir un producto amplificado; y (c) generar un informe que contenga los resultados para la detección de una señal de detección correspondiente a la cantidad del producto amplificado.

25 En cualquiera de los diversos aspectos de la divulgación, una secuencia de conector de un cebador en bucle puede comprender una estructura de horquilla.

30 Los procedimientos, composiciones, mezclas de reacción, kits y/o sistemas de la presente divulgación son útiles para producir una secuencia complementaria a una región en un polinucleótido diana en una muestra. Se pueden añadir reactivos suficientes para lograr tanto la extensión del primer cebador como la amplificación posterior al mismo tiempo o en momentos separados. En otros modos de realización, los productos de la reacción de extensión del primer cebador se pueden transferir, completamente o en parte, diluidos o no diluidos, a un recipiente separado en el que realizar el procedimiento de amplificación. Los ejemplos no limitantes de recipiente adecuado incluyen tubos de microcentrifugadora, tubos cónicos, tubos de paredes delgadas, tubos en tiras, placas de múltiples pocillos, dispositivos microfluídicos y micromatrices. En algunos modos de realización, la secuencia complementaria a una región en un polinucleótido diana en una muestra o su producto de amplificación es útil para la detección y/o

cuantificación del polinucleótido diana en un material de partida. Los procedimientos y dispositivos objeto son, en particular, útiles para detectar asociaciones genéticas, diagnósticos, pronósticos y/o medicinas personalizadas.

BREVE DESCRIPCIÓN DE LOS DIBUJOS

- 5 Los rasgos característicos novedosos de la invención se exponen con particularidad en las reivindicaciones adjuntas. Se obtendrá un mejor entendimiento de los rasgos característicos y ventajas de la presente invención por referencia a la siguiente descripción detallada que expone modos de realización ilustrativos y los dibujos adjuntos de los que:
- 10 La FIG. 1 muestra una representación esquemática ejemplar de un esquema de amplificación de secuencia complementaria de la presente divulgación.
- La FIG. 2 muestra un análisis de electroforesis capilar (EC) ejemplar del rendimiento de la retrotranscripción (RT) generado por un cebador específico de acuerdo con un modo de realización de la presente divulgación.
- 15 La FIG. 3 muestra una amplificación ejemplar del producto de RT por qPCR con concentraciones diferentes de cebadores de acuerdo con un modo de realización de la presente divulgación.
- La FIG. 4 muestra un análisis de EC ejemplar de los rendimientos de RT generados por un cebador específico a 42 °C o bien 37 °C de acuerdo con un modo de realización de la presente divulgación.
- 20 La FIG. 5 muestra un análisis ejemplar del rendimiento de RT generado por un cebador específico de acuerdo con un modo de realización de la presente divulgación.
- 25 La FIG. 6 muestra un análisis de EC ejemplar de productos de RT generados por miARN diferentes con un cebador para RT específico de acuerdo con un modo de realización de la presente divulgación.
- La FIG. 7 muestra un ejemplo de discriminación entre miARN con diferencias mononucleotídicas de acuerdo con un modo de realización de la presente divulgación.
- 30 La FIG. 8 ilustra un ejemplo no limitante de un sistema informático útil en procedimientos, composiciones, mezclas de reacción, kits y/o sistemas de la divulgación.
- La FIG. 9 representa una representación esquemática ejemplar de un esquema de amplificación de secuencia complementaria de la divulgación.
- 35 La FIG. 10 muestra ejemplos de cebadores y resultados para la amplificación específica de miembros de la familia de miARN de acuerdo con un modo de realización de la presente divulgación.
- 40 La FIG. 11 proporciona resultados que muestran la sensibilidad de amplificación de diana para miembros de la familia de miARN (let-7 a, b, c, d y e) de acuerdo con un modo de realización de la presente divulgación. Los resultados indican una sensibilidad de al menos aproximadamente 25-250 copias de copias de miARN por µl. La eficacia del ensayo fue de aproximadamente un 80-90 %.
- 45 La FIG. 12 proporciona un ejemplo de cebadores y resultados de amplificación que ilustran la reducción de la señal de fondo de acuerdo con un modo de realización de la presente divulgación.
- La FIG. 13 representa los resultados de un análisis ejemplar de la longitud de la secuencia complementaria hacia 3' de un cebador específico de acuerdo con un modo de realización de la divulgación.
- 50 La FIG. 14 representa los resultados de un análisis ejemplar de la longitud de secuencias complementarias hacia 5' y 3' de acuerdo con un modo de realización de la divulgación.
- La FIG. 15 representa los resultados de un análisis ejemplar de la longitud de la secuencia de brazo hacia 5' y hacia 3' de acuerdo con un modo de realización de la divulgación.
- 55 Las FIGS. 16A y 16B muestran un esquema ejemplar para y los resultados de un análisis ejemplar de la reducción de fondo usando un oligonucleótido de bloqueo.
- 60 Las FIGS. 17A y 17B muestran los resultados de una optimización de ejemplo de las condiciones de RT-PCR de acuerdo con un modo de realización de la divulgación. La concentración del cebador para RT fue de aproximadamente 50 nM. El perfil de temperatura fue como sigue: 25 °C durante 45 minutos; 85 °C durante 5 minutos.

DEFINICIONES

- 65 Los términos "polinucleótido", "ácido nucleico" y "oligonucleótido" se usan de manera intercambiable. Se refieren a

una forma polimérica de nucleótidos de cualquier longitud, desoxirribonucleótidos o bien ribonucleótidos, o análogos de los mismos. Los polinucleótidos pueden tener cualquier estructura tridimensional y pueden realizar cualquier función, conocida o desconocida. Los siguientes son ejemplos no limitantes de polinucleótidos: regiones codificantes o no codificantes de un gen o fragmento de gen, ADN intergénico, locus definido(s) a partir de análisis de enlace, exones, intrones, ARN mensajero (ARNm), ARN de transferencia, ARN ribosómico, ARN interferente pequeño (ARNip), ARN de horquilla corta (ARNhc), microARN (miARN), ARN nucleolar pequeño, ribozimas, ADNc, polinucleótidos recombinantes, polinucleótidos ramificados, plásmidos, vectores, ADN aislado de cualquier secuencia, ARN aislado de cualquier secuencia, sondas de ácido nucleico, adaptadores y cebadores. Un polinucleótido puede comprender nucleótidos modificados, tales como nucleótidos metilados y análogos nucleotídicos. Si están presentes, se pueden conferir modificaciones en la estructura nucleotídica antes o después del ensamblaje del polímero. La secuencia de nucleótidos se puede interrumpir por componentes no nucleotídicos. Un polinucleótido se puede modificar además después de la polimerización, tal como por conjugación con un componente de marcaje, marca, resto reactivo o compañero de unión. Las secuencias de polinucleótido, cuando se proporcionan, se enumeran en sentido desde 5' hacia 3', a menos que se establezca de otro modo.

Como se usa en el presente documento, los términos "polinucleótido diana" y "secuencia diana" se usan de manera intercambiable, y se refieren a moléculas de ácido nucleico o polinucleótidos en una población de moléculas de ácido nucleico que tienen una secuencia diana a la que uno o más oligonucleótidos de la invención están diseñados para hibridarse. En algunos modos de realización, una secuencia diana identifica de forma única una secuencia derivada de una muestra, tal como una secuencia genómica, mitocondrial, bacteriana, vírica o de ARN (por ejemplo, ARNm, miARN, miARN primario o pre-miARN) particular. En algunos modos de realización, una secuencia diana es una secuencia común compartida por múltiples polinucleótidos diana diferentes, tal como una secuencia de adaptador común enlazada a polinucleótidos diana diferentes. "Polinucleótido diana" se puede usar para referirse a una molécula de ácido nucleico bicatenario que comprende una secuencia diana en una o ambas hebras, o una molécula de ácido nucleico monocatenario que comprende una secuencia diana, y se puede derivar de cualquier fuente o procedimiento para aislar o generar moléculas de ácido nucleico. Un polinucleótido diana puede comprender una o más (por ejemplo, 1, 2, 3, 4, 5, 6, 7, 8, 9, 10 o más) secuencias diana, que pueden ser iguales o diferentes. En general, los polinucleótidos diana diferentes comprenden secuencias diferentes, tal como uno o más nucleótidos diferentes o una o más secuencias diana diferentes.

"Híbrida" y "de hibridación" se refieren a una reacción en la que uno o más polinucleótidos reaccionan para formar un complejo que se estabiliza por medio de enlaces de hidrógeno entre las bases de los residuos nucleotídicos. Los enlaces de hidrógeno se pueden producir por emparejamiento de bases de Watson-Crick, unión de Hoogsteen o de cualquier otra manera específica de secuencia. El complejo puede comprender dos hebras que formen una estructura de doble hélice, tres o más hebras que formen un complejo de múltiples hebras, una única hebra autohíbrida o cualquier combinación de estas. Una reacción de hibridación puede constituir una etapa en un procedimiento más extenso, tal como el comienzo de una PCR, o la escisión enzimática de un polinucleótido por una ribozima. Se dice que una primera secuencia que se puede estabilizar por medio de enlaces de hidrógeno con las bases de los residuos nucleotídicos de una segunda secuencia es "hibrizable" a la segunda secuencia. En un caso de este tipo, también se puede decir que la segunda secuencia es hibrizable a la primera secuencia.

"Complemento", "complementos", "complementaria" y "complementariedad" se refieren a una secuencia que es completamente complementaria a e hibrizable a la secuencia dada. En general, una primera secuencia que es hibrizable a una segunda secuencia o conjunto de segundas secuencias es específica o selectivamente hibrizable a la segunda secuencia o conjunto de segundas secuencias, de modo que es preferente la hibridación a la segunda secuencia o conjunto de segundas secuencias (por ejemplo, termodinámicamente más estable en un conjunto de condiciones dado, tal como condiciones rigurosas comúnmente usadas en la técnica) a la hibridación con secuencias no diana durante una reacción de hibridación. Típicamente, las secuencias hibrizables comparten un grado de complementariedad de secuencia en la totalidad o una porción de sus longitudes respectivas, tal como entre un 25 %-100 % de complementariedad, incluyendo al menos aproximadamente un 25 %, 30 %, 35 %, 40 %, 45 %, 50 %, 55 %, 60 %, 65 %, 70 %, 75 %, 80 %, 85 %, 90 %, 91 %, 92 %, 93 %, 94 %, 95 %, 96 %, 97 %, 98 %, 99 % y 100 % de complementariedad de secuencia.

El término "hibridado" como se aplica a un polinucleótido se refiere a un polinucleótido en un complejo que se estabiliza por medio de enlaces de hidrógeno entre las bases de los residuos nucleotídicos. Los enlaces de hidrógeno se pueden producir por emparejamiento de bases de Watson-Crick, unión de Hoogsteen o de cualquier otra manera específica de secuencia. El complejo puede comprender dos hebras que formen una estructura de doble hélice, tres o más hebras que formen un complejo de múltiples hebras, una única hebra autohíbrida o cualquier combinación de estas. La reacción de hibridación puede constituir una etapa en un procedimiento más extenso, tal como el comienzo de una reacción de PCR, reacción de unión, reacción de secuenciación o reacción de escisión.

La presente invención es aplicable para amplificar una variedad de moléculas de ARN corto y moléculas de ARN no codificante. Como se usa en el presente documento, el término "molécula de ARN no codificante" o "molécula de ARN corto" se refiere a cualquier molécula de ARN que no codifica una proteína. Los ejemplos no limitantes de moléculas de ARN no codificante incluyen: microARN (miARN), ARN que interactúa con piwi (piARN), ARN interferente pequeño (ARNip), ARN de horquilla corta (ARNhc), ARN nuclear pequeño (ARNnp), ARN nucleolar pequeño (ARNnop), ARN

de transferencia (ARNt) y ARN ribosómico (ARNr). Como se usa en el presente documento, el término "microARN" se usa para referirse a cualquier forma de microARN en la biogénesis de microARN maduro, incluyendo microARN primario (pri-miARN), pre-microARN (pre-miARN) y microARN maduro. La diana de ARN puede estar presente en menos de 1.000.000, 100.000, 10.000, 5000, 2500, 1000, 500 o 100 copias o copias por célula.

5 Como se usa en el presente documento, "microARN maduro" se refiere a una molécula de ARN que tiene una longitud en el intervalo de 19 a 30 nucleótidos. Los términos "microARN" y "miARN" se pueden usar de manera intercambiable. Los ejemplos no limitantes de miARN conocidos en la técnica incluyen: miR-1, miR-7, miR-9*, miR-10a, miR-10b, miR-15a, miR-15b, miR-16, miR-17-3p, miR-17-5p, miR-18, miR-19a, miR-19b, miR-20, miR-21, miR-22, miR-23a, miR-23b, miR-24, miR-25, miR-26a, miR-26b, miR-27a, miR-28, miR-29a, miR-29b, miR-29c, miR-30a-5p, miR-30b, miR-30c, miR-30d, miR-30e-5p, miR-30e-3p, miR-31, miR-32, miR-33, miR-34a, miR-34b, miR-34c, miR-92, miR-93, miR-95, miR-96, miR-98, miR-99a, miR-99b, miR-100, miR-101, miR-103, miR-105, miR-106a, miR-107, miR-122, miR-122a, miR-124, miR-124, miR-124a, miR-125a, miR-125b, miR-126, miR-126*, miR-127, miR-128a, miR-128b, miR-129, miR-130a, miR-130b, miR-132, miR-133a, miR-133b, miR-134, miR-135a, miR-135b, miR-136, miR-137, miR-138, miR-139, miR-140, miR-141, miR-142-3p, miR-143, miR-144, miR-145, miR-146, miR-147, miR-148a, miR-148b, miR-149, miR-150, miR-151, miR-152, miR-153, miR-154*, miR-154, miR-155, miR-181a, miR-181b, miR-181c, miR-182*, miR-182, miR-183, miR-184, miR-185, miR-186, miR-187, miR-188, miR-189, miR-190, miR-191, miR-192, miR-193, miR-194, miR-195, miR-196a, miR-196b, miR-197, miR-198, miR-199a*, miR-199a, miR-199b, miR-200a, miR-200b, miR-200c, miR-202, miR-203, miR-204, miR-205, miR-206, miR-208, miR-210, miR-211, miR-212, miR-213, miR-213, miR-214, miR-215, miR-216, miR-217, miR-218, miR-220, miR-221, miR-222, miR-223, miR-224, miR-296, miR-299, miR-301, miR-302a*, miR-302a, miR-302b*, miR-302b, miR-302d, miR-302c*, miR-302c, miR-320, miR-323, miR-324-3p, miR-324-5p, miR-325, miR-326, miR-328, miR-330, miR-331, miR-337, miR-338, miR-339, miR-340, miR-342, miR-345, miR-346, miR-363, miR-367, miR-368, miR-370, miR-371, miR-372, miR-373*, miR-373, miR-374, miR-375, miR-376b, miR-378, miR-379, miR-380-5p, miR-380-3p, miR-381, miR-382, miR-383, miR-410, miR-412, miR-422a, miR-422b, miR-423, miR-424, miR-425, miR-429, miR-431, miR-448, miR-449, miR-450, miR-451, let7a, let7b, let7c, let7d, let7e, let7f, let7g, let7i, miR-376a y miR-377. Se pueden encontrar otros ejemplos de dianas a las que se aplican los procedimientos de la presente invención, así como las secuencias de las dianas de microARN mencionadas anteriormente, en "la base de datos de secuencias de miRBase" como se describe en Griffith-Jones *et al.* (2004), *Nucleic Acids Research* 32:D109-D111, y Griffith-Jones *et al.* (2006), *Nucleic Acids Research* 34: D140-D144.

35 Como se usa en el presente documento, los términos "pre-microARN" y "pre-miARN" se usan de manera intercambiable para referirse a cualquier molécula en la que su procesamiento libere un miARN maduro. Las moléculas de pre-miARN comprenden una región de estructura secundaria, que comprende una región de ARN bicatenario y una región de bucle formada por la secuencia entre las regiones que contribuyen a la región bicatenaria, lo que da como resultado una estructura similar a horquilla. Los términos "ARN primario" y "pri-miARN" se usan de manera intercambiable para referirse a cualquier molécula en la que su procesamiento dé como resultado un pre-miARN. Los pri-miARN pueden proceder de una variedad de fuentes genómicas, incluyendo, sin limitación, distintos transcritos, regiones intergénicas, regiones no traducidas de otros transcritos e intrones (incluyendo los denominados "mirtrones").

40 Como se usa en el presente documento, los términos "ARN interferente pequeño" y "ARNip" se usan de manera intercambiable para referirse a cualquier molécula de ARN más corta que aproximadamente 50, 40, 35, 30, 25, 20 o menos nucleótidos que pueda inducir el silenciamiento de una diana génica en base a la complementariedad. El silenciamiento típicamente está mediado por una proteína Argonaute y típicamente comienza por un activador de molécula de ARN corto. El silenciamiento puede ser postranscripcional o transcripcional. La molécula de ARNip puede ser completa o parcialmente complementaria al gen o genes en los que su expresión se reduce, y el silenciamiento se puede efectuar con o sin escisión de un transcrito de ARNm. Como se usa en el presente documento, los términos "ARN de horquilla corta" y "ARNhc" se usan de manera intercambiable para referirse a cualquier molécula de ARN monocatenario que tenga dos regiones que se puedan someter a emparejamiento de bases entre sí separadas por una región que no participe en el emparejamiento de bases en la que su procesamiento libere uno o más ARNip. Los ARNhc pueden ser de origen celular (endógeno) o artificial (exógeno). ARNip endógeno incluye "piARN" que sea cualquiera de una clase de ARN que interactúen con Piwi.

55 Además, como se apreciará por los expertos en la técnica, algunos miARN se pueden caracterizar además en términos de sus capacidades de afectar a la regulación génica en una amplia variedad de organismos y en una amplia variedad de tejidos. Un único gen se puede regular por múltiples miARN, y la regulación por miARN puede actuar de forma sinérgica. Un único miARN también puede regular múltiples ARNm, por ejemplo, algunas estimaciones han sugerido que un único miARN humano puede regular hasta 100-200 genes. También se ha descrito recientemente que hasta un 30 % de los genes humanos son dianas para la regulación por miARN. Se puede aislar miARN de una variedad de organismos, incluyendo sus ejemplos no limitantes mamíferos, anfibios, insectos, nematodos, plantas y muchos otros en la gama de metazoos a virus. Los miARN se pueden expresar de forma diferencial entre organismos, entre tejidos dentro de un organismo y regular temporalmente dentro de un organismo. La regulación por miARN puede afectar a múltiples procedimientos. Los ejemplos no limitantes de los procedimientos afectados por la regulación génica por miARN incluyen: diferenciación, desarrollo, envejecimiento, apoptosis, oncogénesis, metabolismo, crecimiento celular y proliferación celular (Zhou *et al.* (2007), *BMC Genomics* 8: 396; y Lu *et al.* (2008), *PLoS ONE* 3(10): e3420). Como consecuencia de las muchas vías afectadas, la regulación incorrecta de los miARN y sus dianas se ha implicado en

muchas enfermedades, incluyendo sus ejemplos no limitantes: cardiovasculopatías, trastornos autoinmunitarios, psoriasis, infección vírica, esquizofrenia, trastornos del metabolismo lipídico, obesidad, asma, síndrome de Down, trastornos de la función renal, homeostasis de líquidos, anomalías en el desarrollo, trastorno mieloproliferativo crónico, eccema atópico, distrofia miotónica, Parkinson, diabetes, neurodegeneración, síndrome de Tourette, síndrome del cromosoma X frágil (Lu *et al.* (2008), PLoS ONE 3(10): e3420). La regulación incorrecta de miARN y sus dianas se ha implicado además en una serie de cánceres, incluyendo sus ejemplos no limitantes: mieloma múltiple, linfoma, linfoma de Burkitt, linfoma de Burkitt pediátrico, linfoma de Burkitt en adultos, linfoma de linfocitos B, cáncer sólido, neoplasias malignas hematopoyéticas, cáncer de colon, cáncer de mama, cáncer de cuello uterino, cáncer de ovario, linfoma de células del manto, adenomas hipofisarios, leucemia, cáncer de próstata, cáncer de estómago, cáncer de páncreas, cánceres de tiroides, cáncer de pulmón, cáncer de tiroides papilar, cáncer de vejiga, tumores de células reproductoras, tumor cerebral, y tumores de células reproductoras testiculares. *Id.* Como tales, los miARN pueden ser útiles como marcadores en el diagnóstico, pronóstico y/o medicina personalizada de una enfermedad.

Como se usa en el presente documento, el término "homología" se refiere a una secuencia de nucleótidos que es homóloga a una secuencia de nucleótidos de referencia. Por el contrario, los términos "complementario" y "complemento" se refieren a una secuencia de nucleótidos que se pueda someter a emparejamiento de bases con una secuencia de nucleótidos de referencia, tal como durante la fase de hibridación de una reacción de PCR. Además, "no complementaria" se usa para referirse a una secuencia que carece de suficiente complementariedad de secuencia para estabilizar un par de bases con una secuencia de referencia en un conjunto de condiciones dado, tal como durante la fase de hibridación de una reacción de PCR. El grado de homología y complementariedad puede variar de acuerdo con una aplicación dada, y puede ser más de un 5 %, 10 %, 20 %, 30 %, 40 %, 50 %, 60 %, 70 %, 80 %, 90 % o más de un 95 %. Además, el término "sustancialmente no complementaria", como se usa en el presente documento, se refiere a una secuencia de nucleótidos que es menos de aproximadamente un 50 %, 40 %, 30 %, 20 %, 10 % o menos de aproximadamente un 5 % complementaria a una secuencia de referencia. Se entiende que las bases nitrogenadas de purina y pirimidina con estructuras similares pueden ser funcionalmente equivalentes en términos de emparejamiento Watson-Crick; y la intersustitución de bases nitrogenadas similares, tal como por metilación, no constituye una sustitución material.

Como se usa en el presente documento, los términos "amplificar", "amplifica", "amplificado", "amplificación" y "amplicón" se refieren a cualquier procedimiento para replicar un ácido nucleico con el uso de una polimerasa dependiente de cebador y/o los productos de aquellos procedimientos. En un modo de realización preferente, la amplificación se efectúa por medio de PCR usando un par de cebadores, que comprenden un primer y segundo cebador como se describe anteriormente. Los productos amplificados se pueden someter a análisis de subsecuencias, incluyendo, pero sin limitarse a, análisis de la curva de fusión, secuenciación de nucleótidos, ensayo de polimorfismos de conformación monocatenaria, hibridación de oligonucleótidos específicos de alelo, análisis por transferencia de Southern y digestión con endonucleasas de restricción.

Los productos de amplificación se pueden detectar por el uso de una sonda. Como se usa en el presente documento, el término "sonda" se refiere a un polinucleótido que tiene un miembro detectable y tiene complementariedad con un ácido nucleico diana, pudiendo hibridarse así con dicha diana y detectarse por dicho miembro detectable. En determinados modos de realización, una sonda puede incluir bases de Watson-Crick o bases modificadas. Las bases modificadas incluyen, pero no se limitan a, las bases AEGIS (de Eragen Biosciences), que se han descrito, por ejemplo, en las pat. de EE. UU. n.ºs 5.432.272; 5.965.364; y 6.001.983. En determinados aspectos, las bases se enlazan por un enlace fosfodiéster natural o un enlace químico diferente. Los enlaces químicos diferentes incluyen, pero no se limitan a, un enlace peptídico o un enlace de tipo ANB, que se describe, por ejemplo, en las solicitudes PCT publicadas WO 00/56748 y WO 00/66604.

La práctica de la presente invención emplea, a menos que se indique de otro modo, técnicas convencionales de bioquímica, química, biología molecular, microbiología, biología celular, genómica y ADN recombinante, que están dentro de la habilidad de la técnica. Véanse, por ejemplo, Sambrook, Fritsch y Maniatis, MOLECULAR CLONING: A LABORATORY MANUAL, 2.^a edición (1989); CURRENT PROTOCOLS IN MOLECULAR BIOLOGY (eds. F. M. Ausubel, *et al.*, (1987)); la serie METHODS IN ENZYMOLOGY (Academic Press, Inc.): PCR 2: A PRACTICAL APPROACH (eds. M. J. MacPherson, B. D. Hames y G. R. Taylor (1995)), y ANIMAL CELL CULTURE (ed. R. I. Freshney (1987)).

DESCRIPCIÓN DETALLADA DE LA INVENCION

La presente divulgación proporciona procedimientos, composiciones, mezclas de reacción, kits y/o sistemas para producir una secuencia complementaria a una región en un polinucleótido diana en una muestra. Estos procedimientos, composiciones, mezclas de reacción, kits y/o sistemas son, en particular, útiles para detectar ácidos nucleicos cortos.

Procedimientos:

En un aspecto, la presente divulgación proporciona un procedimiento para producir una secuencia complementaria a una región en un polinucleótido diana en una muestra, comprendiendo el procedimiento: someter la muestra a una

reacción de amplificación de ácido nucleico en una mezcla de reacción en condiciones para proporcionar la secuencia completa con respecto a la región del polinucleótido diana, en el que la mezcla de reacción comprende: (a) un cebador en bucle que comprende una secuencia A, una secuencia de conector D y una secuencia B, orientadas desde 5' hacia 3' en una única hebra; en el que el cebador en bucle se hibrida específicamente al polinucleótido diana por medio de
 5 (i) complementariedad de secuencia entre la secuencia A del cebador en bucle y la secuencia A' en el polinucleótido diana, y (ii) complementariedad de secuencia entre la secuencia B del cebador en bucle y la secuencia B' en el polinucleótido diana, en el que la secuencia A' y la secuencia B' están orientadas desde 5' hacia 3' en el polinucleótido diana; y (b) una polimerasa que extiende la secuencia B del cebador en bucle desde 5' hacia 3' a lo largo del polinucleótido diana que sirve como molde para la extensión del cebador dirigida por molde para producir la secuencia complementaria del polinucleótido diana.
 10

En otro aspecto, la presente invención proporciona un procedimiento para producir una secuencia complementaria a una región en un polinucleótido diana en una muestra, comprendiendo el procedimiento: someter la muestra a una reacción de amplificación de ácido nucleico que tiene un cebador en bucle, un cebador directo, un cebador inverso y una polimerasa en condiciones para proporcionar la secuencia completa con respecto a la región del polinucleótido diana, en el que la mezcla de reacción comprende: (a) el cebador en bucle que comprende una secuencia A, una secuencia de conector D y una secuencia B, orientadas desde 5' hacia 3' en una única hebra; en el que el cebador en bucle se hibrida específicamente al polinucleótido diana por medio de (i) complementariedad de secuencia entre la secuencia A del cebador en bucle y la secuencia A' en el polinucleótido diana, y (ii) complementariedad de secuencia
 15 entre la secuencia B y la secuencia B' en el polinucleótido diana, en el que la secuencia A' y la secuencia B' están orientadas desde 5' hacia 3' en el polinucleótido diana; (b) la polimerasa que extiende la secuencia B del cebador en bucle desde 5' hacia 3' a lo largo del polinucleótido diana que sirve como molde para una extensión del cebador dirigida por molde para producir la secuencia complementaria del polinucleótido diana; (c) el cebador inverso que presenta homología de secuencia con una secuencia en el polinucleótido diana localizada en 5' con respecto a la secuencia A' o B'; y (d) el cebador directo que se hibrida específicamente a una secuencia complementaria al cebador en bucle.
 20
 25

El cebador en bucle usado en cualquiera de los procedimientos o presente en cualquiera de las composiciones divulgadas en el presente documento se refiere a un polinucleótido que tiene dos tramos de complementariedad con el polinucleótido diana en sus dos extremos. La secuencia A usada en el procedimiento es el tramo complementario en el extremo 5' del cebador en bucle, y la secuencia B usada en el procedimiento es el tramo complementario en el extremo 3' del cebador en bucle. Estas dos secuencias, usadas en el procedimiento, se someten a emparejamiento de bases con las secuencias A' y B' del polinucleótido diana, donde A' se sitúa más hacia 5' que B'. Las secuencias A' y B' están muy cerca entre sí y están separadas solo por una secuencia de N' en el polinucleótido diana, como se usa en el procedimiento. La secuencia A y A' pueden tener al menos 2, 3, 4, 5, 6, 7, 8, 9 o 10 nucleótidos. En algunos modos de realización, la secuencia A tiene entre 5-15 nucleótidos de longitud (por ejemplo, 10 nucleótidos de longitud). Las secuencias B y B' pueden tener al menos 5, 6, 7, 8, 9, 10, 11, 12, 13, 14, 15, 16, 17, 18, 19 o 20 nucleótidos. En algunos modos de realización, la secuencia B tiene entre 4-6 nucleótidos de longitud. La secuencia N' puede tener 1, 2, 3, 4 o 5 nucleótidos. La secuencia de conector interpuesta usada en el procedimiento entre la secuencia A y B en el cebador en bucle, la secuencia D, puede tener una longitud suficiente para permitir que el espacio estructural para el cebador en bucle tenga una hibridación de A y B a A' y B', respectivamente, al mismo tiempo.
 30
 35
 40

En la práctica de cualquiera de los procedimientos divulgados, el cebador en bucle se diseña, en general, para hibridarse específicamente al polinucleótido diana con emparejamiento de bases A-A' y emparejamiento de bases B-B'. A continuación, una polimerasa se extiende desde el extremo 3' de la secuencia B, usando el polinucleótido diana como molde, para generar la secuencia complementaria al polinucleótido diana, con el complemento a las regiones N', A' y, a continuación, el resto del polinucleótido diana generado por medio de la extensión del cebador dirigida por molde, producidos en ese orden. Durante la extensión del cebador dirigida por molde, la hibridación A-A' se detiene a medida que la polimerasa se extiende desde el extremo 3' de la secuencia B. Por lo tanto, la primera secuencia complementaria tendrá, desde 5' hacia 3', las siguientes regiones: A, D, B, N, A y el resto del polinucleótido diana. Esta secuencia complementaria es más larga debido a la longitud proporcionada por la secuencia D. Esta secuencia complementaria también puede estar en una forma más estable que el polinucleótido diana; por ejemplo, si el polinucleótido diana es un miARN y la polimerasa es una retrotranscriptasa, esta secuencia complementaria es un polinucleótido ADN más largo, que es más estable.
 45
 50
 55

Una consideración para el diseño del cebador en bucle usado en cualquiera de los procedimientos o composiciones objeto es la región de complementariedad seleccionada para A-A' y B-B'. Puesto que la extensión del cebador dirigida por molde se produce en el extremo 3' de la secuencia B, de modo que solo se amplifiquen las regiones hacia 5' de B' en el polinucleótido diana, es deseable que las regiones de A' y B' se seleccionen para que estén relativamente cerca del extremo 3' del polinucleótido diana. Una selección de este tipo asegura que un número suficiente de secuencias de polinucleótido diana estén en 5' de la hibridación A-A' y B-B' para incluirse en la primera secuencia complementaria.
 60

La longitud del cebador en bucle, secuencia A y secuencia B, dependerá de muchos factores conocidos en la técnica, tales como la temperatura de hibridación deseada del cebador, la secuencia de ácido nucleico diana y la complejidad de las secuencias de ácido nucleico diana diferentes que se van a amplificar. La secuencia de ácido nucleico del
 65

cebador en bucle se incorpora a la secuencia de cada primera molécula de ácido nucleico complementario sintetizada. En algunos modos de realización, el primer polinucleótido ácido nucleico complementario localizado en el extremo 3' del cebador en bucle es complementario a y, por tanto, se puede hibridar con, al menos una porción del polinucleótido ácido nucleico complementario diana, y puede tener al menos aproximadamente 3, 4, 5, 6, 7, 8, 9, 10, 11, 12, 13, 14, 15, 16, 17, 18, 19, 20 o más nucleótidos de longitud. En algunos modos de realización, la primera molécula de ácido nucleico complementario comprende uno o más emparejamientos erróneos nucleotídicos con la secuencia diana, tal como 1, 2, 3, 4, 5, 6, 7, 8, 9, 10 o más emparejamientos erróneos. La selección de una secuencia sustancialmente no complementaria dependerá de la diana que se va a amplificar. Una secuencia sustancialmente no complementaria de este tipo puede ser artificial o estar diseñada, tal como una secuencia encontrada en otro organismo, una secuencia encontrada en otra especie, una secuencia encontrada en otra subespecie, una secuencia sustancialmente no complementaria de un miembro diferente de la misma especie, una secuencia del mismo sujeto seleccionada de una región sustancialmente no complementaria a la diana, una secuencia generada aleatoriamente que se sabe que es sustancialmente no complementaria a la diana, o una secuencia diseñada específicamente que se sabe que es sustancialmente no complementaria a la diana.

En algunos modos de realización, la secuencia A usada en la práctica de los procedimientos objeto tiene de 2 nt a aproximadamente 10 nt de longitud y la secuencia B tiene de 2 nt a aproximadamente 10 nt de longitud. En algunos modos de realización, la longitud combinada de las secuencias A y B es de aproximadamente 5 nt a aproximadamente 20 nt. En algunos modos de realización, la longitud combinada de las secuencias A y B es suficiente para hibridarse específicamente al polinucleótido diana para efectuar la extensión del cebador en bucle. En algunos modos de realización, una concatenación lineal de las secuencias B y A es al menos un 80 % complementaria a una concatenación lineal de las secuencias A' y B' cuando se alinean de forma óptima. En algunos modos de realización, una concatenación lineal de las secuencias B y A es al menos un 90 % complementaria a una concatenación lineal de las secuencias A' y B'. En algunos modos de realización, el extremo 3' de la secuencia A' está dentro de 1 nt a aproximadamente 5 nt de la secuencia B'.

Otra consideración para el diseño del cebador en bucle, como se usa en el procedimiento, es el número de nucleótidos en las secuencias de las hibridaciones A-A' y B-B'. El número total de nucleótidos puede incrementar la especificidad y estabilidad del cebador en bucle y el complejo de polinucleótido diana. La especificidad y estabilidad de este complejo contribuye a la exactitud en la amplificación y cuantificación posteriores del polinucleótido diana. Cuando se desee, el número de nucleótidos en la secuencia B puede ser mayor que el número de nucleótidos en la secuencia A para incrementar la eficacia, de modo que se detenga la hibridación A-A' durante el alargamiento de la extensión del cebador desde el extremo 3' de la secuencia B.

En algunos modos de realización, la secuencia A y B tienen la misma longitud en bases nucleotídicas, comprendiendo al menos 3, 4, 5, 6, 7, 8, 9 o 10, pero no más de aproximadamente 50 nucleótidos. En otro modo de realización, la secuencia A es de 2 nucleótidos y la secuencia B es de 3 nucleótidos. En otro modo de realización, la secuencia A es de 2 nucleótidos y la secuencia B es de 4 nucleótidos. En otro modo de realización, la secuencia A es de 3 nucleótidos y la secuencia B es de 4 nucleótidos.

Una consideración relacionada para el diseño del cebador en bucle es la longitud combinada de las secuencias de A y B, que, en general, es suficiente para permitir la hibridación específica al polinucleótido diana. Esta hibridación debe ser lo suficientemente estable para permitir el tiempo para el alargamiento posterior del extremo 3' de la secuencia B. En algunos modos de realización, la longitud combinada de A y B es de aproximadamente 5 a 50 nucleótidos, de aproximadamente 5 a aproximadamente 10 nucleótidos o de aproximadamente 5 a aproximadamente 15 nucleótidos.

El grado de complementariedad para las secuencias de A y B en el cebador en bucle, en general, es suficiente para hibridarse específicamente al polinucleótido diana. Esta hibridación debe ser lo suficientemente estable para permitir el tiempo para el alargamiento posterior del extremo 3' de la secuencia B. En algunos modos de realización, las secuencias de A y B son al menos un 80 %, 85 %, 90 %, 95 %, 96 %, 97 %, 98 %, 99 % o 100 % complementarias a las concatenaciones lineales de las secuencias A' y B' cuando las secuencias se alinean de forma óptima.

El número de nucleótidos entre las secuencias A y B en el cebador en bucle, en general, se corresponde con la longitud de la secuencia N' y N, lo que puede afectar a la eficacia de la extensión de la polimerasa en el extremo 3' de la secuencia B durante la síntesis de la primera hebra complementaria. Cuanto mayor sea la distancia, más fácil será que las polimerasas encajen en el cebador en bucle para comenzar la extensión del cebador dirigida por molde y que detengan la hibridación A-A'. Sin embargo, con mayores distancias, la especificidad de unión entre el cebador en bucle y el polinucleótido diana se puede reducir, ya que los mayores nucleótidos de N' no interactúan específicamente con las secuencias dictadas por la secuencia A y B del cebador en bucle. En algunos modos de realización, el extremo 3' de la secuencia A' está dentro de 1 nt a aproximadamente 10 nt, dentro de 1 nt a aproximadamente 5 nt o dentro de 2 nt a aproximadamente 5 nt, del extremo 5' de la secuencia B'.

Los cebadores en bucle se pueden diseñar para detectar una variación mononucleotídica. Por ejemplo, el procedimiento objeto puede utilizar un par de cebadores en bucle que difieran en una posición de base en las secuencias A y B, de modo que uno reconozca un alelo de la secuencia diana y el otro reconozca un alelo diferente de la secuencia diana. Los cebadores en bucle también difieren en la secuencia de bucle D y se pueden amplificar

y/o detectar selectivamente.

5 En un modo de realización, un cebador en bucle se une al nucleótido alélico, así como secuencias contiguas, y otro cebador en bucle se une a las secuencias inmediatamente contiguas al nucleótido alélico; el primero captura solo un alelo, mientras que el segundo captura ambos alelos. Durante las etapas de detección, cuantificación y amplificación posteriores, los dos cebadores en bucle, que pueden tener secuencias de conector diferentes, se pueden diferenciar selectivamente, lo que, a su vez, permite que los alelos diferentes del polinucleótido diana se detecten, cuantifiquen y amplifiquen de forma diferencial a partir de la primera secuencia complementaria.

10 La secuencia de conector D en un cebador en bucle objeto, en general, se diseña para tener una longitud suficiente para la hibridación tanto de A-A' como de B-B', lo que, a su vez, incrementa la especificidad del cebador en bucle en la unión a la diana de ARN pequeño correcta. En un modo de realización, la secuencia de conector tiene de aproximadamente 5 a aproximadamente 100, de 10 a aproximadamente 80 o de 20 a aproximadamente 50 nucleótidos. En algunos otros modos de realización, la secuencia de conector tiene aproximadamente 10, 20, 30, 40, 15 50, 60, 70, 80, 90 o aproximadamente 100 nucleótidos de longitud.

20 Cuando se desee, la secuencia de conector usada en los procedimientos objeto o presente en las composiciones objeto puede comprender uno o más elementos de secuencia, que incluyen, pero sin limitarse a una o más secuencias de código de barras, una o más secuencias de reconocimiento para enzimas de restricción, una o más secuencias de unión a sonda oligonucleotídica o complementos de las mismas, una o más secuencias de hibridación a cebador de secuencia o complementos de las mismas, una o más secuencias comunes compartidas entre múltiples cebadores en bucle diferentes o subconjuntos de cebadores en bucle diferentes, uno o más pares de secuencias complementarias para la formación de una estructura de horquilla, o una combinación de estas. En algunos modos de realización, la secuencia de conector comprende una secuencia universal común a múltiples cebadores en bucle 25 diferentes. Dos o más elementos de secuencia pueden ser no contiguos entre sí (por ejemplo, separados por uno o más nucleótidos), contiguos entre sí, parcialmente solapantes o completamente solapantes. Por ejemplo, una secuencia de hibridación a cebador de amplificación también puede servir como una secuencia de hibridación a cebador de secuenciación. Un elemento de secuencia puede tener cualquier longitud adecuada, tal como aproximadamente, menos de aproximadamente o más de aproximadamente 3, 4, 5, 6, 7, 8, 9, 10, 15, 20, 25, 30, 35, 30 40, 45, 50 o más nucleótidos de longitud.

35 En algunos modos de realización, la secuencia de conector comprende uno o más pares de secuencias complementarias para la formación de una estructura de horquilla. Cada secuencia en un par de secuencias se puede denominar "secuencia de tallo". Las secuencias de tallo en un par de secuencias de tallo pueden ser perfectamente complementarias en toda su longitud, o pueden comprender uno o más (por ejemplo, 1, 2, 3, 4, 5 o más) emparejamientos erróneos. En algunos modos de realización, las secuencias de tallo en un par de secuencias de tallo son al menos un 80 %, 85 %, 90 %, 95 % o 100 % complementarias. Una secuencia de tallo puede tener cualquier longitud adecuada, tal como aproximadamente o al menos aproximadamente 3, 4, 5, 6, 7, 8, 9, 10, 15, 20, 25 o más nucleótidos de longitud. En algunos modos de realización, las secuencias de tallo tienen entre 5-10 nucleótidos de longitud (por ejemplo, 7 nucleótidos de longitud). Las secuencias de tallo se pueden diseñar de modo que el tallo formado por su hibridación tenga una temperatura de fusión (T_f) especificada, tal como entre 35-90 °C, 40-75 °C, 45-65 °C o 50-55 °C. En algunos modos de realización, el tallo formado por hibridación entre las secuencias de tallo tiene una T_f entre 60-72 °C. Se puede variar la localización de cada secuencia de tallo dentro de la secuencia de conector. En general, la secuencia dentro del conector entre secuencias de tallo forma una estructura de bucle tras la hibridación 45 entre las secuencias de tallo. La distancia entre las secuencias de tallo puede afectar a la longitud de la secuencia que forma el bucle, tal como una secuencia de bucle que tenga al menos aproximadamente 3, 4, 5, 6, 7, 8, 9, 10, 15, 20, 25 o más nucleótidos de longitud. En algunos modos de realización, la secuencia de bucle tiene entre 5-10 nucleótidos de longitud (por ejemplo, 5 nucleótidos de longitud). Se puede diseñar una secuencia de bucle para que esté desprovista de secuencias de unión a diana (por ejemplo, secuencias complementarias a una diana de miARN). 50 Un tallo puede incluir un nucleótido que preceda inmediatamente a un nucleótido en la secuencia A y/o secuencia B de los cebadores en bucle. De forma alternativa, un cebador en bucle puede comprender uno o más (por ejemplo, 1, 2, 3, 4, 5, 6, 7, 8, 9, 10, 15, 20, 25 o más) nucleótidos entre el extremo de una secuencia de tallo y el inicio de una o ambas de la secuencia A o la secuencia B, pudiéndose denominar las secuencias "secuencias de brazo". Un cebador en bucle que comprende una secuencia de conector que forma una estructura de horquilla puede comprender ningún, 55 uno o dos brazos, con la longitud de cada brazo seleccionada independientemente entre sí. En algunos modos de realización, uno o ambos brazos se diseñan para tener entre 5-15 nucleótidos de longitud.

60 En algunos modos de realización, la secuencia de conector comprende secuencias únicas para contribuir a la detección, cuantificación posteriores de la secuencia complementaria producida del polinucleótido diana de interés. Después de producir la primera secuencia de complemento, las porciones de la secuencia de conector son complementarias al cebador directo. Por lo tanto, tener códigos de barras específicos dentro de la secuencia de conector puede permitir que cebadores en bucle diferentes se amplifiquen, detecten o cuantifiquen por cebadores directos diferentes, pero los mismos inversos. En algunos modos de realización, la secuencia A y B de un cebador en bucle se puede unir a regiones ligeramente diferentes del mismo polinucleótido diana que la secuencia A y B de otro cebador en bucle, lo que permite mayor especificidad y/o verificación por el usuario. La amplificación, detección y 65 cuantificación posteriores de estos cebadores en bucle diferentes se puede facilitar por cebadores directos diferentes

que se unen de forma diferente debido a códigos de barras diferentes en la secuencia de conector.

5 En algunos modos de realización, el conector comprende una o más secuencias de reconocimiento para enzimas de restricción. Después de la amplificación, la exactitud de la detección se puede mejorar notablemente con una digestión con restricción, de modo que solo los productos auténticos amplificados a partir de la primera secuencia de complemento, que contienen el sitio de restricción de la secuencia de conector, se escinden y tabulan para su detección y cuantificación.

10 En otros modos de realización, la secuencia de conector comprende una o más secuencias de unión a sonda oligonucleotídica, complementos de secuencias de unión a sonda oligonucleotídica, secuencias de hibridación a cebador o complementos de secuencias de hibridación a cebador. Durante la amplificación, las sondas adicionales que se hibridan de una manera específica de secuencia, como TaqMan, o los cebadores adicionales que añaden especificidad de amplificación, pueden utilizar estas secuencias para permitir una mayor garantía de amplificación exacta de la primera secuencia complementaria al polinucleótido diana.

15 En otros modos de realización, la secuencia de conector comprende una región en común con todos los cebadores en bucle utilizados en una mezcla de reacción. Dicha secuencia de conector común a todos los cebadores en bucle puede reducir el coste de detección y cuantificación, puesto que las sondas posteriores (por ejemplo, sondas TaqMan), la digestión enzimática y sus secuencias, los cebadores directos y cualquier otro reactivo que actúe sobre el cebador en bucle pueden ser versátiles en su uso en muchos cebadores en bucle diferentes usados para detectar muchos polinucleótidos diana diferentes.

20 En algunos modos de realización, cada uno de una pluralidad de cebadores en bucle se diseña de modo que la temperatura de fusión de cada cebador en bucle o de cada primera molécula de ácido nucleico complementario esté entre 35 °C y 90 °C, tal como entre 40 °C y 75 °C, entre 45 °C y 65 °C, o entre 50 °C y 55 °C. En algunos modos de realización, cada uno de una pluralidad de cebadores en bucle se diseña de modo que la temperatura de fusión de cada cebador en bucle o de cada molécula de ácido nucleico complementario sea aproximadamente, menos de aproximadamente o más de aproximadamente 40 °C, 45 °C, 50 °C, 55 °C, 60 °C, 65 °C, 70 °C, 72 °C, 75 °C, 80 °C o más. En algunos modos de realización, el primer cebador puede estar presente a una concentración de aproximadamente, al menos aproximadamente o como máximo aproximadamente 10, 50, 100, 150, 200, 250, 300, 350 a 300, 350, 400, 450, 500, 550, 600, 800, 1000 nM o µM, o cualquier intervalo o valor derivable entre las mismas.

25 Después de producir la primera secuencia complementaria usando un cebador en bucle y una extensión del cebador dirigida por molde desde el extremo 3' de la secuencia B, usando el polinucleótido diana como molde, esta primera secuencia complementaria se convierte en un molde para las reacciones posteriores de amplificación, incluyendo para el propósito de cuantificación, así como detección. Para generar copias adicionales de la primera secuencia complementaria, especialmente para regiones dentro que sean complementarias al polinucleótido diana, un cebador directo se hibrida específicamente a una secuencia dentro de la secuencia de conector D y un cebador inverso se hibrida específicamente a una secuencia más hacia 5' que la secuencia A' en el polinucleótido diana, lo que sería más hacia 3' que la secuencia A en la primera secuencia complementaria. Esta región particular, flanqueada por los cebadores seleccionados, a continuación, se puede amplificar exponencialmente en reacciones posteriores, al igual que la PCR convencional.

35 En algunos modos de realización, el procedimiento para producir una secuencia complementaria a una región en un polinucleótido diana en una muestra comprende además la etapa de amplificación de la secuencia complementaria a una región en un polinucleótido diana en una muestra en presencia de un cebador inverso y opcionalmente un cebador directo, en el que el cebador inverso y el cebador directo presentan complementariedad de secuencia con el producto amplificado y el cebador en bucle, respectivamente. En algunos modos de realización, el cebador directo se hibrida específicamente a una secuencia en la secuencia de conector. En algunos modos de realización, el cebador inverso se hibrida específicamente a una secuencia que es complementaria a una porción del polinucleótido diana que está en 5' con respecto a la secuencia A' o B'.

40 Los cebadores directos e inversos son, en general, suficientemente largos para cebar la amplificación dirigida por molde de la secuencia de ácido nucleico diana en las condiciones de la reacción de amplificación. La longitud de los cebadores del segundo conjunto de cebadores dependerá de muchos factores conocidos en la técnica, tales como la temperatura de hibridación deseada del cebador, la secuencia de ácido nucleico diana y la complejidad de las secuencias de ácido nucleico diana diferentes que se van a amplificar. En algunos modos de realización, la secuencia directa e inversa comprende uno o más emparejamientos erróneos nucleotídicos con la secuencia diana, tal como 1, 2, 3, 4, 5, 6, 7, 8, 9, 10 o más emparejamientos erróneos. La selección de una secuencia sustancialmente no complementaria dependerá de la diana que se va a amplificar. Una secuencia sustancialmente no complementaria de este tipo puede ser artificial o estar diseñada, tal como una secuencia encontrada en otro organismo, una secuencia encontrada en otra especie, una secuencia encontrada en otra subespecie, una secuencia sustancialmente no complementaria de un miembro diferente de la misma especie, una secuencia del mismo sujeto seleccionada de una región sustancialmente no complementaria a la diana, una secuencia generada aleatoriamente que se sabe que es sustancialmente no complementaria a la diana, o una secuencia diseñada específicamente que se sabe que es sustancialmente no complementaria a la diana.

5 Cuando se desee, los cebadores en bucle, directo e inverso pueden comprender cada uno un análogo nucleotídico, tal como un ácido nucleico modificado u otro nucleótido no canónico. Otros ejemplos no limitantes de análogos nucleotídicos incluyen, pero no se limitan a, 2-aminopurina, 2,6-diaminopurina, 5-bromo-dU, desoxiuridina, dT invertida, didesoxinucleótidos, 5-metil-dC, desoxiinosina, ácidos nucleicos bloqueados (ANB), 5-nitroindol y bases de ARN con 2'-O-metilo.

10 En algunos modos de realización, un cebador directo y uno inverso se diseñan de modo que la temperatura de fusión de cada uno esté entre 35 °C y 90 °C, tal como entre 40 °C y 75 °C, entre 45 °C y 65 °C, o entre 50 °C y 55 °C. En algunos modos de realización, cada uno de una pluralidad de cebadores directos e inversos se diseña de modo que la temperatura de fusión de cada uno sea aproximadamente, menos de aproximadamente o más de aproximadamente 40 °C, 45 °C, 50 °C, 55 °C, 60 °C, 65 °C, 70 °C, 72 °C, 75 °C, 80 °C o más. En otros modos de realización, los cebadores en bucle, directo e inverso pueden estar presentes en la reacción de amplificación a concentraciones de aproximadamente, al menos aproximadamente o como máximo aproximadamente 10, 50, 100, 150, 200, 250, 300, 15 de 350 a 300, 350, 400, 450, 500, 550, 600, 800, 10000 nM o μM , o cualquier intervalo o valor derivable entre las mismas.

20 Como se indica anteriormente, en algunos modos de realización, la amplificación de la primera molécula de ácido nucleico complementario en un procedimiento objeto se logra a través del uso del cebador en bucle en combinación con un segundo conjunto de cebadores que incluyen un cebador directo y uno inverso divulgados en el presente documento. El segundo conjunto de cebadores se puede añadir a la reacción al mismo tiempo que el cebador en bucle. De forma alternativa, el segundo conjunto de cebadores se añade después de la extensión del cebador en bucle. Todavía en otros modos de realización, se puede añadir una cantidad adicional de cebador en bucle después de la reacción de extensión. La adición de una cantidad de cebador en bucle después de la reacción de extensión puede estar acompañada por la adición de un segundo conjunto de cebadores. En algunos modos de realización, un cebador directo (por ejemplo, un cebador que se hibrida a un complemento de una secuencia dentro del cebador en bucle) tiene aproximadamente o al menos aproximadamente 10, 15, 20 o más nucleótidos de longitud. Se puede diseñar un cebador directo para tener una temperatura de fusión deseada, tal como una T_f de entre 55-75 °C (por ejemplo, 62 °C). Se puede diseñar un cebador inverso (por ejemplo, un cebador que se hibrida a un complemento de un polinucleótido diana, tal como un miARN) para tener una o más propiedades, tal como una T_f de entre 55-75 °C (por ejemplo, 62 °C).

35 En algunos modos de realización, la reacción tiene lugar en una única mezcla de reacción en condiciones para proporcionar la secuencia completa con respecto a la región del polinucleótido diana, en la que la mezcla de reacción comprende: (a) el cebador en bucle que comprende una secuencia A, una secuencia de conector D y una secuencia B, orientadas desde 5' hacia 3' en una única hebra; en la que el cebador en bucle se hibrida específicamente al polinucleótido diana por medio de (i) complementariedad de secuencia entre la secuencia A del cebador en bucle y la secuencia A' en el polinucleótido diana, y (ii) complementariedad de secuencia entre la secuencia B y la secuencia B' en el polinucleótido diana, en la que la secuencia A' y la secuencia B' están orientadas desde 5' hacia 3' en el polinucleótido diana; (b) la polimerasa que extiende la secuencia B del cebador en bucle desde 5' hacia 3' a lo largo del polinucleótido diana que sirve como molde para una extensión del cebador dirigida por molde para producir la secuencia complementaria del polinucleótido diana; (c) el cebador inverso que presenta homología de secuencia con una secuencia en el polinucleótido diana localizada en 5' con respecto a la secuencia A' o B'; y, (d) el cebador directo que se hibrida específicamente a una secuencia complementaria al cebador en bucle.

45 En algunos modos de realización, un procedimiento objeto utiliza un cebador en bucle, directo y/o inverso presente en exceso en comparación con la cantidad de polinucleótidos diana. Por ejemplo, el cebador en bucle, directo y/o inverso utilizados son al menos aproximadamente 1 vez, 10 veces, 100 veces, 200 veces, 300 veces, 400 veces, 500 veces, 600 veces, 700 veces, 800 veces, 900 veces, 1000 veces, 1500 veces, 2000 veces, 3000 veces, 5000 veces, 7500 veces, 10000 veces, 20000 veces, 50000 veces, 100000 veces, 10^6 veces, 10^7 veces, 10^8 veces o más que los polinucleótidos diana presentes en la reacción de amplificación. En algunos modos de realización, el uso del cebador en bucle, un cebador directo y un cebador inverso permite la amplificación de una o más moléculas de ácido nucleico diana a un nivel detectable con menos de aproximadamente 5000, 2500, 1000, 900, 800, 700, 600, 500, 400, 300, 200, 100, 50, 40, 30, 20, 10, 5 o menos copias de las una o más moléculas de ácido nucleico diana presentes en la muestra antes de la amplificación.

60 La producción de la primera secuencia complementaria puede ser parte de una RT-PCR de una etapa o una RT-PCR de dos etapas, en la que la mezcla de reacción pueda contener reactivos por separado para la síntesis y amplificación de la primera hebra, o reactivos para tanto la síntesis como la amplificación de la primera hebra conjuntamente. Además, la mezcla de reacción para la amplificación posterior puede contener cebadores diferentes que se hibridan al primer producto de secuencia complementaria, para proporcionar productos de longitudes diferentes o que cubren intervalos diferentes dentro de la primera secuencia complementaria. Además, las sondas específicas que cuantifican o detectan regiones dentro de la primera secuencia complementaria pueden incrementar la especificidad; por ejemplo, se pueden añadir sondas TaqMan que reconozcan regiones específicas en la secuencia de conector D, secuencia de polinucleótido diana, o incluso un solapamiento entre esas dos regiones en la primera secuencia complementaria en la mezcla de reacción antes de, simultáneamente con o posteriormente a la producción de la primera secuencia

complementaria de un ácido nucleico diana.

La producción de la primera secuencia complementaria se puede efectuar por polimerasas. Una amplia variedad de polimerasas está disponible en la técnica. Los ejemplos no limitantes incluyen una ADN polimerasa dependiente de ARN, tal como retrotranscriptasas (RT) derivadas del virus de la leucemia murina de Moloney (MMLV-RT), virus de la mieloblastosis aviar (AMV-RT), virus de la leucemia bovina (BLV-RT), virus del sarcoma de Rous (RSV-RT), virus de la inmunodeficiencia humana (VIH-RT), virus asociado a Rous (RAV-RT), virus asociado a mieloblastosis (MAV-RT) u otro virus del sarcoma-leucosis aviar (ASLV-RT), polimerasa de Z05 de *Thermus*, polimerasa delta Z05 y cualquier versión modificada o derivado de las mismas. En algunos modos de realización, el ADN dependiente de ARN carece de actividad RNasaH (por ejemplo, SUPERScript III™, vendido por Invitrogen, 1600 Faraday Avenue, apartado de correos 6482, Carlsbad, Calif. 92008). En algunos modos de realización, la enzima que tiene actividad ADN polimerasa dependiente de ARN también tiene actividad ADN polimerasa dependiente de ADN, y se usa tanto para las etapas de retrotranscripción como de amplificación.

Las condiciones para la extensión del cebador del cebador en bucle, en uno cualquiera de los procedimientos objeto, pueden variar dependiendo de la diana, los requisitos de hibridación del primer cebador, la polimerasa, los requisitos de otros reactivos y el desenlace clínico deseado. Son conocidos en la técnica procedimientos para variar las condiciones de extensión del cebador. Una serie de reactivos están disponibles comercialmente y las concentraciones se pueden optimizar para lograr un resultado deseable. Un ejemplo no limitante de un procedimiento de retrotranscripción típico incluye las etapas de extensión del cebador llevada a cabo a aproximadamente 42 °C durante aproximadamente 120 minutos e inactivación de la enzima por incubación a temperaturas a o por encima de aproximadamente 80 °C durante aproximadamente 5 minutos. Las temperaturas de incubación para la extensión pueden variar dependiendo de los factores mencionados, y pueden incluir temperaturas de aproximadamente, más de aproximadamente o menos de aproximadamente 25 °C, 30 °C, 35 °C, 40 °C, 45 °C, 48 °C, 50 °C, 52 °C, 55 °C, 60 °C, 65 °C, 70 °C, 75 °C o cualquier temperatura entre las mismas. En algunos modos de realización, la temperatura de incubación para la reacción de extensión está entre 48 °C y 52 °C. Los tiempos de incubación para la extensión también se pueden variar para incluir tiempos de aproximadamente, más de aproximadamente o menos de aproximadamente 1, 2, 3, 4, 5, 10, 15, 20, 30, 40, 50, 60, 70, 80, 100, 120, 140, 180 o más minutos. El tiempo y la temperatura de inactivación pueden ser cualquiera de modo que se logre la inactivación de la enzima, y pueden incluir, sin limitación, temperaturas de aproximadamente, más de aproximadamente o menos de aproximadamente 70 °C, 75 °C, 80 °C, 85 °C, 90 °C o 95 °C y tiempos de aproximadamente o más de aproximadamente 1, 2, 3, 4, 5, 6, 7, 8, 9, 10, 15, 20, 30 o más minutos. La extensión del cebador puede estar precedida o no por una etapa de desnaturalización por calor para destruir las interacciones intermoleculares e intramoleculares entre moléculas de ARN. En algunos modos de realización, la extensión del cebador no está precedida por una etapa de desnaturalización por calor. En algunos modos de realización, el procedimiento de retrotranscripción no incluye una etapa de inactivación por calor. En algunos modos de realización, las etapas de retrotranscripción y PCR están integradas, realizándose en un único tubo. La retrotranscripción se puede realizar, a continuación, a temperatura ambiente, donde la polimerasa, que preferentemente es de inicio en caliente, tiene baja actividad. La retrotranscriptasa es preferentemente una variante natural o genomanipulada del virus de la leucemia murina de Moloney (M-MLV) o virus de la mieloblastosis aviar (AMV). También es posible realizar la RT-PCR usando una única enzima, tal como PyroPhage (Lucigen Inc.), que tiene ambas actividades.

Cuando se desee, las primeras moléculas de ácido nucleico complementario se amplifican enzimáticamente usando la reacción en cadena de la polimerasa (PCR). Esta técnica típicamente emplea una ADN polimerasa dependiente de ADN, que es una enzima que pueda catalizar la polimerización del ADN. Una aplicación de este procedimiento es detectar o aislar ácidos nucleicos presentes en bajos números de copias. En determinados aspectos, una polimerasa es activa a aproximadamente o mayor de aproximadamente 20 °C, 23 °C, 25 °C, 37 °C, 42 °C, 50 °C, 60 °C, 70 °C, 80 °C, 90 °C o mayor. En algunos modos de realización, los procedimientos objeto utilizan una polimerasa termoestable. Las polimerasas termoestables ejemplares incluyen, pero no se limitan a, HB8 de *Thermus thermophilus* (véase, por ejemplo, la pat. de EE. UU. n.º 5.789.224 y la publicación de EE. UU. 20030194726); *Thermus oshimai* mutante; *Thermus scotoductus*; 1B21 de *Thermus thermophilus*; GK24 de *Thermus thermophilus*; polimerasa de *Thermus aquaticus* (AmpliTaq® FS o Taq (G46D; F667Y) (véase, por ejemplo, la pat. de EE. UU. n.º 5.614.365), Taq (G46D; F667Y; E6811) y Taq (G46D; F667Y; T664N; R660G); polimerasa de *Pyrococcus furiosus*; polimerasa de *Thermococcus gorgonarius*; polimerasa de GB-D de *Pyrococcus species*; polimerasa de *Thermococcus sp.* (cepa 9° N-7); polimerasa de *Bacillus stearothermophilus*; polimerasa Tsp; polimerasa ThermalAce™ (Invitrogen); polimerasa de *Thermus flavus*; polimerasa de *Thermus litoralis*; polimerasa de Z05 de *Thermus*; polimerasa delta Z05 (por ejemplo, ADN polimerasa delta Z05 Gold); y mutantes, variantes o derivados de las mismas. Las polimerasas no termoestables ejemplares incluyen, pero no se limitan a, ADN polimerasa I; ADN polimerasa I mutante, que incluye, pero no se limita a, fragmento de Klenow y fragmento de Klenow (exonucleasa menos desde 3' hacia 5'); ADN polimerasa de T4; ADN polimerasa de T4 mutante; ADN polimerasa de T7; ADN polimerasa de T7 mutante; ADN polimerasa de phi29; y ADN polimerasa de phi29 mutante. En algunos modos de realización, la enzima que tiene actividad ADN polimerasa dependiente de ADN usada en la etapa de amplificación es la misma enzima usada para la extensión del cebador del primer cebador en la primera etapa de extensión del cebador, de modo que la enzima también tiene actividad ADN polimerasa dependiente de ARN.

En algunos modos de realización, un procedimiento objeto utiliza una polimerasa de inicio en caliente. Una polimerasa

de inicio en caliente es una forma modificada de una ADN polimerasa que requiere activación térmica (véanse, por ejemplo, las pat. de EE. UU. n.ºs 6.403.341 y 7.122.355 en su totalidad). Una polimerasa de este tipo se puede usar, por ejemplo, para incrementar además la sensibilidad, especificidad y rendimiento; y/o para mejorar además la amplificación de dianas en bajas copias. Típicamente, la enzima de inicio en caliente se proporciona en un estado inactivo. Tras la activación térmica, se libera la modificación o modificador, lo que genera la enzima activa. Una serie de polimerasas de inicio en caliente están disponibles de diversas fuentes comerciales, tales como Applied Biosystems; Bio-Rad; eEnzyme LLC; Eppendorf North America; Finnzymes Oy; GeneChoice, Inc.; Invitrogen; Jena Bioscience GmbH; MIDSCI; Minerva Biolabs GmbH; New England Biolabs; Novagen; Promega; QIAGEN; Roche Applied Science; Sigma-Aldrich; Stratagene; Takara Mirus Bio; USB Corp.; Yorkshire Bioscience Ltd; y similares.

Los procedimientos objeto se pueden utilizar para producir simultáneamente secuencias complementarias de polinucleótidos diana diferentes con secuencias diferentes. La generación de más de una primera molécula de ácido nucleico complementario diferente se puede lograr a través del uso de más de un cebador en bucle diferente en la reacción de extensión, teniendo cada cebador en bucle diferente una primera secuencia diferente en su extremo 3' con complementariedad con al menos una porción de una de una pluralidad de dianas de molécula de polinucleótido diferentes. En algunos modos de realización, estas secuencias de cebador en bucle diferentes se pueden seleccionar para tener secuencias definidas con complementariedad con al menos una porción de dianas de molécula de polinucleótido específicas de interés. En otros modos de realización, las secuencias de cebador en bucle son aleatorias e indefinidas, o prácticamente aleatorias, con determinadas posiciones a lo largo de las secuencias de cebador en bucle sesgadas hacia uno o más nucleótidos, por ejemplo, que comprenden uno o más nucleótidos seleccionados aleatoriamente de dos o más nucleótidos diferentes. Se puede combinar una pluralidad de cebadores en bucle diferentes, siendo las concentraciones de cada uno de los cebadores en bucle diferentes iguales o diferentes, para crear una "agrupación" de cebadores en bucle. El uso de una agrupación de cebadores en bucle de este tipo permite la producción simultánea de una pluralidad de primeras moléculas de ácido nucleico complementario diferentes, cada una con complementariedad con una de una pluralidad de dianas de molécula de polinucleótido diferentes.

En otro modo de realización de los procedimientos, se usa más de una primera molécula de polinucleótido complementario diferente como molde para la amplificación para producir múltiples copias. Esto se puede lograr a través del uso de más de un conjunto de cebadores directos e inversos en la reacción de amplificación, teniendo cada cebador diferente una segunda secuencia diferente en su extremo 3' con complementariedad con al menos una porción de una de una pluralidad de primeras dianas de polinucleótido complementario diferentes. En algunos modos de realización, estos cebadores directos e inversos diferentes se pueden seleccionar para tener secuencias definidas con complementariedad con al menos una porción de primeras dianas de molécula de ADN específicas de interés. En otros aspectos, los cebadores directos e inversos diferentes son aleatorios e indefinidos, o prácticamente aleatorios, con determinadas posiciones a lo largo de las secuencias sesgadas hacia uno o más nucleótidos, tal como uno o más nucleótidos seleccionados aleatoriamente de dos o más nucleótidos diferentes. Se puede combinar una pluralidad de cebadores directos e inversos diferentes, siendo las concentraciones de cada uno de los cebadores diferentes iguales o diferentes, para crear una "agrupación" de cebadores secundarios. El uso de una agrupación de cebadores secundarios de este tipo, en combinación con una agrupación de cebadores en bucle, permite la producción simultánea de una pluralidad de primeras moléculas de secuencia complementaria diferentes, cada una con complementariedad con al menos una porción de una de una pluralidad de dianas de molécula de polinucleótido diana diferentes.

Las combinaciones de cebadores en agrupaciones para la producción o bien amplificación de primeras moléculas de ADN pueden ser cualquiera de una serie de opciones. La producción de primeras moléculas de ADN usando una agrupación de primeros cebadores puede estar seguida de amplificación usando uno o más segundos cebadores seleccionados con segundas secuencias que tengan complementariedad con una o más primeras moléculas de ADN seleccionadas. De forma alternativa, la producción de primeras moléculas de ADN usando una agrupación de primeros cebadores puede estar seguida de amplificación usando una agrupación de segundos cebadores, en la que la agrupación contenga un segundo cebador para cada uno de los primeros productos de molécula de ADN pretendidos de la reacción de extensión del cebador. Aún en otro modo de realización, se pueden añadir uno o más pares de primer y segundo cebadores para amplificar una o más primeras moléculas de ADN producidas por extensión del cebador usando una agrupación de primeros cebadores. No se necesita que las agrupaciones de cebadores contengan subconjuntos completamente solapantes de ARN y primeras dianas de molécula de ADN complementario.

El procedimiento objeto de producción de una secuencia complementaria a un polinucleótido diana y/o amplificación del polinucleótido diana bicatenario se puede realizar en el mismo sitio de reacción (por ejemplo, contenido en un recipiente). Los reactivos para producir la secuencia complementaria y los reactivos para la amplificación posterior se pueden añadir simultánea o secuencialmente. En algunos modos de realización, todos los reactivos para realizar tanto la reacción de extensión del cebador en bucle como la reacción de amplificación se añaden a la vez, de modo que ambas reacciones se puedan llevar a cabo sin otra manipulación de la muestra. En algunos modos de realización, se añaden uno o más reactivos para realizar la reacción de amplificación después de la reacción de extensión del cebador en bucle. En algunos modos de realización, la amplificación de una primera molécula complementaria se lleva a cabo en un recipiente separado del usado en la producción de la primera molécula de ADN por extensión del cebador de un cebador en bucle. Cuando se transfieren los productos de extensión del cebador en bucle, se puede usar el

volumen de reacción completo o bien una porción del mismo. Se pueden transferir múltiples porciones de una única reacción de extensión del cebador en bucle a múltiples recipientes separados para realizar múltiples reacciones de amplificación. El recipiente de reacción separado puede ser del mismo tipo o diferente que el usado en la reacción de extensión del cebador. Los ejemplos no limitantes de recipientes de reacción incluyen tubos de microcentrifugadora, tubos cónicos, tubos de paredes delgadas, tubos en tiras, placas de múltiples pocillos, dispositivos microfluidicos y micromatrices.

Cuando se desee, las diversas etapas de la reacción pueden tener lugar con uno o más cebadores (por ejemplo, cebador en bucle, cebador directo o inverso) que se acoplan a un soporte. En algunos modos de realización, uno o más cebadores en bucle se acoplan a un soporte sólido. En algunos modos de realización, uno o más bucles, conjuntamente con un cebador directo y uno inverso se acoplan a un soporte. El acoplamiento se puede lograr en una serie de modos, incluyendo sus ejemplos no limitantes enlaces covalentes, interacciones electrostáticas e interacciones intermoleculares entre dos o más moléculas. Son conocidos en la técnica diferentes clases de soportes sólidos, incluyendo sus ejemplos no limitantes obleas, chips, microesferas, pocillos, placas, dispositivos microfluidicos, micromatrices y tubos de diversos tamaños. Los soportes sólidos se pueden construir de una variedad de materiales que puedan soportar dichos acoplamientos, incluyendo sus ejemplos no limitantes silicio, plásticos, vidrio, polímeros, metales y materiales semiconductores.

En la práctica de uno o más procedimientos objeto, se puede utilizar un recipiente de reacción que se diseñe para amplificar simultáneamente una pluralidad de moléculas de polinucleótido diana diferentes, amplificándose cada molécula diana diferente en una localización distinta. Esto se puede lograr en una variedad de modos. En un modo de realización, cada una de una pluralidad de localizaciones distintas comprende uno o más cebadores con una segunda secuencia complementaria a al menos una porción de una primera molécula de secuencia complementaria específica, tal como en una matriz. Cada una de las localizaciones distintas puede comprender además un cebador en bucle correspondiente para la generación y amplificación del polinucleótido diana particular. Los cebadores pueden estar acoplados físicamente o no a sus respectivas localizaciones distintas. De forma alternativa, las microesferas acopladas a uno o más cebadores con una segunda secuencia que tiene complementariedad con al menos una porción de una primera molécula de secuencia complementaria particular se aíslan en localizaciones distintas de otras microesferas que se acoplan a uno o más segundos cebadores con una segunda secuencia diferente, en las que el aislamiento se logra, por ejemplo, por emulsión de lípido en agua o disposición en una superficie. En algunos modos de realización, la producción por extensión del cebador de las primeras moléculas de secuencia complementaria se realiza libre en solución antes de la amplificación en localizaciones distintas. En otros modos de realización, la producción por extensión del cebador de las primeras moléculas de secuencia complementaria se lleva a cabo en localizaciones distintas, tal como cuando el bucle y el segundo conjunto de cebadores de cebadores directos e inversos se localizan en localizaciones distintas.

La amplificación de una secuencia de nucleótidos diana o una región de la misma se puede realizar con múltiples ciclos durante una reacción en cadena de la polimerasa. Un número deseable de ciclos de amplificación puede estar entre uno y 45 ciclos de amplificación, tal como de 1 a 25 ciclos de amplificación, o tal como de 5 a 35 ciclos de amplificación, o tal como de 10 a 45 ciclos de amplificación. Los parámetros de ciclado variarán y se pueden optimizar en base a una serie de factores, incluyendo, pero sin limitarse a, secuencia de cebador, temperaturas de fusión del cebador, longitud de la molécula diana, secuencia diana, complejidad de la diana, complejidad de la población diana, actividad óptima de enzima polimerasa y los requisitos de otros reactivos. Un ejemplo no limitante de un protocolo de PCR típico es como sigue: (1) 95 °C durante 10 minutos, (2) 95 °C durante 20 segundos, (3) 50 °C durante 20 segundos, (4) 72 °C durante 1 minuto, (5) repetir las etapas de 2 a 4 cuarenta veces, (6) 72 °C durante 10 minutos, donde las etapas (1) a (6) corresponden a fusión inicial, fusión de ciclo, hibridación, extensión, recuento de ciclos y extensión final, respectivamente. La temperatura y duración para cada una de las etapas se pueden optimizar para cada reacción, así como la tasa de cambio de temperatura de una etapa a la siguiente. En algunos modos de realización, puede ser posible combinar la etapa (3) (hibridación) y la etapa (4) (extensión), y la etapa (6) se puede excluir por completo. Un ejemplo no limitante de un protocolo de PCR de este tipo es como sigue: (1) 95 °C durante 10 minutos, (2) 95 °C durante 15 segundos, (3) 60 °C durante 1 minuto, (4) repetir las etapas de 2 a 3 39 veces. En algunos modos de realización, la temperatura de hibridación es de aproximadamente, al menos aproximadamente, o como máximo aproximadamente 20 °C, 25 °C, 30 °C, 35 °C, 40 °C, 45 °C, 50 °C, 55 °C, 60 °C, 65 °C, 70 °C, 75 °C o más. En algunos modos de realización, la duración de la etapa de hibridación es de aproximadamente, al menos aproximadamente, o como máximo aproximadamente 0, 1, 2, 3, 4, 5, 6, 7, 8, 9, 10, 15, 20, 30, 45, 60, 90, 120 o más segundos. En algunos modos de realización, puede ser deseable incluir un análisis de la curva de fusión. Un ejemplo no limitante de los parámetros de análisis de la curva de fusión es como sigue: (1) 95 °C durante 15 segundos, (2) 60 °C durante 15 segundos, (3) 95 °C durante 15 segundos.

El éxito de la reacción de amplificación se puede determinar detectando productos de amplificación durante (por ejemplo, en tiempo real) o después del procedimiento de amplificación a través del uso de marcadores detectables, tales como sondas o marcadores. Por ejemplo, las moléculas de ADN amplificadas se pueden detectar y cuantificar por la presencia de un tinte (por ejemplo, SYBR verde) que se usa de forma preferencial o exclusiva a ADN bicatenario durante la etapa de amplificación por PCR de los procedimientos de la presente invención. Por ejemplo, Molecular Probes, Inc. (29851 Willow Creek Road, Eugene, Oreg. 97402) vende mezclas de reacción de PCR cuantitativa que incluyen tinte SYBR verde. A modo de otro ejemplo, otro tinte (denominado "BEBO") que se puede usar para marcar

el ADN bicatenario producido durante la PCR en tiempo real se describe por Bengtsson, M., *et al.*, *Nucleic Acids Research* 31(8):e45 (15 de abril, 2003). A modo de ejemplo, se puede usar un primer y/o segundo cebador que incluya un fluoróforo y extintor para cebar la etapa de amplificación por PCR de los procedimientos de la presente invención. La separación física del fluoróforo y extintor que se produce después de la extensión del cebador marcado durante la PCR permite que el fluoróforo emita fluorescencia y la fluorescencia se puede usar para medir la cantidad de productos de amplificación por PCR. Los ejemplos de cebadores disponibles comercialmente que incluyen un fluoróforo y extintor incluyen cebadores Scorpion y Uniprimers, que se venden ambos por Molecular Probes, Inc.

En algunos modos de realización, las sondas oligonucleotídicas presentes en una amplificación múltiple son adecuadas para supervisar la cantidad de producto de amplificación producido como una función del tiempo. Dichas sondas oligonucleotídicas incluyen, pero no se limitan a, las sondas de ensayo con 5'-exonucleasa (por ejemplo, TaqMan™) (véanse anteriormente y también la pat. de EE. UU. n.º 5.538.848), balizas moleculares en tallo-bucle (véanse, por ejemplo, las pat. de EE. UU. n.ºs 6.103.476 y 5.925.517 y Tyagi y Kramer, 1996), balizas sin tallo o lineales (véase, por ejemplo, el documento WO 99/21881), balizas para APN lineales (véase, por ejemplo, Kubista *et al.*, 2001), sondas no FRET (véase, por ejemplo, la pat. de EE. UU. n.º 6.150.097), sondas Sunrise®/Amplifluor® (véase, por ejemplo, la pat. de EE. UU. n.º 6.548.250), sondas en tallo-bucle y Scorpion™ de doble hélice (véanse, por ejemplo, Solinas *et al.*, 2001 y la pat. de EE. UU. n.º 6.589.743), sondas en bucle con protuberancia (véase, por ejemplo, la pat. de EE. UU. n.º 6.590.091), sondas con pseudonudos (véase, por ejemplo, la pat. de EE. UU. n.º 6.548.250), ciclicones (véase, por ejemplo, la pat. de EE. UU. n.º 6.383.752), sonda MGB Eclipse™ (Epoch Biosciences), sondas con horquilla (véase, por ejemplo, la pat. de EE. UU. n.º 6.596.490), sondas de luz de ácido peptidónucleico (APN), sondas de nanopartículas autoensambladas y sondas modificadas con ferroceno descritas, por ejemplo, en la pat. de EE. UU. n.º 6.485.901; Mhlanga *et al.*, 2001; Whitcombe *et al.*, 1999; Isacson *et al.*, 2000; Svanvik *et al.*, 2000; Wolffs *et al.*, 2001; Tsourkas *et al.*, 2002; Riccelli *et al.*, 2002; Zhang *et al.*, 2002; Maxwell *et al.*, 2002; Broude *et al.*, 2002; Huang *et al.*, 2002; y Yu *et al.*, 2001.

En determinados modos de realización, se une un marcador a una o más sondas y tiene una o más de las siguientes propiedades: (i) proporciona una señal detectable; (ii) interactúa con un segundo marcador para modificar la señal detectable proporcionada por el segundo marcador, por ejemplo, FRET (transferencia de energía por resonancia de fluorescencia); (iii) estabiliza la hibridación, por ejemplo, formación de dobles hélices; y (iv) proporciona un miembro de un complejo de unión o conjunto de afinidad, por ejemplo, afinidad, anticuerpo/antígeno, complejos iónicos, hapteno/ligando (por ejemplo, biotina/avidina). Todavía en otros aspectos, el uso de marcadores se puede lograr usando uno cualquiera de un gran número de técnicas conocidas que emplean marcadores, enlaces, grupos de enlace, reactivos, condiciones de reacción y procedimientos de análisis y purificación conocidos.

Otros ejemplos no limitantes de marcadores incluyen compuestos emisores de luz, dispersores de luz y absorbentes de luz que generan o extinguen una señal fluorescente, quimioluminiscente o bioluminiscente detectable (véase, por ejemplo, Kricka, 1992) y Garman, 1997). Los tintes indicadores fluorescentes útiles como marcadores incluyen, pero no se limitan a, fluoresceínas (véanse, por ejemplo, las pat. de EE. UU. n.ºs 5.188.934; 6.008.379; y 6.020.481), rodaminas (véanse, por ejemplo, las pat. de EE. UU. n.ºs 5.366.860; 5.847.162; 5.936.087; 6.051.719; y 6.191.278), benzofenoxinas (véase, por ejemplo, la pat. de EE. UU. n.º 6.140.500), tintes fluorescentes de transferencia de energía, que comprenden pares de donantes y aceptadores (véanse, por ejemplo, las pat. de EE. UU. n.ºs 5.863.727; 5.800.996; y 5.945.526) y cianinas (véase, por ejemplo, Kubista, documento WO 97/45539), así como cualquier otro resto fluorescente que pueda generar una señal detectable. Los ejemplos de tintes de fluoresceína incluyen, pero no se limitan a, 6-carboxifluoresceína; 2',4',1,4,-tetraclorofluoresceína; y 2',4',5',7',1,4-hexaclorofluoresceína. En determinados aspectos, el marcador fluorescente se selecciona de SYBR®-verde, 6-carboxifluoresceína ("FAM"), TET, ROX, VIC™ y JOE. En determinados modos de realización, un marcador es un radiomarcador.

Todavía en otro modo de realización, los marcadores son restos que estabilizan la hibridación que sirven para potenciar, estabilizar o influir en la hibridación de dobles hélices, por ejemplo, intercaladores y tintes de intercalación (incluyendo, pero sin limitarse a, bromuro de etidio, EvaGreen® y SYBR® verde), aglutinantes de surco menor y grupos funcionales de reticulación (véase, por ejemplo, eds. Blackburn, G. y Gait, M. "DNA and RNA structure" en *Nucleic Acids in Chemistry and Biology* (1996). Los marcadores incluyen aquellos marcadores que efectúan la separación o inmovilización de una molécula por captura específica o no específica, por ejemplo, biotina, digoxigenina y otros haptenos (véase, por ejemplo, Andrus, 1995).

En algunos modos de realización, sondas diferentes comprenden marcadores detectables y diferentes que son distinguibles entre sí. Por ejemplo, en determinados modos de realización, los marcadores son fluoróforos diferentes que pueden emitir luz a diferentes longitudes de onda que se pueden resolver espectralmente (por ejemplo, 4 fluoróforos coloreados de forma diferente); determinadas de dichas sondas marcadas son conocidas en la técnica y se describen anteriormente, y en la pat. de EE. UU. n.º 6.140.054 y Saiki *et al.*, 1986.

En algunos modos de realización, se usa un marcador detectable para determinar la presencia, ausencia, abundancia relativa y/o cantidad de una molécula de ácido nucleico diana después de la finalización de una reacción de amplificación. En algunos modos de realización, el marcador detectable es una sonda. En algunos modos de realización, se usa una pluralidad de sondas diferentes para detectar simultáneamente una pluralidad de productos

de amplificación de moléculas de ácido nucleico diana diferentes. Las sondas se pueden unir a una superficie sólida, tal como una microesfera o una matriz. Las sondas en una matriz se pueden disponer de modo que la localización de cada sonda sea conocida y que la detección de la hibridación de un producto de amplificación a la sonda identifique el producto de amplificación. Se proporcionan ejemplos de sondas y matrices útiles en la detección y/o cuantificación de moléculas de ARN no codificante en los documentos US20080045418 y US20080312099.

Los procedimientos divulgados en el presente documento son aplicables para producir secuencias complementarias de cualquier tipo de moléculas de ácido nucleico diana, incluyendo, pero sin limitarse a, ADN. En algunos modos de realización, el polinucleótido diana es una molécula de ARN. En algunos modos de realización, el polinucleótido diana es una molécula de ARN no codificante. En algunos modos de realización, la molécula de ARN no codificante se selecciona del grupo que consiste en: una molécula de microARN maduro, una molécula de pre-microARN, una molécula de microARN primario, una molécula de ARNip, una molécula de piARN, un piwiARN, un ARNncl, un ARNr y una molécula de ARNhc. En algunos modos de realización, el polinucleótido diana tiene menos de 100 nt de longitud. En algunos modos de realización, el polinucleótido diana tiene menos de 50 nt de longitud.

Las moléculas de ARN no codificante útiles como dianas para la amplificación en cualquiera de los procedimientos divulgados se pueden aislar de cualquier organismo, por ejemplo, un eucariota, o una parte del mismo, incluyendo órganos, tejidos y/o células individuales, incluyendo células cultivadas. Se puede usar cualquier preparación adecuada que incluya un ARN diana, tal como ARN total, ARN pequeño purificado o muestras que contengan tanto ARN como ADN. El ARN se puede aislar de células por procedimientos que implican la lisis de las células y pueden implicar además la desnaturalización de las proteínas contenidas en las mismas. Las células de las que se extrae el ARN pueden ser células naturales, células naturales manipuladas, células modificadas y células modificadas manipuladas, en las que la manipulación incluye, pero no se limita a, tratamiento farmacológico.

Las moléculas de ADN corto útiles como dianas para la amplificación en los procedimientos de la invención se pueden aislar de cualquier organismo, por ejemplo, un eucariota, o una parte del mismo, incluyendo órganos, tejidos y/o células individuales, incluyendo células cultivadas, usando etapas estándar adicionales conocidas en la técnica para retirar parte o todo el ADN. Los procedimientos para la lisis celular y extracción de ácidos nucleicos son bien conocidos en la técnica. Los ejemplos no limitantes de dichos procedimientos incluyen los siguientes. La lisis celular se puede lograr, por ejemplo, con un detergente no iónico, seguido de microcentrifugación para retirar los núcleos y de ahí la mayor parte del ADN celular. El ARN se puede extraer de células de los diversos tipos de interés usando lisis con tiocianato de guanidinio seguida de centrifugación con CsCl para separar el ARN del ADN (véase Chirgwin *et al.*, 1979, *Biochemistry* 18:5294-5299). La extracción de ARN y el aislamiento opcional de ADN también se pueden lograr por extracción orgánica, por ejemplo, con fenol, fenol/cloroformo/alcohol isoamílico o formulaciones similares, incluyendo TRIzol (Invitrogen) y TriReagent (Applied Biosystems). Otros ejemplos no limitantes de técnicas de extracción incluyen: (1) extracción orgánica seguida de precipitación con etanol, por ejemplo, usando un reactivo orgánico de fenol/cloroformo (Ausubel *et al.*, 1993), en determinados modos de realización, usando un extractor de ácido nucleico automatizado, por ejemplo, el extractor de ADN, modelo 341, disponible de Applied Biosystems (Carlsbad, Calif.); (2) procedimientos de adsorción en fase estacionaria (pat. de EE. UU. n.º 5.234.809; Walsh *et al.*, 1991); y (3) procedimientos de precipitación de ácidos nucleicos inducida por sales (Miller *et al.*, (1988), denominándose típicamente dichos procedimientos de precipitación procedimientos de "desalación". En determinados modos de realización, los procedimientos de aislamiento anteriores pueden estar precedidos por una etapa de digestión enzimática para ayudar a eliminar la proteína no deseada de la muestra, por ejemplo, digestión con proteinasa K u otras proteasas similares. Véase, por ejemplo, la pat. de EE. UU. n.º 7.001.724. Si se desea, se pueden añadir inhibidores de RNasa al tampón de lisis. Para determinados tipos de células, puede ser deseable añadir una etapa de desnaturalización/digestión de proteínas al protocolo. Las muestras que contienen ARN pueden comprender una multiplicidad de moléculas de ARN diferentes, teniendo cada molécula de ARN diferente una secuencia de nucleótidos diferente.

El procedimiento objeto es, en particular, útil para amplificar secuencias diana cortas, incluyendo moléculas de ARN corto. El cebador en bucle, con la longitud añadida de la secuencia de conector D, añade longitud a la primera secuencia complementaria para la amplificación posterior. En algunos modos de realización, el polinucleótido diana tiene menos de 100 nt, 90 nt, 80 nt, 70 nt, 60 nt, 50 nt, 40 nt, 30 nt, 20 nt o 15 nt de longitud.

Composiciones:

En otro aspecto, la presente invención proporciona una composición para producir una secuencia complementaria a una región en un polinucleótido diana en una muestra, comprendiendo la composición un cebador en bucle, un cebador directo y un cebador inverso, en la que: (a) el cebador en bucle que comprende una secuencia A, una secuencia de conector y una secuencia B, orientadas desde 5' hacia 3' en una única hebra; en la que el cebador en bucle se hibrida específicamente al polinucleótido diana por medio de (i) complementariedad de secuencia entre la secuencia A y la secuencia A' en el polinucleótido diana, y (ii) complementariedad de secuencia entre la secuencia B y la secuencia B' en el polinucleótido diana, en la que la secuencia A' y la secuencia B' están orientadas desde 5' hacia 3' en el polinucleótido diana; (b) el cebador inverso que presenta homología de secuencia con una secuencia en el polinucleótido diana localizada en 5' con respecto a la secuencia A'; y (c) el cebador directo que se hibrida específicamente a una secuencia en la secuencia de conector.

El cebador en bucle realizado en la composición objeto puede ser cualquier cebador en bucle que tenga una o más características divulgadas en la sección anterior. Por ejemplo, un cebador en bucle comprende dos tramos de complementariedad con el polinucleótido diana en sus dos extremos. La secuencia A usada en la composición es el tramo complementario en el extremo 5' del cebador en bucle, y la secuencia B usada en la composición es el tramo complementario en el extremo 3' del cebador en bucle. Estas dos secuencias, usadas en la composición, se someten a emparejamiento de bases con las secuencias A' y B' del polinucleótido diana, donde A' se sitúa más hacia 5' que B'. En otro ejemplo, las secuencias A' y B' están muy cerca entre sí, y están separadas solo por una secuencia de N' en el polinucleótido diana. En otros modos de realización, la secuencia A y A' pueden tener al menos 2, 3, 4, 5, 6, 7, 8, 9 o 10 nucleótidos. En otros ejemplos, la secuencia B y B' pueden tener al menos 5, 6, 7, 8, 9, 10, 11, 12, 13, 14, 15, 16, 17, 18, 19 o 20 nucleótidos. La secuencia N' puede tener 1, 2, 3, 4 o 5 nucleótidos.

Cuando se desee, el cebador en bucle puede comprender cualquier otro rasgo característico divulgado en la sección anterior. Por ejemplo, puede ser deseable diseñar regiones de A' y B' que residan cerca del extremo 3' del polinucleótido diana. Una selección de este tipo asegura que un número suficiente de secuencias de polinucleótido diana estén en 5' de la hibridación A-A' y B-B' para incluirse en la primera secuencia complementaria. Por ejemplo, la secuencia A tiene de aproximadamente 2 nt a aproximadamente 10 nt o de 2 nt a aproximadamente 5 nt de longitud y la secuencia B tiene de aproximadamente 2 nt a aproximadamente 10 nt de longitud o de 2 nt a aproximadamente 5 nt de longitud. En algunos modos de realización, la longitud combinada de las secuencias A y B es de aproximadamente 5 nt a aproximadamente 20 nt, o de 5 nt a aproximadamente 15 nt, o de 5 nt a aproximadamente 10 nt. En algunos modos de realización, la longitud combinada de las secuencias A y B es suficiente para hibridarse específicamente al polinucleótido diana para efectuar la extensión del cebador en bucle. En algunos modos de realización, una concatenación lineal de las secuencias B y A es al menos un 80 %, 85 %, 90 %, 95 %, 99 % o 100 % complementaria a una concatenación lineal de las secuencias A' y B' cuando se alinean de forma óptima. En algunos modos de realización, una concatenación lineal de las secuencias B y A es al menos un 90 %, 95 %, 99 % o 100 % complementaria a una concatenación lineal de las secuencias A' y B'. En algunos modos de realización, el extremo 3' de la secuencia A' está dentro de 1 nt a aproximadamente 5 nt de la secuencia B'.

En algunos modos de realización, el número de nucleótidos en la secuencia B puede ser mayor que el número de nucleótidos en la secuencia A para incrementar la eficacia de modo que la hibridación A-A' se detenga durante el alargamiento de la extensión del cebador desde el extremo 3' de la secuencia B. En algún modo de realización, la secuencia A y B tienen la misma longitud en bases nucleotídicas, comprendiendo al menos 3, 4, 5, 6, 7, 8, 9 o 10, pero no más de aproximadamente 50 nucleótidos. En otro modo de realización, la secuencia A es de 2 nucleótidos y la secuencia B es de 3 nucleótidos. En otro modo de realización, la secuencia A es de 2 nucleótidos y la secuencia B es de 4 nucleótidos. En otro modo de realización, la secuencia A es de 3 nucleótidos y la secuencia B es de 4 nucleótidos.

El número de nucleótidos entre las secuencias A y B en el cebador en bucle, en general, se corresponde con la longitud de la secuencia N' y N, lo que puede afectar a la eficacia de la extensión de la polimerasa en el extremo 3' de la secuencia B durante la síntesis de la primera hebra complementaria. En algunos modos de realización, el extremo 3' de la secuencia A' está dentro de 1 nt a aproximadamente 10 nt, dentro de 1 nt a aproximadamente 5 nt o dentro de 2 nt a aproximadamente 5 nt, del extremo 5' de la secuencia B'.

En algún modo de realización, los cebadores en bucle se diseñan para detectar una variación mononucleotídica. Por ejemplo, un par de cebadores en bucle que difieran en una posición de base en las secuencias A y B, de modo que uno reconozca un alelo de la secuencia diana y el otro reconozca un alelo diferente de la secuencia diana. Los cebadores en bucle también difieren en la secuencia de bucle D y se pueden amplificar y/o detectar selectivamente.

La secuencia de conector D en un cebador en bucle objeto, en general, se diseña para tener una longitud suficiente para la hibridación tanto de A-A' como de B-B', lo que, a su vez, incrementa la especificidad del cebador en bucle en la unión a la diana de ARN pequeño correcta. En un modo de realización, la secuencia de conector tiene de aproximadamente 5 a aproximadamente 100, de 10 a aproximadamente 80 o de 20 a aproximadamente 50 nucleótidos. En algunos otros modos de realización, la secuencia de conector tiene aproximadamente 10, 20, 30, 40, 50, 60, 70, 80, 90 o aproximadamente 100 nucleótidos de longitud.

Cuando se desee, la secuencia de conector usada en los procedimientos objeto o presente en las composiciones objeto comprende uno o más elementos de secuencia seleccionados del grupo que consiste en: una o más secuencias de código de barras, una o más secuencias de reconocimiento para enzimas de restricción, una o más secuencias de unión a sonda oligonucleotídica o complementos de las mismas, una o más secuencias de hibridación a cebador de secuenciación o complementos de las mismas, y una combinación de estas. En algunos modos de realización, la secuencia de conector comprende una secuencia universal común a múltiples cebadores en bucle diferentes.

En algunos modos de realización, la secuencia de conector comprende secuencias únicas para contribuir a la detección, cuantificación posteriores de la secuencia complementaria producida del polinucleótido diana de interés. Después de producir la primera secuencia de complemento, las porciones de la secuencia de conector son complementarias al cebador directo. Por lo tanto, tener códigos de barras específicos dentro de la secuencia de

conector puede permitir que cebadores en bucle diferentes se amplifiquen, detecten o cuantifiquen por cebadores directos diferentes, pero los mismos inversos. En algunos modos de realización, la secuencia A y B de un cebador en bucle se puede unir a regiones ligeramente diferentes del mismo polinucleótido diana que la secuencia A y B de otro cebador en bucle, lo que permite mayor especificidad y/o verificación por el usuario. La amplificación, detección y cuantificación posteriores de estos cebadores en bucle diferentes se puede facilitar por cebadores directos diferentes que se unen de forma diferente debido a códigos de barras diferentes en la secuencia de conector.

En algunos modos de realización, el conector comprende una o más secuencias de reconocimiento para enzimas de restricción. Después de la amplificación, la exactitud de la detección se puede mejorar notablemente con una digestión con restricción, de modo que solo los productos auténticos amplificados a partir de la primera secuencia de complemento, que contienen el sitio de restricción de la secuencia de conector, se escinden y tabulan para su detección y cuantificación.

En otros modos de realización, la secuencia de conector comprende una o más secuencias de unión a sonda oligonucleotídica, complementos de secuencias de unión a sonda oligonucleotídica, secuencias de hibridación a cebador o complementos de secuencias de hibridación a cebador. Durante la amplificación, las sondas adicionales que se hibridan de una manera específica de secuencia, como TaqMan, o los cebadores adicionales que añaden especificidad de amplificación, pueden utilizar estas secuencias para permitir una mayor garantía de amplificación exacta de la primera secuencia complementaria al polinucleótido diana.

En otros modos de realización, la secuencia de conector comprende una región en común con todos los cebadores en bucle utilizados en una mezcla de reacción. Dicha secuencia de conector común a todos los cebadores en bucle puede reducir el coste de detección y cuantificación, puesto que las sondas posteriores (por ejemplo, TaqMan), la digestión enzimática y sus secuencias, los cebadores directos y cualquier otro reactivo que actúe sobre el cebador en bucle pueden ser versátiles en su uso en muchos cebadores en bucle diferentes usados para detectar muchos polinucleótidos diana diferentes.

En algunos modos de realización, la composición objeto se prepara en forma deshidratada. En algunos modos de realización, la composición objeto se envasa en un recipiente. Por ejemplo, el recipiente puede ser un pocillo, una placa, un tubo, una cámara, un matraz, un frasco, una jeringuilla, una cubeta de lectura, un chip o similares.

En algunos modos de realización, la composición objeto se envasa como un kit que contiene uno cualquiera o más de los elementos divulgados en los procedimientos, composiciones, mezclas de reacción, pruebas y/o sistemas anteriores. En algunos modos de realización, un kit comprende una composición de la invención, en uno o más recipientes. Por ejemplo, los kits pueden incluir uno o más de los siguientes: uno o más soportes sólidos que comprendan oligonucleótidos unidos a los mismos, uno o más oligonucleótidos para la unión a un soporte sólido, uno o más cebadores en bucle, uno o más cebadores de amplificación, reactivos para utilizar cualquiera de estos e instrucciones para usar cualquiera de estos. En algunos modos de realización, el kit comprende además uno o más de: (a) una ADN ligasa, (b) una ADN polimerasa dependiente de ADN, (c) una ADN polimerasa dependiente de ARN, (d) cebadores aleatorios, (e) ADN polimerasa dependiente que tiene actividad exonucleasa desde 3' hacia 5', (f) una pluralidad de cebadores, teniendo cada cebador una de una pluralidad de secuencias seleccionadas, (g) una ADN cinasa, (h) una ADN exonucleasa, (i) microesferas magnéticas y (j) uno o más tampones adecuados para uno o más de los elementos contenidos en el kit. Los cebadores, otros oligonucleótidos y reactivos pueden ser, sin limitación, cualquiera de los descritos en el presente documento. Los elementos del kit se pueden proporcionar además, sin limitación, en cualquier cantidad y/o combinación (tal como en el mismo kit o mismo recipiente). Los kits pueden comprender además agentes adicionales para su uso de acuerdo con los procedimientos de la invención. Los elementos del kit se pueden proporcionar en cualquier recipiente adecuado, incluyendo, pero sin limitarse a, tubos de ensayo, viales, matraces, frascos, ampollas, jeringuillas o similares. Los agentes se pueden proporcionar en una forma que se pueda usar directamente en los procedimientos de la invención, o en una forma que requiera preparación antes de su uso, tal como en la reconstitución de agentes liofilizados. Los agentes se pueden proporcionar en alícuotas para un único uso o como reservas a partir de las que se puedan obtener múltiples usos, tal como en una serie de reacciones.

En un modo de realización, el kit puede comprender una mezcla de reacción que comprende uno o más de los siguientes componentes: un polinucleótido diana, un cebador en bucle divulgado en el presente documento, un cebador directo, un cebador inverso y una polimerasa para proporcionar una cantidad detectable de un amplicón, en el que el polinucleótido diana tiene menos de aproximadamente 100 nt de longitud.

Cuando se desee, los componentes de un kit objeto se pueden envasar en medios acuosos o bien en forma liofilizada, en un recipiente. Cuando exista más de un componente en el kit, el kit también contendrá, en general, un segundo, tercer u otro recipiente adicional en el que los componentes adicionales se puedan disponer por separado. Sin embargo, pueden estar comprendidas diversas combinaciones de componentes en uno o más viales. Los kits de la presente invención típicamente también incluirán un recipiente para contener cebadores, sondas, tampón, diluyente y/o cualquier otro recipiente con reactivo en un espacio cerrado para la venta comercial. Dichos recipientes pueden incluir recipientes de plástico moldeados por inyección o soplado en los que se retengan los viales deseados. Cuando los componentes del kit que comprende la composición para producir una secuencia complementaria a una región en

- un polinucleótido diana se proporcionan en una o más soluciones líquidas, la solución líquida típicamente es una solución acuosa, siendo, en particular, preferente una solución acuosa estéril. Sin embargo, los componentes del kit se pueden proporcionar como polvo(s) seco(s). Cuando los reactivos y/o componentes se proporcionan como un polvo seco, el polvo se puede reconstituir por la adición de un disolvente adecuado. Se contempla que el disolvente también se pueda proporcionar en otros medios de recipiente.
- En algunos modos de realización, un kit objeto incluye instrucciones para los usuarios en cuanto cómo usar los componentes del kit para producir una secuencia complementaria a una región en un polinucleótido diana.
- Cuando se desee, un kit objeto puede comprender además uno o más marcadores detectables para posibilitar la supervisión de la acumulación de productos de amplificación, tal como en tiempo real. Los ejemplos no limitantes de marcadores detectables se describen anteriormente e incluyen tintes, tales como tinte SYBR verde o tinte BEBO, que se unen de forma preferencial o exclusiva a ADN bicatenario durante una etapa de amplificación por PCR. En otros modos de realización, el kit puede incluir un primer y/o segundo cebador que incluya un fluoróforo y extintor para medir la cantidad de productos de amplificación por PCR. En algunos modos de realización, el kit comprende además una sonda de cualquiera de las clases descritas anteriormente para detectar el progreso o los productos de una reacción de amplificación.
- Un kit objeto puede comprender además uno o más reactivos necesarios para producir una secuencia complementaria a una región en un polinucleótido diana. Por ejemplo, un kit puede comprender cualquier ADN polimerasa dependiente de ARN que se pueda usar para sintetizar las primeras moléculas de ADN. Los ejemplos no limitantes de ADN polimerasas dependientes de ARN incluyen retrotranscriptasas (RT) derivadas del virus de la leucemia murina de Moloney (MMLV-RT), virus de la mieloblastosis aviar (AMV-RT), virus de la leucemia bovina (BLV-RT), virus del sarcoma de Rous (RSV-RT), virus de la inmunodeficiencia humana (VIH-RT), virus asociado a Rous (RAV-RT), virus asociado a mieloblastosis (MAV-RT) u otro virus del sarcoma-leucosis aviar (ASLV-RT), polimerasa de Z05 de *Thermus*, polimerasa delta Z05 y cualquier versión modificada o derivado de las mismas. En algunos modos de realización, el ADN dependiente de ARN carece de actividad RNasaH (por ejemplo, SUPERSRIPT III™, vendido por Invitrogen, 1600 Faraday Avenue, apartado de correos 6482, Carlsbad, Calif. 92008). En algunos modos de realización, la enzima que tiene actividad ADN polimerasa dependiente de ARN también tiene actividad ADN polimerasa dependiente de ADN, y se usa tanto para las etapas de retrotranscripción como de amplificación en la mezcla de reacción.
- En otro aspecto, la presente invención proporciona una mezcla de reacción para producir una secuencia complementaria a una región en un polinucleótido diana en una muestra, comprendiendo la mezcla de reacción un cebador en bucle, un cebador directo y un cebador inverso, en la que: (a) el cebador en bucle que comprende una secuencia A, una secuencia de conector y una secuencia B, orientadas desde 5' hacia 3' en una única hebra; en la que el cebador en bucle se hibrida específicamente al polinucleótido diana por medio de (i) complementariedad de secuencia entre la secuencia A y la secuencia A' en el polinucleótido diana, y (ii) complementariedad de secuencia entre la secuencia B y la secuencia B' en el polinucleótido diana, en la que la secuencia A' y la secuencia B' están orientadas desde 5' hacia 3' en el polinucleótido diana; (b) el cebador inverso que presenta homología de secuencia con una secuencia en el polinucleótido diana localizada en 5' con respecto a la secuencia A'; y (c) el cebador directo que se hibrida específicamente a una secuencia en la secuencia de conector.
- El polinucleótido diana usado en la mezcla de reacción puede ser un ARN no codificante corto o cualquier otro ARN corto, incluyendo un microARN, o cualquier otro polinucleótido diana descrito en la sección Procedimientos anterior. De forma similar, cualquier cebador en bucle divulgado en el presente documento se puede usar en una mezcla de reacción. La elección de la secuencia particular del cebador en bucle dependerá de la secuencia de polinucleótido diana que se va a generar.
- La mezcla de reacción puede comprender reactivos necesarios para producir una secuencia complementaria a una región en un polinucleótido diana en la muestra, incluyendo enzimas, tampones y similares. Por ejemplo, la mezcla de reacción puede comprender cualquier ADN polimerasa dependiente de ARN que se pueda usar para sintetizar las primeras moléculas de ADN. Los ejemplos no limitantes de ADN polimerasas dependientes de ARN incluyen retrotranscriptasas (RT) derivadas del virus de la leucemia murina de Moloney (MMLV-RT), virus de la mieloblastosis aviar (AMV-RT), virus de la leucemia bovina (BLV-RT), virus del sarcoma de Rous (RSV-RT), virus de la inmunodeficiencia humana (VIH-RT), virus asociado a Rous (RAV-RT), virus asociado a mieloblastosis (MAV-RT) u otro virus del sarcoma-leucosis aviar (ASLV-RT), polimerasa de Z05 de *Thermus*, polimerasa delta Z05 y cualquier versión modificada o derivado de las mismas. En algunos modos de realización, el ADN dependiente de ARN carece de actividad RNasaH (por ejemplo, SUPERSRIPT III™, vendido por Invitrogen, 1600 Faraday Avenue, apartado de correos 6482, Carlsbad, Calif. 92008). En algunos modos de realización, la enzima que tiene actividad ADN polimerasa dependiente de ARN también tiene actividad ADN polimerasa dependiente de ADN, y se usa tanto para las etapas de retrotranscripción como de amplificación en la mezcla de reacción.
- En algunos modos de realización, la mezcla de reacción de la presente invención comprende además tampones con una sal de potasio (por ejemplo, cloruro de potasio), una sal de magnesio (por ejemplo, cloruro de magnesio), un agente reductor (por ejemplo, ditiotreitól), desoxinucleósidos trifosfato (dNTP), detergente, nucleótidos o análogos

nucleotídicos, y uno o más marcadores detectables para supervisar la acumulación de productos de amplificación en tiempo real.

5 En algunos modos de realización, la mezcla de reacción para producir una secuencia complementaria a una región en un polinucleótido diana en una muestra está en un recipiente divulgado en el presente documento. En algunos modos de realización, el recipiente es un pocillo, una placa, un tubo, una cámara, una cubeta de lectura o un chip.

10 Los procedimientos y composiciones objeto son, en particular, útiles para producir y amplificar moléculas de ADNc a partir de moléculas diana de ácido nucleico pequeño, tales como a partir de moléculas de miARN. Se puede medir la cantidad de moléculas de ADN, lo que puede proporcionar una medición de la cantidad de moléculas de ácido nucleico pequeño diana en el material de partida. Por ejemplo, los procedimientos, composiciones, mezclas de reacción, pruebas, kits y/o sistemas de la presente invención se pueden usar para medir la cantidad de moléculas de ARN no codificante específico (por ejemplo, moléculas de miARN específico) en células vivas. Por ejemplo, la presente invención se puede usar para medir la cantidad de moléculas de ARN no codificante específico (por ejemplo, moléculas de miARN específico) en tipos de células diferentes en un cuerpo vivo, produciendo de este modo un "atlas" de la distribución de moléculas de ARN no codificante específico dentro del cuerpo. Además, la presente invención se puede usar para medir cambios en la cantidad de moléculas de ARN no codificante específico (por ejemplo, moléculas de miARN específico) en respuesta a un estímulo, tal como en respuesta al tratamiento de una población de células vivas con un fármaco.

20 Los modos de realización de los procedimientos, composiciones, mezclas de reacción, pruebas, kits y/o sistemas pueden ser útiles para diagnosticar y/o evaluar una afección o potencial afección en un paciente, que comprenden medir la expresión de uno o más ácidos nucleicos pequeños, tales como un miARN, en una muestra de un paciente. Una diferencia en la expresión en la muestra de un paciente y una referencia, tal como la expresión en una muestra normal o no patológica, puede ser indicativa de una enfermedad patológica o afección cancerosa, o riesgo de la misma. Se puede tomar una muestra de un paciente que tiene o se sospecha que tiene una enfermedad o afección patológica. En determinados aspectos, la muestra puede ser, pero no se limita a, tejido (por ejemplo, biopsia, en particular, biopsia con aguja fina), sangre, suero, plasma, líquido pancreático u otros líquidos corporales. La muestra puede estar fresca, congelada, fijada (por ejemplo, fijada con formol), incluida (por ejemplo, incluida en parafina) o una combinación de estas (por ejemplo, fijada con formol e incluida en parafina).

35 Los presentes procedimientos, composiciones, mezclas de reacción, pruebas, kits y/o sistemas son de particular interés en el cribado de diagnóstico de muestras de ácidos nucleicos pequeños para muchas enfermedades o afecciones. En determinados modos de realización, los procedimientos de diagnóstico implican identificar uno o más ARN, tal como miARN, expresados de forma diferencial en una muestra que sean indicativos de una enfermedad o afección (muestra no normal). En determinados modos de realización, diagnosticar una enfermedad o afección implica detectar y/o cuantificar un ARN no codificante expresado (y opcionalmente uno o más ARN codificantes). En algunos modos de realización, los procedimientos de la invención se usan para comparar la presencia, ausencia, abundancia relativa y/o cantidad de ARN no codificante entre una o más muestras relacionadas con una afección y una o más muestras no relacionadas con una afección y, de este modo, establecer correlaciones entre la presencia, ausencia, abundancia relativa y/o cantidad de uno o más ARN no codificantes y la afección. Los ARN correlacionados con un fenotipo de enfermedad se denominan "biomarcadores". En determinados modos de realización, la invención proporciona la detección de amplicones que son más cortos (por ejemplo, <30 nt) que por los procedimientos de PCR con retrotranscriptasa cuantitativa (qRT-PCR) tradicionales que se basan en amplicones más largos (por ejemplo, 60-45 200 nt). Las muestras clínicas a menudo se someten a una degradación extensa del ARN, lo que puede limitar la sensibilidad de detección si el tamaño del amplicón de la diana es de aproximadamente el mismo tamaño que el ARN degradado o mayor. El uso de amplicones más cortos para detectar la diana mejora la probabilidad de que la diana se amplifique exponencialmente incluso si está altamente degradada. Además, el uso de amplicones específicos de diana más cortos para detectar ARN puede ofrecer una cuantificación sensible de ARN en muestras incluidas en parafina fijadas con formol (FFPE), donde el ARN se puede ver comprometido por modificaciones covalentes a través del procedimiento de fijación, así como degradar por las altas temperaturas usadas en el procedimiento de inclusión.

50 La divulgación también se puede usar para la detección de ácidos nucleicos en enfermedades infecciosas, tales como virus ARN, tales como VIH, VHC y otros microbios. La invención también puede tener utilidad para la detección de ARN no codificante específico de enfermedad en enfermedades tales como leucemia, donde el conocimiento del biomarcador preciso puede tener valor pronóstico, así como la orientación en la toma de decisiones terapéuticas y otros aspectos del tratamiento de la enfermedad, tales como como predecir la reactividad a un tratamiento seleccionado.

60 En particular, los procedimientos, composiciones, mezclas de reacción, pruebas, kits y/o sistemas de la presente divulgación se pueden usar para evaluar muestras con respecto a enfermedades o afecciones que incluyen, pero no se limitan a: enfermedad de Alzheimer, degeneración macular, pancreatitis crónica; cáncer de páncreas; sida, enfermedades autoinmunitarias (artritis reumatoide, esclerosis múltiple, diabetes dependiente y no independiente de insulina, lupus eritematoso diseminado y enfermedad de Graves); cáncer (por ejemplo, maligno, benigno, metastásico, precáncer); enfermedades cardiovasculares (cardiopatía o arteriopatía coronaria, cardiopatía reumática, y hemorrágica e isquémica con apoplejía); enfermedades del sistema nervioso; e infección por microorganismos

patógenos (dermatofitosis del pie, varicela, resfriado común, enfermedades diarreicas, gripe, herpes genital, malaria, meningitis, neumonía, sinusitis, enfermedades de la piel, faringoamigdalitis estreptocócica, tuberculosis, infecciones de las vías urinarias, infecciones vaginales, hepatitis vírica); inflamación (alergia, asma); enfermedades priónicas (por ejemplo, CJD, kuru, GSS, FFI).

5 Los cánceres que se pueden evaluar por los procedimientos, composiciones, mezclas de reacción, pruebas, kits y/o sistemas de la presente divulgación incluyen células cancerosas que incluyen células y células cancerosas de la vejiga, sangre, huesos, médula ósea, cerebro, mama, colon, esófago, aparato digestivo, encías, cabeza, riñón, hígado, pulmón, nasofaringe, cuello, ovario, páncreas, próstata, piel, estómago, testículos, lengua o útero. Además, el cáncer puede ser específicamente del siguiente tipo histológico, aunque no se limita a estos: neoplasia, maligna; carcinoma; carcinoma, indiferenciado; carcinoma gigante y fusocelular; carcinoma microcítico; carcinoma papilar; carcinoma epidermoide; carcinoma linfoepitelial; carcinoma basocelular; pilomatrix carcinoma; carcinoma de células de transición; carcinoma de células de transición papilar; adenocarcinoma; gastrinoma, maligno; colangiocarcinoma; carcinoma hepatocelular; carcinoma hepatocelular y colangiocarcinoma combinados; adenocarcinoma trabecular; carcinoma quístico adenóide; adenocarcinoma en pólipo adenomatoso; adenocarcinoma, poliposis coli familiar; carcinoma sólido; tumor carcinoide, maligno; adenocarcinoma branquioloalveolar; adenocarcinoma papilar; carcinoma cromóforo; carcinoma acidófilo; adenocarcinoma oxífilo; carcinoma basófilo; adenocarcinoma de células claras; carcinoma de células granulares; adenocarcinoma folicular; adenocarcinoma papilar y folicular; carcinoma esclerosante no encapsulante; carcinoma cortical suprarrenal; carcinoma endometriode; carcinoma de anejos cutáneos; adenocarcinoma apocrino; adenocarcinoma sebáceo; adenocarcinoma ceruminoso; carcinoma mucoepidermoide; cistadenocarcinoma; cistadenocarcinoma papilar; cistadenocarcinoma seroso papilar; cistadenocarcinoma mucinoso; adenocarcinoma mucinoso; carcinoma de células en anillo de sello; carcinoma de conducto infiltrante; carcinoma medular; carcinoma lobulillar; carcinoma inflamatorio; enfermedad de Paget, mamaria; carcinoma de células acinares; carcinoma adenoepidermoide; adenocarcinoma con metaplasia epidermoide; timoma, maligno; tumor estromal de ovario, maligno; tecomoma, maligno; tumor de células de la granulosa, maligno; androblastoma, maligno; carcinoma de células de Sertoli; tumor de células de Leydig, maligno; tumor de células lipídicas, maligno; paraganglioma, maligno; paraganglioma extramamario, maligno; feocromocitoma; glomangiosarcoma; melanoma maligno; melanoma amelanótico; melanoma de extensión superficial; melanoma maligno en nevo pigmentado gigante; melanoma de células epitelioideas; nevo azul, maligno; sarcoma; fibrosarcoma; histiocitoma fibroso, maligno; mixosarcoma; liposarcoma; leiomiomasarcoma; rhabdomyosarcoma; rhabdomyosarcoma embrionario; rhabdomyosarcoma alveolar; sarcoma estromal; tumor mixto, maligno; tumor mixto mulleriano; nefroblastoma; hepatoblastoma; carcinosarcoma; mesenquimoma, maligno; tumor de Brenner, maligno; tumor filodes, maligno; sarcoma sinovial; mesotelioma, maligno; disgerminoma; carcinoma embrionario; teratoma, maligno; bocio de ovario, maligno; coriocarcinoma; mesonefroma, maligno; hemangiosarcoma; hemangioendotelioma, maligno; sarcoma de Kaposi; hemangiopericitoma, maligno; linfangiosarcoma; osteosarcoma; osteosarcoma yuxtacortical; condrosarcoma; condroblastoma, maligno; condrosarcoma mesenquimatoso; tumor gigantocelular de hueso; sarcoma de Ewing; tumor odontogénico, maligno; odontosarcoma ameloblástico; ameloblastoma, maligno; fibrosarcoma ameloblástico; pinealoma, maligno; cordoma; glioma, maligno; ependimoma; astrocitoma; astrocitoma protoplásmico; astrocitoma fibrilar; astroblastoma; glioblastoma; oligodendroglioma; oligodendroblastoma; neuroectodérmico primitivo; sarcoma cerebeloso; ganglioneuroblastoma; neuroblastoma; retinoblastoma; tumor neurógeno olfatorio; meningioma, maligno; neurofibrosarcoma; neurilemoma, maligno; tumor de células granulares, maligno; linfoma maligno; enfermedad de Hodgkin; linfoma de Hodgkin; paragranuloma; linfoma maligno, linfocítico pequeño; linfoma maligno, células grandes, difuso; linfoma maligno, folicular; micosis fungoide; otros linfomas no hodgkinianos especificados; histiocitosis maligna; mieloma múltiple; sarcoma de mastocitos; enfermedad inmunoproliferativa del intestino delgado; leucemia; leucemia linfocítica; leucemia de células plasmáticas; eritroleucemia; leucemia de células de linfosarcoma; leucemia mielógena; leucemia basófila; leucemia eosinófila; leucemia monocítica; leucemia de mastocitos; leucemia megacarioblástica; sarcoma mielógeno; y tricoleucemia. Además, el ARN se puede evaluar en precánceres, tales como metaplasia, displasia e hiperplasia.

50 Se contempla específicamente que la presente divulgación se puede usar para evaluar diferencias entre estadios de una enfermedad, tales como entre hiperplasia, neoplasia, precáncer y cáncer, o entre un tumor primario y un tumor metastatizado. Además, se contempla que también se puedan comparar muestras que tengan diferencias en la actividad de determinadas vías. Estas vías incluyen las siguientes y aquellas que implican los siguientes factores: respuesta a anticuerpos, apoptosis, señalización de calcio/NFAT, ciclo celular, migración celular, adhesión celular, división celular, citocinas y receptores de citocinas, metabolismo de fármacos, factores de crecimiento y receptores de factores de crecimiento, respuesta inflamatoria, señalización de insulina, señalización de NFκ-B, angiogénesis, adipogénesis, adhesión celular, infección vírica, infección bacteriana, senescencia, motilidad, transporte de glucosa, respuesta al estrés, oxidación, envejecimiento, extensión telomérica, acortamiento telomérico, transmisión neural, coagulación sanguínea, diferenciación de células madre, señalización de receptores acoplados a proteína G (GPCR) y activación de p53.

65 Las vías celulares que se pueden evaluar usando los procedimientos, composiciones, mezclas de reacción, pruebas, kits y/o sistemas de la presente divulgación también incluyen, pero no se limitan a, las siguientes: una vía de adhesión o motilidad, incluyendo, pero sin limitarse a, aquellas que implican proteína AMP cíclico, proteína cinasa A, receptores acoplados a proteína G, adenilil ciclasa, L-selectina, E-selectina, PECAM, VCAM-1, α-actinina, paxilina, cadherinas, AKT, integrina-α, integrina-β, RAF-1, ERK, PI-3 cinasa, vinculina, metaloproteinasas de la matriz, Rho GTPasas, p85,

factores trefoil, proflina, FAK, MAP cinasa, Ras, caveolina, calpaína-1, calpaína-2, receptor del factor de crecimiento epidérmico, ICAM-1, ICAM-2, cofilina, actina, gelsolina, RhoA, RAC 1, cinasa de cadena ligera de miosina, receptor del factor de crecimiento derivado de plaquetas o ezrina; cualquier vía de apoptosis, incluyendo, pero sin limitarse a, aquellas que implican AKT, ligando para Fas, NFκB, caspasa-9, PI3 cinasa, caspasa-3, caspasa-7, ICAD, CAD, EndoG, granzima B, Bad, Bax, Bid, Bak, APAF-1, citocromo C, p53, ATM, Bcl-2, PARP, Chk1, Chk2, p21, c-Jun, p73, Rad51, Mdm2, Rad50, c-Abl, BRCA-1, perforina, caspasa-4, caspasa-8, caspasa-6, caspasa-1, caspasa-2, caspasa-10, Rho, Jun cinasa, Jun cinasa cinasa, R1p2, lamina-A, lamina-B1, lamina-B2, receptor Fas, H2O2, granzima A, NADPH oxidasa, HMG2, CD4, CD28, CD3, TRADD, IKK, FADD, GADD45, receptor de muerte DR3, receptor de muerte DR4/5, FLIP, APO-3, GRB2, SHC, ERK, MEK, RAF-1, AMP cíclico, proteína cinasa A, E2F, proteína de retinoblastoma, Smac/Diablo, receptor de ACH, 14-3-3, FAK, SODD, receptor de TNF, RIP, ciclina-D1, PCNA, Bcl-XL, PIP2, PIP3, PTEN, ATM, Cdc2, proteína cinasa C, calcineurina, IKKα, IKKβ, IKKγ, SOS-1, c-FOS, Traf-1, Traf-2, IκBβ o el proteasoma; cualquier vía de activación celular, incluyendo, pero sin limitarse a, aquellas que implican proteína cinasa A, óxido nítrico, caveolina-1, actina, calcio, proteína cinasa C, Cdc2, ciclina B, Cdc25, GRB2, proteína cinasa SRC, factores de ribosilación de ADP (ARF), fosfolipasa D, AKAP95, p68, Aurora B, CDK1, Eg7, histona H3, PKAc, CD80, PI3 cinasa, WASP, Arp2, Arp3, p16, p34, p20, PP2A, angiotensina, enzima convertidora de angiotensina, receptor activado por proteasa 1, receptor activado por proteasa 4, Ras, RAF-1, PLCβ, PLCγ, COX-1, receptores acoplados a proteína G, fosfolipasa A2, IP3, SUMO1, SUMO 2/3, ubiquitina, Ran, Ran-GAP, Ran-GEF, p53, glucocorticoides, receptor de glucocorticoides, componentes del complejo SWI/SNF, RanBP1, RanBP2, importinas, exportinas, RCC1, CD40, ligando para CD40, p38, IKKα, IKKβ, NFκB, TRAF2, TRAF3, TRAF5, TRAF6, IL-4, receptor de IL-4, CDK5, factor de transcripción AP-1, CD45, CD4, receptores de linfocitos T, MAP cinasa, factor de crecimiento nervioso, receptor del factor de crecimiento nervioso, c-Jun, c-Fos, Jun cinasa, GRB2, SOS-1, ERK-1, ERK, JAK2, STAT4, IL-12, receptor de IL-12, óxido nítrico sintasa, TYK2, IFNγ, elastasa, IL-8, epitelinas, IL-2, receptor de IL-2, CD28, SMAD3, SMAD4, TGFβ o receptor de TGFβ; cualquier vía de regulación del ciclo celular, señalización o diferenciación, incluyendo, pero sin limitarse a, aquellas que implican TNF, proteína cinasa SRC, Cdc2, ciclina B, Grb2, Sos-1, SHC, p68, Aurora cinasas, proteína cinasa A, proteína cinasa C, Eg7, p53, ciclinas, cinasas dependientes de ciclina, factor de crecimiento neural, factor de crecimiento epidérmico, proteína de retinoblastoma, ATF-2, ATM, ATR, AKT, CHK1, CHK2, 14-3-3, WEE1, CDC25, CDC6, proteínas del complejo de reconocimiento de origen, p15, p16, p27, p21, ABL, c-ABL, SMAD, ubiquitina, SUMO, proteínas de choque térmico, Wnt, GSK-3, angiotensina, p73 por cualquier PPAR, TGFα, TGFβ, p300, MDM2, GADD45, Notch, cdc34, BRCA-1, BRCA-2, SKP1, el proteasoma, CUL1, E2F, p107, hormonas esteroideas, receptores de hormonas esteroideas, IκBα, IκBβ, Sin3A, proteínas de choque térmico, Ras, Rho, ERK, IKK, PI3 cinasa, Bcl-2, Bax, PCNA, MAP cinasas, dineína, RhoA, PKAc, AMP cíclico, FAK, PIP2, PIP3, integrinas, trombopoyetina, Fas, ligando para Fas, PLK3, MEK, JAK, STAT, acetilcolina, paxilina calcineurina, p38, importinas, exportinas, Ran, Rad50, Rad51, ADN polimerasa, ARN polimerasa, Ran-GAP, Ran-GEF, NuMA, Tpx2, RCC1, Sonic Hedgehog, Crml, patched (Ptc-1), MPF, CaM cinasas, tubulina, actina, proteínas asociadas a cinetocoro, proteínas de unión a centrómero, telomerasa, TERT, PP2A, c-MYC, insulina, receptores de linfocitos T, receptores de linfocitos B, CBP, IκB, NFκB, RAC1, RAF1, EPO, diacilglicerol, c-Jun, c-Fos, Jun cinasa, factores inducibles por hipoxia, GATA4, β-catenina, α-catenina, calcio, arrestina, survivina, caspasas, procaspasas, CREB, CREM, cadherinas, PECAM, corticoesteroides, factores estimulantes de colonias, calpaínas, adenilil ciclasa, factores de crecimiento, óxido nítrico, receptores transmembranarios, retinoides, proteínas G, canales iónicos, activadores transcripcionales, coactivadores transcripcionales, represores transcripcionales, interleucinas, vitaminas, interferones, correpresores transcripcionales, el poro nuclear, nitrógeno, toxinas, proteólisis o fosforilación; cualquier vía metabólica, incluyendo, pero sin limitarse a, aquellas que implican la biosíntesis de aminoácidos, oxidación de ácidos grasos, biosíntesis de neurotransmisores y otras moléculas de señalización celular, biosíntesis de poliaminas, biosíntesis de lípidos y esfingolípidos, catabolismo de aminoácidos y nutrientes, síntesis de nucleótidos, eicosanoides, reacciones de transporte de electrones, degradación asociada a ER, glucólisis, fibrinólisis, formación de cuerpos cetónicos, formación de fagosomas, metabolismo del colesterol, regulación de la ingesta de alimentos, homeostasis energética, activación de protrombina, síntesis de lactosa y otros azúcares, multirresistencia, biosíntesis de fosfatidilcolina, el proteasoma, proteína precursora amiloidea, Rab GTPasas, síntesis de almidón, glucosilación, síntesis de fosfoglicéridos, vitaminas, el ciclo del ácido cítrico, receptor de IGF-1, el ciclo de la urea, transporte vesicular o vías de rescate. Se contempla además que las moléculas de ácidos nucleicos de la divulgación se puedan emplear en procedimientos de diagnóstico y terapéuticos con respecto a cualquiera de las vías o factores anteriores. Por tanto, en algunos modos de realización, el ARN no codificante se puede expresar de forma diferencial con respecto a una o más de las vías o factores anteriores.

55 Los rasgos fenotípicos también incluyen características tales como longevidad, morbilidad, apariencia (por ejemplo, calvicie, obesidad), fuerza, velocidad, resistencia, fertilidad, susceptibilidad o receptividad a fármacos o tratamientos terapéuticos particulares (eficacia farmacológica) y riesgo de toxicidad farmacológica. Las muestras que difieren en estos rasgos fenotípicos también se pueden evaluar usando los procedimientos descritos.

60 En determinados modos de realización de los procedimientos, composiciones, mezclas de reacción, pruebas, kits y/o sistemas de la presente divulgación, se pueden generar perfiles de ácidos nucleicos para evaluar y correlacionar esos perfiles con la farmacocinética. Por ejemplo, se pueden crear y evaluar perfiles de ARN para las muestras de tumores y de sangre del paciente antes de que se trate al paciente o durante el tratamiento para determinar si existen ARN en los que su expresión se correlaciona con el desenlace clínico del paciente. La identificación de ARN diferenciales puede dar lugar a un ensayo de diagnóstico que los implique que se pueda usar para evaluar muestras de tumores y/o sangre para determinar qué farmacoterapia se debe proporcionar al paciente. Además, los procedimientos se

pueden usar para identificar o seleccionar pacientes adecuados para un ensayo clínico particular. Si se determina que un perfil de ARN está correlacionado con la eficacia farmacológica o toxicidad farmacológica, eso puede ser pertinente para si ese paciente es un paciente apropiado para recibir el fármaco o para una dosificación particular del fármaco.

5 En otro aspecto, la presente divulgación proporciona un sistema para detectar un polinucleótido diana en una muestra, comprendiendo el sistema: (a) un ordenador configurado para recibir una solicitud de un cliente para realizar una
10 reacción de detección en una muestra; (b) un sistema de amplificación que realiza una reacción de amplificación de ácido nucleico en una mezcla de reacción de la reivindicación 37 para producir un producto amplificado; y (c) un generador de informes que envía un informe a un destinatario, en el que el informe contiene resultados para la
15 detección de una señal de detección correspondiente a la cantidad del producto amplificado. En un modo de realización, el destinatario es el cliente. En algunos modos de realización, un medio legible por ordenador que comprende códigos que, tras la ejecución por uno o más procesadores, implementan un procedimiento de detección de un polinucleótido diana en una muestra, comprendiendo el procedimiento: (a) recibir una solicitud de un cliente para realizar una reacción de detección en una muestra; (b) realizar una reacción de amplificación de ácido nucleico
20 en una mezcla de reacción de la reivindicación 40 para producir un producto amplificado; y (c) generar un informe que contenga los resultados para la detección de una señal de detección correspondiente a la cantidad del producto amplificado.

20 En algunos modos de realización, el sistema comprende además una página web configurada para aceptar una oferta de adquisición de un servicio de detección, cuantificación o amplificación de ácido nucleico. En algunos modos de realización, el formato es electrónico, por ejemplo, una página web. En algunos modos de realización, el sistema comprende además una pantalla que muestra remisiones a un orientador y/u otro profesional médico (por ejemplo, genetistas médicos u obstetra/ginecólogo) en base a la información facilitada.

25 Internet y la red informática mundial ofrecen acceso a y distribución de información. En algunos modos de realización, un sitio web puede ser, en particular, adecuado para proporcionar eficazmente diversas funcionalidades para permitir que los clientes adquieran un servicio de detección, cuantificación o amplificación de ácido nucleico. El sistema típicamente incluirá un servidor en el que reside el sitio web. Los usuarios usan una interfaz conectada al servidor, tal como un monitor de ordenador o una pantalla de teléfono, para interactuar con el sitio web haciendo clic o pasando el
30 cursor sobre enlaces que muestran información o dirigen al usuario a otra página web. Los sitios web típicamente son interactivos, lo que permite al usuario introducir información o una consulta y obtener una respuesta en la interfaz.

35 En algunos modos de realización de un sistema y procedimiento comercial, un sitio web puede permitir que un cliente adquiera, gestione y vea los resultados de detección, cuantificación o amplificación de ácido nucleico, así como que sepa más en general de las consecuencias de estos resultados. Por ejemplo, un cliente puede ser un paciente que busca saber si su perfil de ARN pequeño es indicativo de un perfil de enfermedad. A un cliente se le puede presentar la oferta de adquirir un servicio de detección, cuantificación o amplificación de ácido nucleico para determinar uno o más de: (i) el estado genético del cliente; (ii) la probabilidad de que el cliente desarrolle una o más enfermedades o rasgos; y (iii) la probabilidad de que el cliente desarrolle una o más enfermedades o rasgos, en base a variantes
40 genéticas causales identificadas en la muestra de ácido nucleico del cliente.

45 Si el cliente elige adquirir un servicio de detección, cuantificación o amplificación de ácido nucleico que usa los procedimientos, composiciones, mezclas de reacción, pruebas, kits y/o sistemas de la presente divulgación, entonces el cliente puede pagar una tasa, por ejemplo, a través de una transacción con tarjeta de crédito en línea, a cambio de servicios, consulta telefónica directa con el personal de la empresa y/o remisiones a profesionales médicos pertinentes. Las pruebas y las remisiones se pueden pagar por una tasa en el punto de adquisición o se pueden incluir en una tasa de registro de usuario inicial. En algunos modos de realización, los servicios son gratuitos y los ingresos se generan por la empresa anunciando otros productos junto con un producto particular. Por ejemplo, después de que un cliente realice un pedido en línea, el pedido se envía a un servidor para su procesamiento. Una vez que se ha verificado el pago, el servidor de procesamiento de pedidos puede enviar una notificación electrónica a un proveedor de envío para que remita un kit de recogida de ácido nucleico al cliente. En un modo de realización, el kit de recogida está separado del servicio de detección, cuantificación y/o amplificación, o el usuario o cliente ya tiene u obtiene el kit de recogida de ácido nucleico de otra fuente. También se pueden enviar electrónicamente notificaciones de forma periódica al cliente, que comprendan la confirmación del pedido y actualizaciones sobre el estado del pedido y envío.

55 En algunos modos de realización de un procedimiento comercial, un cliente puede depositar una muestra en el kit de recogida. Cualquier muestra que sea obvia para un experto en la técnica se puede depositar en o sobre un kit de recogida. Una muestra puede ser cualquier material que contenga ácido nucleico que se vaya a analizar que fuera obvio para un experto en la técnica, tal como un líquido corporal, como saliva o sangre. A continuación, el kit de recogida se puede devolver a la empresa para su envío a un laboratorio o se puede devolver directamente a un
60 laboratorio para su procesamiento. Un laboratorio, interno dentro de la empresa, contratado para trabajar con la empresa, o bien externo a la empresa, puede aislar los ácidos nucleicos del cliente de la muestra proporcionada. Después de que los ácidos nucleicos se hayan aislado de la muestra, se puede usar un dispositivo (tal como un aparato descrito en el presente documento) para detectar, amplificar y/o cuantificar su presencia. En algunos modos de realización, no se tiene que aislar el ácido nucleico de la muestra para detectar, cuantificar y/o amplificar los ácidos
65 nucleicos.

La información con respecto a los ácidos nucleicos detectados, cuantificados y/o amplificados usando los procedimientos, composiciones, mezclas de reacción, pruebas, kits y/o sistemas se puede enviar electrónicamente a un servidor para su almacenamiento y procesamiento. Se puede ejecutar el código informático en el servidor en la información sobre los ácidos nucleicos para deducir la informática biomédica del cliente y/o para confirmar la presencia de variantes genéticas causales y/o secuencias no objeto, si las hubiera. A continuación, la información sobre los ácidos nucleicos procesada se puede enviar electrónicamente a un servidor, donde se puede ejecutar el código informático en el servidor en la información sobre los ácidos nucleicos procesada para predecir la probabilidad de que el cliente tenga cada uno de una pluralidad de rasgos provocados por variantes genéticas causales que se haya descubierto que estén presentes en la información sobre los ácidos nucleicos procesada del cliente. A continuación, los resultados se pueden transmitir electrónicamente a un servidor para su almacenamiento.

En un ejemplo, se puede enviar una notificación al cliente para avisar al cliente de la disponibilidad de los resultados. La notificación puede ser electrónica, incluyendo sus ejemplos no limitantes un mensaje de texto, un correo electrónico u otro paquete de datos; o la notificación puede ser no electrónica, incluyendo sus ejemplos no limitantes una llamada telefónica de un orientador o comunicación impresa, tal como un informe enviado a través del correo. Los resultados proporcionados a un cliente pueden informar al cliente del estado de portador del cliente en cuanto a una o más enfermedades o rasgos y/o las posibilidades de que el cliente desarrolle una o más enfermedades o rasgos. Después de que el cliente haya recibido los resultados y las remisiones, el pedido del cliente se puede considerar completado y los resultados y las remisiones pueden permanecer accesibles para el cliente a través de una cuenta de sitio web en línea. A continuación, el cliente puede elegir seguir además una remisión fuera de línea si el cliente así lo desea, pero fuera del ámbito del sitio web.

EJEMPLOS

Los siguientes ejemplos se dan para el propósito de ilustrar diversos modos de realización de la divulgación y no pretenden limitar la presente invención de ninguna manera. Los presentes ejemplos, junto con los procedimientos descritos en el presente documento, son actualmente representativos de modos de realización preferentes, son ejemplares, y no se pretenden como limitaciones del alcance de la invención.

Ejemplo 1: descripción esquemática de la estrategia novedosa para la cuantificación de miARN

Una representación esquemática ejemplar de un esquema de amplificación de secuencia complementaria de la invención aparece en la FIG. 1. El cebador en bucle para RT contiene tres partes: la secuencia universal (indicada por la línea que conecta la secuencia A y secuencia B), la secuencia complementaria al miARN en el extremo 5' del cebador en bucle para RT (secuencia A) y la secuencia complementaria al miARN en el extremo 3' del cebador en bucle para RT (secuencia B). La reacción de RT comienza desde el extremo 3' del cebador en bucle para RT (secuencia B) y genera una hebra de ADNc híbrida que contiene tanto miARN como secuencia universal. Esta RT con el cebador en bucle específico usa retrotranscriptasa en el caso de diana de ARN o extensión del cebador con polimerasa en el caso de diana de ADN. La polimerasa detiene la hibridación de la secuencia A al polinucleótido diana en su producción de una secuencia complementaria a la región en un polinucleótido diana en 5' de la región de hibridación de la secuencia B. Después de la RT, el ADNc híbrido se cuantifica por qPCR usando un cebador directo que es complementario a la secuencia universal y un cebador inverso que es complementario a la secuencia específica de miARN.

Ejemplo 2: miARN diana y cebadores

Las secuencias de miARN *hsa-let-7a-5p* (UGAGGUAGUAGGUUGUAUAGUU, número de acceso MIMAT0000062, 22 nt) y *hsa-let-7c* (UGAGGUAGUAGGUUGUAUAGUU, número de acceso MIMAT0000064, 22 nt) se obtuvieron del sitio miRBASE: <http://www.mirbase.org/index.shtml>. La secuencia de la prueba con *hsa-let-7x* se generó reemplazando una guanina de *hsa-let-7a-5p* por citosina (UGAGGUAGUACGUUGUAUAGUU, 22 nt). Los tres miARN sintéticos se simplificaron como *let-7a*, *let-7c* y *let-7x* en este informe. Los oligonucleótidos de miARN sintético y cebadores se adquirieron de Integrated DNA Technologies (IDT). Los cebadores se nombran y tienen secuencias enumeradas, desde 5' hacia 3', como sigue: "3+3":

ACCCTGTTGCAGTGGCCAATCGAGGAGGTCGAGAGGCTGAGAGATA; "4+4":
ACCTCTGTTGCAGTGGCCAATCGAGGAGGTCGAGAGGCTGAGAGTATA; "5+5":
ACCTACTGTTGCAGTGGCCAATCGAGGAGGTCGAGAGGCTGAGAGCTATA; "2+3":
ACCTGTTGCAGTGGCCAATCGAGGAGGTCGAGAGGCTGAGAGTAT; "2+4":
ACCTGTTGCAGTGGCCAATCGAGGAGGTCGAGAGGCTGAGAGTATA; "3+4":
ACCCTGTTGCAGTGGCCAATCGAGGAGGTCGAGAGGCTGAGAGTATA.

Ejemplo 3: retrotranscripción y qPCR

La solución de reacción de RT contenía 0,25 µg de oligonucleótidos de miARN sintético y cebador para RT 0,7 µM. El

tampón de RT, dNTP, MgCl₂, RNaseOUT y RT Superscript® III se suministraron por el kit sistema de síntesis de primera hebra Superscript® III (Invitrogen por Life Technologies, 18080-051). La RT se realizó de acuerdo con la instrucción del fabricante. En resumen, se incubaron 10 µl de soluciones de reacción en un instrumento Bio-Rad CFX a 37 °C, 42 °C o 50 °C durante 50 min, seguido de 75 °C durante 15 min y, a continuación, los rendimientos de RT se mantuvieron a 4 °C.

Los rendimientos de RT se analizaron por un instrumento de electroforesis capilar (EC), el analizador de fragmentos (Advanced Analytical Technologies) junto con el kit de análisis de ARN con sensibilidad (DNF-489-0500) de acuerdo con las instrucciones del fabricante. La reacción contenía cebador para RT, pero no se estableció ningún molde de miARN como control de RT.

La qPCR se realizó usando TATAA SYBR® Grandmaster® Mix de acuerdo con la instrucción del fabricante. El ADNc generado de RT se diluyó a aproximadamente 10⁶ copias/µl con tampón TE-LPA (se suspendieron 8 µl de LPA en 10 ml de 1x Tris-EDTA). A continuación, se añadieron 1 µl de ADNc diluido y cebadores para PCR 5+5 Fp (universal, CTACTGTTGCAGTGG, 22 nt) y 5+5 Rp (específico de miARN, TGAGGTAGTAGGTTG, 22 nt) 200 nM a la solución de reacción de PCR. Los números de copias de ADNc diana en la solución de reacción se calcularon por la siguiente fórmula: copias de ADNc = conc. de molde de miARN (nM) x 6,022 x 10²³ / (longitud de miARN x 650 x 10⁹). Los 10 µl de solución de reacción se incubaron a 95 °C durante 1 min, seguido de 45 ciclos de 95 °C durante 5 s, 52 °C durante 30 s y 72 °C durante 10 s. Todas las reacciones se efectuaron por duplicado.

Ejemplo 4: validación del procedimiento de RT

Para lograr la especificidad óptima de la cuantificación de miARN, se propuso una nueva estrategia como se ejemplifica en la FIG. 1. En primer lugar, el molde de ADNc híbrido se obtuvo por una retrotranscripción con un cebador que contenía una secuencia universal de 40 nt y una secuencia específica de miARN de 5-10 nt. A continuación, la qPCR se realizó con un cebador directo universal y un cebador inverso específico de miARN.

En este ensayo, tanto el extremo 5' como 3' de los cebadores para RT se solaparon con el miARN diana. Por lo tanto, se planteó una pregunta: cuántos nucleótidos de cebadores para RT se requieren para hibridarse con miARN diana sin interferir en la actuación de la retrotranscriptasa junto con el molde de miARN. Para abordar esta cuestión, se sometieron a prueba cebadores para RT diferentes con diversos números de nucleótidos complementarios al extremo 5' y 3' del miARN diana en el ejemplo 2.

Existe una RT eficaz por el cebador para RT "5+5". La reacción de RT se llevó a cabo en primer lugar a 50 °C. Se aplicó el miARN sintético *let-7a* como molde y se analizaron los rendimientos de RT por EC. Después de la RT con el cebador "5+5", se detectó un pico adicional con 18 nt más que el cebador para RT en la FIG. 2 (parte A), en comparación con el control de RT que no contenía ningún molde de miARN en la FIG. 2 (parte B). En la FIG. 2 (parte A), el pico del ADNc híbrido con aproximadamente 74 nt se indica con una flecha. La FIG. 2 (parte B) ilustra los resultados de un control de RT que contenía cebador 5+5, pero no miARN. LM en la FIG. 2 indica el marcador escalera de 20 nt. Este resultado indicó que el ADNc híbrido se generó por el cebador para RT "5+5".

La existencia del ADNc híbrido se confirmó además por qPCR con los cebadores para PCR 5+5 Fp y 5+5 Rp, como se muestra en la FIG. 3 (parte A). La concentración de cebadores para RT también fue importante para la exactitud de la cuantificación de miARN. Se descubrió que cuando la concentración del cebador para RT 5+5 disminuyó de 1,4 a 0,7 µM, mostró poca interferencia con la qPCR en dirección 3' sin influir en el procedimiento de RT en la FIG. 3 (partes A y B). En la FIG. 3 (parte A), el producto de RT se generó por el cebador para RT 5+5 0,7 µM. En la FIG. 3 (parte B), el producto de RT se generó por el cebador para RT 5+5 1,4 M. Para ambas partes A y B de la FIG. 3, la curva de amplificación I fue el amplicón de ADNc híbrido y la curva de amplificación II fue el amplicón de control de RT.

Después de realizar la RT con otros cebadores enumerados en el ejemplo 2, ninguno de ellos generó el ADNc híbrido a 50 °C. Considerando que la temperatura puede influir en el resultado de la RT, la RT se llevó a cabo a 37 °C y 42 °C, otras dos temperaturas de RT comunes usadas en los laboratorios. Como se muestra en la FIG. 4, el ADNc se generó por el cebador 5+5 a ambas temperaturas. Por el contrario, todavía no se generó ADNc híbrido por otros pares de cebadores a ninguna de estas 2 temperaturas sometidas a prueba. En la FIG. 4 (parte A), la RT se realizó a 42 °C. En la FIG. 4 (parte B), la RT se realizó a 37 °C. En la FIG. 4 (parte C), el control de RT contenía cebador 5+5, pero no miARN. En la FIG. 4, los ADNc recién generados se indicaron con una flecha; LM indica el marcador escalera; y el ARN se indica con 20 nt.

Una alta concentración de cebadores para RT puede dar lugar a una lectura negativa falsa de EC al comprimir la señal de rendimiento de ADNc a UFR bajas. Por lo tanto, la concentración de cebadores para RT se redujo de 0,7 M a 0,28 M. A continuación, se observó un pico adicional que podría representar el rendimiento de ADNc híbrido después de la RT con el cebador para RT 3+3 en la FIG. 5 (partes A y B). Para garantizar la existencia de ADNc híbrido, los productos de RT se validaron por qPCR usando los cebadores 5+5 Fp y 5+5 Rp, y el valor de C_q fue solo 2,3 ciclos más que el del control de RT, como se observa en la FIG. 5 (parte C). En la FIG. 5 (parte A), se observó un pico adicional en el análisis de EC que representaba el rendimiento de ADNc híbrido cuando la concentración del cebador

para RT 3+3 era de 1,4 μ M. En la FIG. 5 (parte B), se observó un pico adicional en el análisis de EC que representaba el rendimiento de ADNc híbrido cuando la concentración del cebador para RT 3+3 era de 2,8 μ M. En la FIG. 5 (parte C), el análisis de qPCR muestra que la curva de amplificación I representó el amplicón del producto de RT generado por el cebador 3+3 0,28 M y la curva de amplificación II representó el amplicón del control de RT (RT sin molde de miARN) que contenía el cebador para RT 3+3 0,28 M. En conclusión, el ADNc híbrido que contiene la secuencia de miARN diana se puede retrotranscribir por el par de cebadores 5+5. Estos resultados indican que para esta diana en las condiciones sometidas a prueba, 5 nt que se solapaban a la secuencia de miARN en el extremo 3' del cebador para RT fueron óptimos para comenzar el procedimiento de RT.

10 Ejemplo 5: validación de la especificidad

La especificidad de este ensayo se evaluó usando miARN sintéticos de *let-7c* y *let-7x* que difieren tan solo en un nucleótido con *let-7a*. En primer lugar, se evalúa la especificidad de RT. La RT se realizó con el cebador para RT 5+5 que se emparejó perfectamente con *let-7a*. El rendimiento de RT se examinó por EC. Los resultados indicaron que se generaron cantidades similares de productos de RT de moldes de miARN diferentes, como se muestra en la FIG. 6 (partes A-C). En la FIG. 6 (parte A), se usó *let-7a* como molde de RT. En la FIG. 6 (parte B), se usó *let-7c* como molde de RT. En la FIG. 6 (parte C), se usó *let-7x* como molde de RT. En la FIG. 6, LM indica el marcador escalera de ARN de 20 nt.

En segundo lugar, se evaluó la especificidad de la qPCR. Los productos de RT se amplificaron por cebadores para PCR 5+5 Fp y 5+5 Rp. La eficacia de detección relativa de la diferencia de Cq entre dianas perfectamente emparejadas y emparejadas erróneamente se calculó por la fórmula $2^{-(Cq_{\text{inespecífico}} - Cq_{\text{específico}})}$, asumiendo una eficacia de un 100 % para el emparejamiento perfecto. Como se muestra en la FIG. 7, se observó tan solo un 1,48 % de nivel de señal no específica al comparar los resultados de amplificación de *let-7a* con *let-7x*. Sin embargo, la especificidad para discriminar *let-7c* de *let-7a* fue baja, mostrando un 21,8 % de eficacia de detección relativa de *let-7c* con respecto a *let-7a*. El experimento se repitió usando otro lote de productos de RT y se obtuvo un resultado similar. En la FIG. 7, asumiendo que la eficacia de amplificación de *let-7a* era de un 100 %, los valores de Cq de amplificación de *let-7c* y *let-7x* estaban en contra con respecto a *let-7a* y se calculó la eficacia de detección relativa.

Aunque tanto *let-7c* como *let-7x* tenían un emparejamiento erróneo nucleotídico con *let-7a*, la eficacia de detección relativa de *let-7c* y *let-7x* frente a *let-7a* fue bastante diferente. Esta diferencia se podría determinar por la posición del nucleótido emparejado erróneamente. En cuanto a *let-7x*, el nucleótido emparejado erróneamente se localizó en el extremo 3' del miARN y se puede cubrir por el cebador para PCR específico de miARN 5+5 Rp durante el procedimiento de qPCR. Por lo tanto, la discriminación de *let-7a* de *let-7x* se logró tanto durante tanto el procedimiento de RT como de qPCR. A diferencia de *let-7x*, el nucleótido emparejado erróneamente de *let-7c* quedó suspendido en el extremo 5' de *let-7c* y no existió ninguna selección de amplificación durante el procedimiento de qPCR como con *let-7x*. Además, la señal no específica alta relativa se podría deber a la reacción cruzada de G-T durante el procedimiento de RT. Desde este punto de vista, la especificidad de esta estrategia de cuantificación de miARN se podría potenciar significativamente después de la optimización de los cebadores para RT y qPCR.

40 Ejemplo 6: descripción esquemática de una estrategia alternativa para la cuantificación de miARN

En la FIG. 9 se muestra una representación esquemática ejemplar de una estructura alternativa del cebador en bucle, donde parte del bucle está plegado en una estructura de horquilla. El cebador contiene un elemento de reconocimiento hacia 5' (secuencia A), una secuencia de brazo hacia 5' (secuencia D), una horquilla con un tallo (secuencias E y G) y un bucle (secuencia F), una secuencia de brazo hacia 3' (secuencia H) y un elemento de reconocimiento hacia 3' (secuencia B). La horquilla estabiliza la estructura de bucle y secuestra la mayoría de las bases para que no interactúen con otros ácidos nucleicos en la muestra, reduciendo así el fondo. El diseño del tallo se puede ajustar para modificar las características del sistema. Un ejemplo de reducción de fondo por la introducción de una estructura de horquilla en el cebador en bucle se muestra en la FIG. 12.

Ejemplo 7: validación de la especificidad usando un cebador en bucle que comprende una horquilla

La FIG. 10 muestra los resultados de un análisis de la reactividad cruzada de siete ensayos en base a los cebadores en bucle indicados que seleccionan como diana los primeros cinco miembros de la familia de let 7 (*let7a-e*) medidos por RT y qPCR. Las secuencias de *hsa-let-7a-5p* a *hsa-let-7e-5p* se obtuvieron de miRBASE (www.mirbase.org/). Los cebadores para RT y qPCR usados se muestran en la FIG. 10 (parte A). Se diseñaron dos cebadores en bucle frente a cada uno de *let7b* y *let7c*.

Las reacciones de RT se realizaron usando el kit de síntesis de ADNc TATAA GrandScript® Flex en volúmenes de reacción de 10 μ l que contenían 12 pg de oligonucleótidos de miARN sintético y cebadores para RT 50 nM de acuerdo con la instrucción del fabricante. Para cada diana de miARN, se realizó un control de RT añadiendo agua libre de nucleasas en lugar de retrotranscriptasa. Las soluciones de reacción se incubaron en un instrumento Bio-Rad CFX96 a 31 °C durante 45 min, seguido de 85 °C durante 5 min y, a continuación, se conservaron a 4 °C.

Las qPCR se realizaron usando TATAA SYBR® GrandMaster® Mix en volúmenes de reacción de 10 μ l que contenían

5 cebadores 400 nM de acuerdo con las instrucciones del fabricante. El ADNc de la RT se diluyó 5 veces en agua libre de nucleasas y se añadieron 2 µl a cada qPCR, excepto para los NTC donde se añadió agua libre de nucleasas en lugar de ADNc. Las soluciones de reacción se incubaron en un instrumento Bio-Rad CFX384 a 95 °C durante 30 segundos, seguido de 45 ciclos de 95 °C durante 5 segundos, 60 °C durante 15 segundos y 72 °C durante 10 segundos y, a continuación, una curva de fusión de 65 °C a 95 °C en etapas de 0,5 °C/segundo. Todas las reacciones se efectuaron por duplicado.

10 Los valores de Cq obtenidos de las qPCR se muestran en la FIG. 10 (parte B) y las eficacias de detección relativas, calculadas por la fórmula $2^{-(Cq_{\text{inespecífico}} - Cq_{\text{específico}})}$, se muestran en la FIG. 10 (parte C). Los valores de Cq para las dianas perfectamente emparejadas varían sustancialmente, lo que se puede deber a variaciones en las concentraciones de molde y/o variación en la eficacia de los cebadores en bucle en el cebado de la retrotranscripción del ARN a ADNc. Las reactividades cruzadas estuvieron, con algunas excepciones, por debajo de un 2 %, aunque varias de las secuencias seleccionadas como diana difieren solo en una posición de base única. Uno de los cebadores en bucle diseñado para seleccionar como diana let7c mostró un 20,1 % de reactividad cruzada con Let7b, pero con el otro cebador en bucle para let7c la reactividad cruzada se redujo a un 1,3 %. También se observó una menor especificidad para uno de los cebadores en bucle diseñados para seleccionar como diana Let7b con un 12,4 % de reacción cruzada con Let7c. Sin embargo, el otro cebador en bucle para Let7b mostró una reactividad cruzada de solo un 1,6 %.

20 Ejemplo 8: validación de la eficacia del ensayo usando los cebadores en bucle con horquilla de la invención

La extensa gama de ensayos que usan cebadores en bucle con horquilla se ilustra en la FIG. 11. La cantidad de entrada de miARN *hsp-let-7a-5p* se varió de $2,5 \times 10^{10}$ - 250 copias/reacción de RT. Los ensayos muestran una excelente linealidad dentro del intervalo estudiado y la eficacia del sistema qPCR fue de aproximadamente un 86 %.

25 Las reacciones de RT se realizaron usando el kit de síntesis de ADNc TATAA GrandScript® Flex en volúmenes de reacción de 10 µl que contenían 10 µl de cebador para RT TACTACCTCAACTCCCTCGCGTTCGTTGTTTCGACCGCACTCCGTCAACTA 50 nM de acuerdo con la instrucción del fabricante. Se incluyó un control negativo de RT usando agua libre de nucleasas en lugar de retrotranscriptasa para medir la señal de fondo. Las soluciones de reacción se incubaron en un instrumento Bio-Rad CFX96 a 25 °C durante 45 min, seguido de 85 °C durante 5 min y, a continuación, se conservaron a 4 °C.

30 Las qPCR se realizaron usando TATAA SYBR® GrandMaster® Mix en volúmenes de reacción de 10 µl que contenían un cebador directo CCTCAACTCCCTCGCGTT y cebador inverso GCCCATGAGGTAGTAGGTTGTATA 400 nM de acuerdo con las instrucciones del fabricante. El ADNc de la RT se diluyó 4 veces en agua libre de nucleasas y se añadieron 2 µl a cada qPCR, excepto para los controles sin molde donde se añadió agua libre de nucleasas en lugar de ADNc. Las soluciones de reacción se incubaron en un instrumento Bio-Rad CFX384 a 95 °C durante 30 segundos, seguido de 45 ciclos de 95 °C durante 5 segundos, 60 °C durante 15 segundos y 72 °C durante 10 segundos y, a continuación, una curva de fusión de 65 °C a 95 °C en etapas de 0,5 °C/segundo. Todas las reacciones se efectuaron por duplicado.

40 Ejemplo 9: validación de la reducción de fondo usando un cebador en bucle que comprende una horquilla

45 El diseño de la horquilla en el cebador en bucle se alteró para someter a prueba el efecto sobre la señal de fondo. Se diseñaron cuatro cebadores en bucle con los mismos elementos de reconocimiento hacia 3' y hacia 5', pero con pequeñas variaciones en las secuencias de horquilla, de brazo y de bucle (FIG. 12). Los valores de Cq para las reacciones positivas son muy similares, variando de 16,07 (RT18) a 16,44 (RT19), lo que evidencia un efecto insignificante de las modificaciones sobre la eficacia. Los controles negativos, por otra parte, muestran una variación significativamente mayor, variando de un Cq de 34,86 para el cebador para RT10 a un Cq > 45 (no se observó ningún cruce cuando se efectuaron 45 ciclos) para RT18. Esto muestra que la señal de fondo de un ensayo se puede eliminar ajustando el diseño sin comprometer la señal positiva.

50 Las reacciones de RT se realizaron usando el kit de síntesis de ADNc TATAA GrandScript® Flex en volúmenes de reacción de 10 µl que contenían 12 pg de oligonucleótidos de miARN sintético y cebadores para RT 50 nM de acuerdo con la instrucción del fabricante. Para cada diana se realizó un control de RT añadiendo agua libre de nucleasas en lugar de retrotranscriptasa. Las soluciones de reacción se incubaron en un instrumento Bio-Rad CFX96 a 31 °C durante 45 min, seguido de 85 °C durante 5 min y, a continuación, se conservaron a 4 °C.

55 Las qPCR se realizaron usando TATAA SYBR® GrandMaster® Mix en volúmenes de reacción de 10 µl que contenían un cebador directo TCACCCACCACGTACGG y cebador inverso GCGGCTGAGGTAGTAGGTTGTA 400 nM de acuerdo con las instrucciones del fabricante. El ADNc de la RT se diluyó 4 veces en agua libre de nucleasas y se añadieron 2 µl a cada qPCR, excepto para los controles sin molde donde se añadió agua libre de nucleasas en lugar de ADNc. Las soluciones de reacción se incubaron en un instrumento Bio-Rad CFX384 a 95 °C durante 30 segundos, seguido de 45 ciclos de 95 °C durante 5 segundos, 60 °C durante 15 segundos y 72 °C durante 10 segundos y, a continuación, una curva de fusión de 65 °C a 95 °C en etapas de 0,5 °C/segundo. Todas las reacciones se efectuaron

por duplicado.

5 Aunque se han mostrado y descrito en el presente documento modos de realización preferentes de la presente invención, será obvio para los expertos en la técnica que dichos modos de realización se proporcionen solo a modo de ejemplo. A los expertos en la técnica se les ocurrirán ahora numerosas variaciones, cambios y sustituciones sin apartarse de la invención. Se debe entender que se pueden emplear diversas alternativas a los modos de realización de la invención descritos en el presente documento en la práctica de la invención.

REIVINDICACIONES

1. Un procedimiento para producir una secuencia complementaria a una región en un polinucleótido diana en una muestra, comprendiendo el procedimiento: someter la muestra a una reacción de amplificación de ácido nucleico en una mezcla de reacción en condiciones para proporcionar la secuencia completa con respecto a la región del polinucleótido diana, en el que la mezcla de reacción comprende:
- (a) un cebador en bucle que comprende una secuencia A, una secuencia de conector D y una secuencia B, orientadas desde 5' hacia 3' en una única hebra; en el que el cebador en bucle se hibrida específicamente al polinucleótido diana por medio de (i) complementariedad de secuencia entre la secuencia A del cebador en bucle y la secuencia A' en el polinucleótido diana, y (ii) complementariedad de secuencia entre la secuencia B del cebador en bucle y la secuencia B' en el polinucleótido diana, en el que la secuencia A' y la secuencia B' están orientadas desde 5' hacia 3' en el polinucleótido diana; y
- (b) una polimerasa que extiende la secuencia B del cebador en bucle desde 5' hacia 3' a lo largo del polinucleótido diana que sirve como molde para la extensión del cebador dirigida por molde para producir la secuencia complementaria del polinucleótido diana,
- en el que la secuencia de conector D comprende una estructura de horquilla.
2. El procedimiento de la reivindicación 1, que comprende además amplificar el producto de la reivindicación 1 en presencia de un cebador inverso y un cebador directo, en el que el cebador inverso se hibrida específicamente a una secuencia que es complementaria a una porción del polinucleótido diana que está en 5' con respecto a la secuencia A' o B' y el cebador directo se hibrida específicamente a una secuencia en la secuencia de conector D.
3. El procedimiento de la reivindicación 2, que comprende además detectar un producto de la amplificación de ácido nucleico, y en el que la etapa de detección comprende detectar una señal de una sonda en la mezcla de reacción que tiene complementariedad de secuencia con el producto.
4. El procedimiento de una cualquiera de las reivindicaciones 1 a 3, en el que la secuencia A tiene de 2 nt a 10 nt de longitud y la secuencia B tiene de 2 nt a 10 nt de longitud.
5. El procedimiento de una cualquiera de las reivindicaciones 1 a 4, en el que la longitud combinada de las secuencias A y B es de 5 nt a 20 nt.
6. El procedimiento de una cualquiera de las reivindicaciones 1 a 5, en el que una concatenación lineal de las secuencias B y A es al menos un 80 % complementaria a una concatenación lineal de las secuencias A' y B' cuando se alinean de forma óptima.
7. El procedimiento de una cualquiera de las reivindicaciones 1 a 6, en el que el extremo 3' de la secuencia A' está dentro de 1 nt a 5 nt de la secuencia B'.
8. El procedimiento de una cualquiera de las reivindicaciones 1 a 7, en el que el polinucleótido diana es una molécula de ARN no codificante y en el que la molécula de ARN no codificante se selecciona del grupo que consiste en: una molécula de microARN maduro, una molécula de pre-microARN, una molécula de microARN primario, una molécula de ARNip, una molécula de piARN, un piwiARN, un ARNncl, un ARNr y una molécula de ARNhc.
9. El procedimiento de una cualquiera de las reivindicaciones 1 a 8, en el que la secuencia de conector D comprende uno o más elementos de secuencia seleccionados del grupo que consiste en: una o más secuencias de código de barras; una o más secuencias de reconocimiento para enzimas de restricción; una o más secuencias de unión a sonda oligonucleotídica o complementos de las mismas; una o más secuencias de hibridación a cebador de secuenciación o complementos de las mismas; y una combinación de estas.
10. Un procedimiento para detectar la presencia en una muestra de un alelo minoritario que es una variante de secuencia que difiere de un alelo correspondiente más abundante en una posición de base única, comprendiendo el procedimiento: someter la muestra a una reacción de amplificación de ácido nucleico en una mezcla de reacción en condiciones para amplificar una región del alelo minoritario y el alelo más abundante que comprende la variante de secuencia usando un par de cebadores en bucle, en el que la mezcla de reacción comprende:
- (a) un primer cebador en bucle que comprende una secuencia A1, una secuencia de conector D1 y una secuencia B1, orientadas desde 5' hacia 3' en una única hebra; en el que el primer cebador en bucle se hibrida específicamente al alelo minoritario por medio de (i) complementariedad de secuencia entre la secuencia A1 del cebador en bucle y la secuencia A1' en el alelo minoritario, y (ii) complementariedad de secuencia entre la secuencia B1 del cebador en bucle y la secuencia B1' en el alelo minoritario, en el que la secuencia A1' y la secuencia B1' están orientadas desde 5' hacia 3' en el alelo minoritario;

- (b) un segundo cebador en bucle que comprende una secuencia A2, una secuencia de conector D2 y una secuencia B2, orientadas desde 5' hacia 3' en una única hebra; en el que el segundo cebador en bucle se hibrida específicamente al alelo más abundante por medio de (i) complementariedad de secuencia entre la secuencia A2 del cebador en bucle y la secuencia A2' en el alelo más abundante, y (ii) complementariedad de secuencia entre la secuencia B2 del cebador en bucle y la secuencia B2' en el alelo más abundante, en el que la secuencia A2' y la secuencia B2' están orientadas desde 5' hacia 3' en el alelo más abundante; y
- (c) una polimerasa que extiende la secuencia B1 y la secuencia B2 de los primer y segundo cebadores en bucle desde 5' hacia 3' a lo largo del alelo respectivo que sirve como molde para la extensión del cebador dirigida por molde para producir la secuencia complementaria de los alelos respectivos,
- en el que las secuencias de conector D1 y D2 comprenden cada una una estructura de horquilla.
11. Una composición para producir una secuencia complementaria a una región en un polinucleótido diana en una muestra, comprendiendo la composición un cebador en bucle, un cebador directo y un cebador inverso, en la que:
- (a) el cebador en bucle comprende una secuencia A, una secuencia de conector D y una secuencia B, orientadas desde 5' hacia 3' en una única hebra; en la que el cebador en bucle se hibrida específicamente al polinucleótido diana por medio de (i) complementariedad de secuencia entre la secuencia A y la secuencia A' en el polinucleótido diana, y (ii) complementariedad de secuencia entre la secuencia B y la secuencia B' en el polinucleótido diana, en la que la secuencia A' y la secuencia B' están orientadas desde 5' hacia 3' en el polinucleótido diana;
- (b) el cebador inverso presenta homología de secuencia con una secuencia en el polinucleótido diana localizada en 5' con respecto a la secuencia A'; y
- (c) el cebador directo se hibrida específicamente a una secuencia en la secuencia de conector,
- en la que la secuencia de conector D comprende una estructura de horquilla.
12. La composición de la reivindicación 11, que comprende además una sonda de detección que tiene complementariedad de secuencia con la secuencia complementaria del polinucleótido diana producido por extensión del cebador inverso o del cebador directo.
13. La composición de una cualquiera de las reivindicaciones 11 a 12, en la que la composición está en forma deshidratada.
14. Una mezcla de reacción para producir una secuencia complementaria a una región en un polinucleótido diana en una muestra, comprendiendo la mezcla de reacción un cebador en bucle, un cebador directo, un cebador inverso y una polimerasa, en la que:
- (a) el cebador en bucle comprende una secuencia A, una secuencia de conector D y una secuencia B, orientadas desde 5' hacia 3' en una única hebra; en la que el cebador en bucle se hibrida específicamente al polinucleótido diana por medio de (i) complementariedad de secuencia entre la secuencia A y la secuencia A' en el polinucleótido diana, y (ii) complementariedad de secuencia entre la secuencia B y la secuencia B' en el polinucleótido diana, en la que la secuencia A' y la secuencia B' están orientadas desde 5' hacia 3' en el polinucleótido diana;
- (b) el cebador inverso presenta homología de secuencia con una secuencia en el polinucleótido diana localizada en 5' con respecto a la secuencia A'; y
- (c) el cebador directo se hibrida específicamente a una secuencia en la secuencia de conector,
- en la que la secuencia de conector D comprende una estructura de horquilla.
15. La mezcla de reacción de la reivindicación 14, que comprende además una sonda de detección que tiene complementariedad de secuencia con la secuencia complementaria del polinucleótido diana producido por extensión del cebador inverso o del cebador directo.
16. La mezcla de reacción de una cualquiera de las reivindicaciones 14 a 15, en la que la mezcla de reacción está en forma deshidratada.

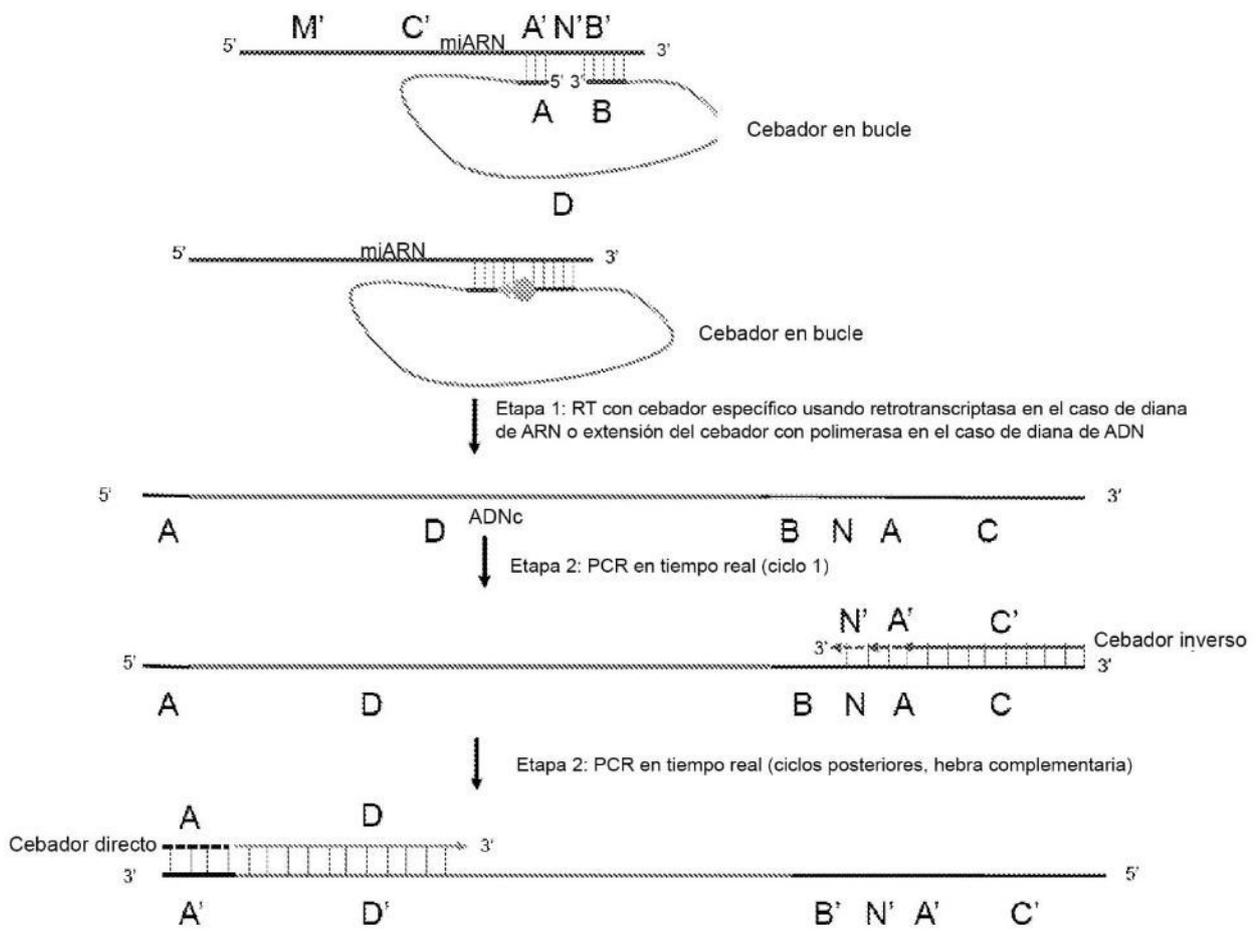


FIG. 1

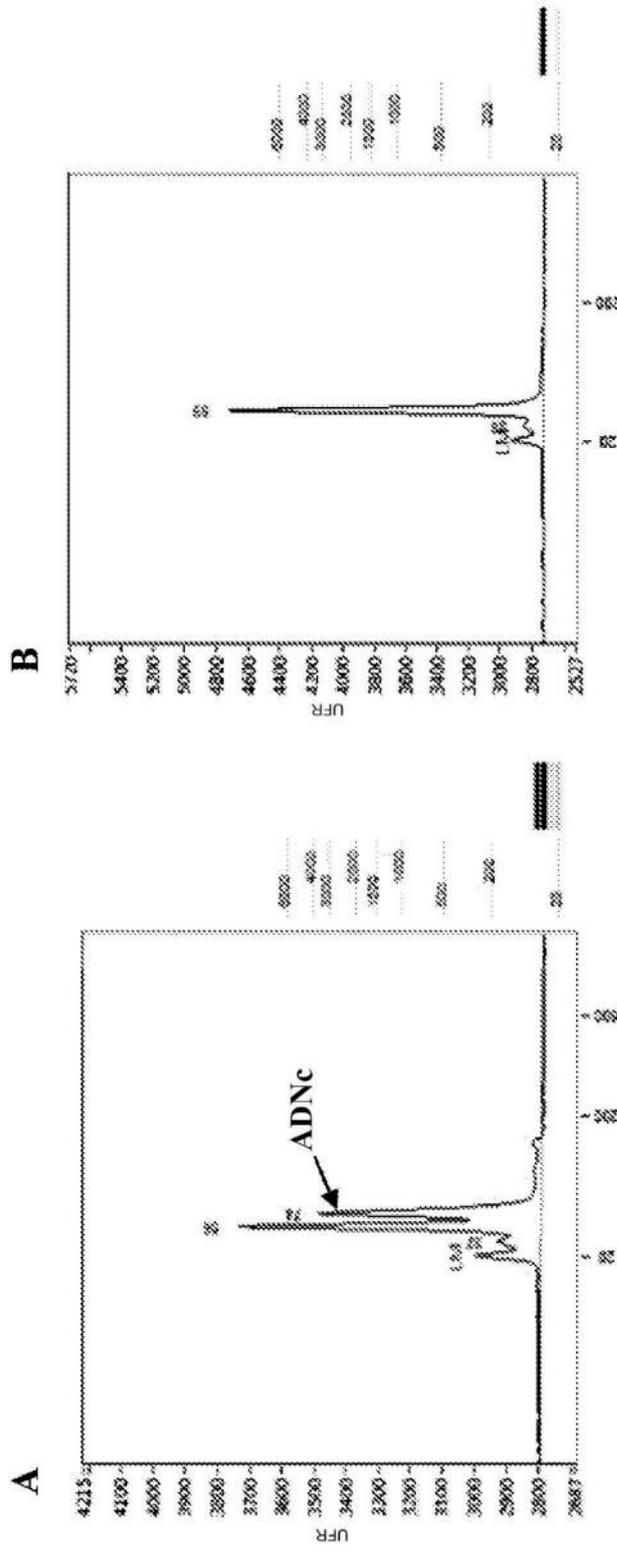


FIG. 2

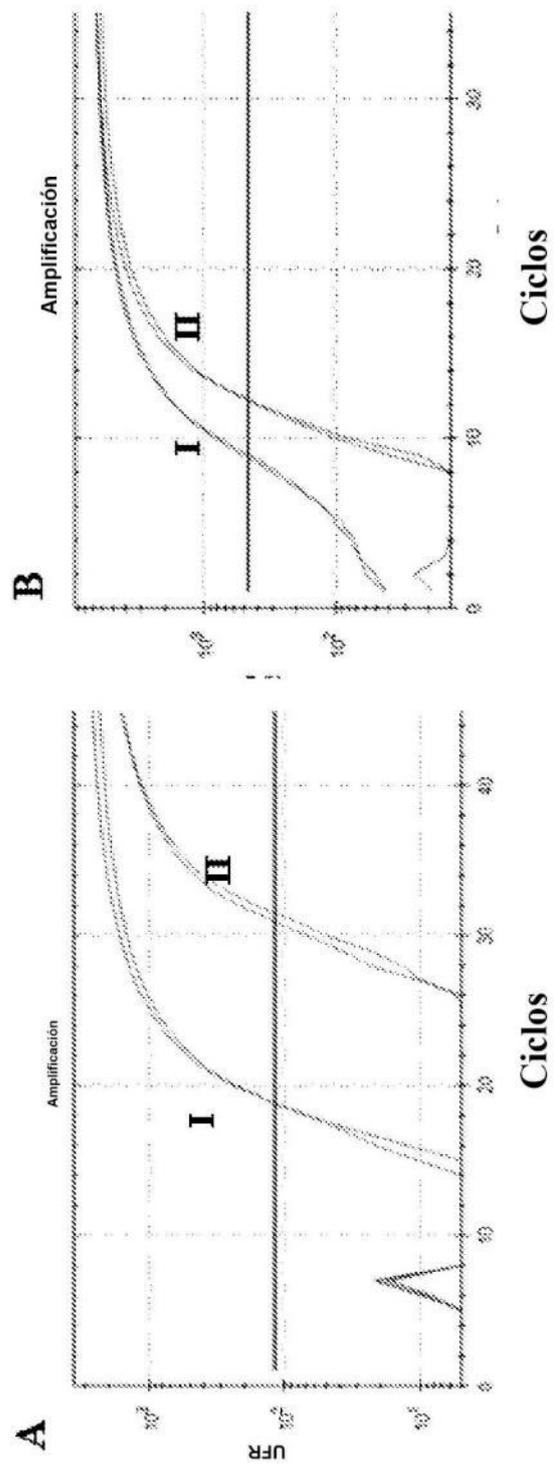


FIG. 3

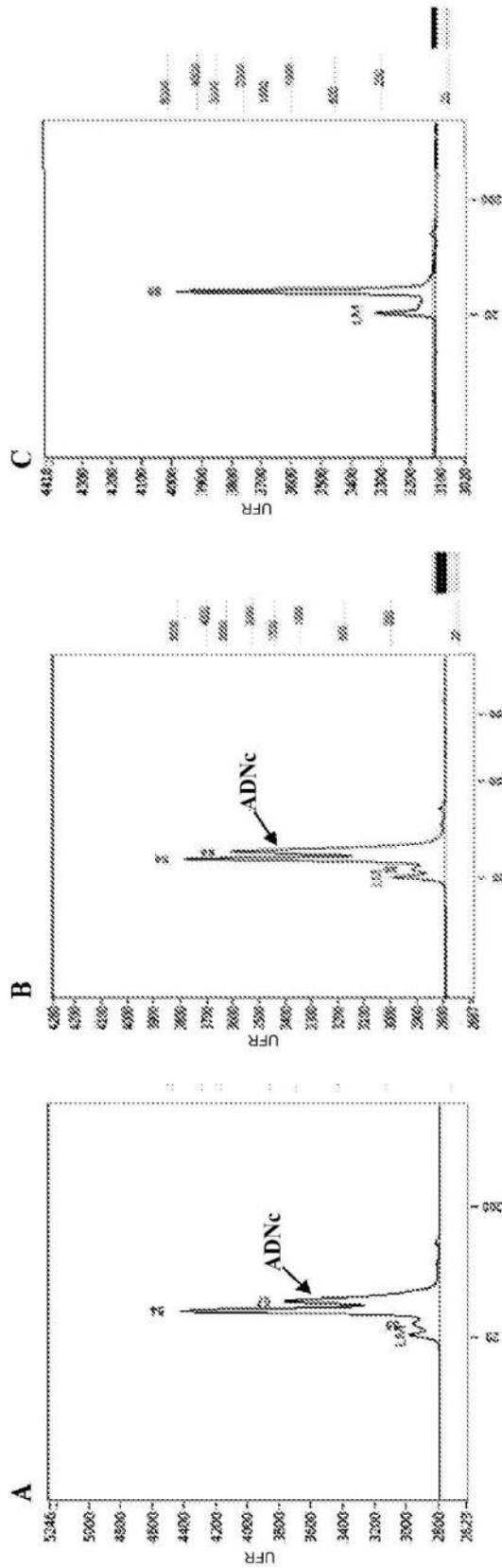


FIG. 4

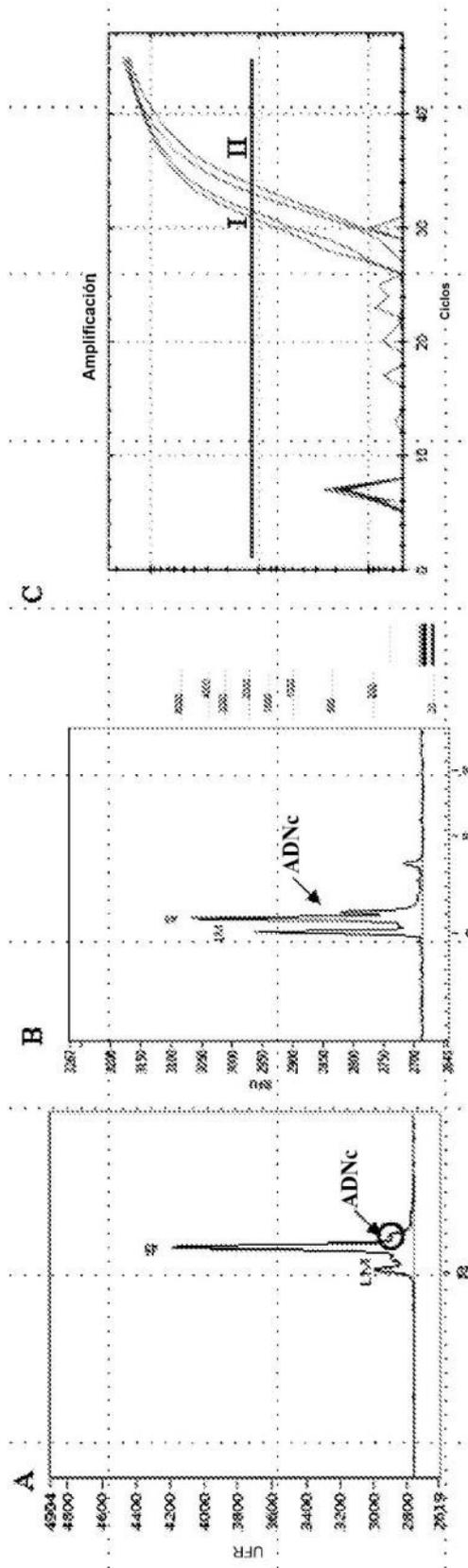


FIG. 5

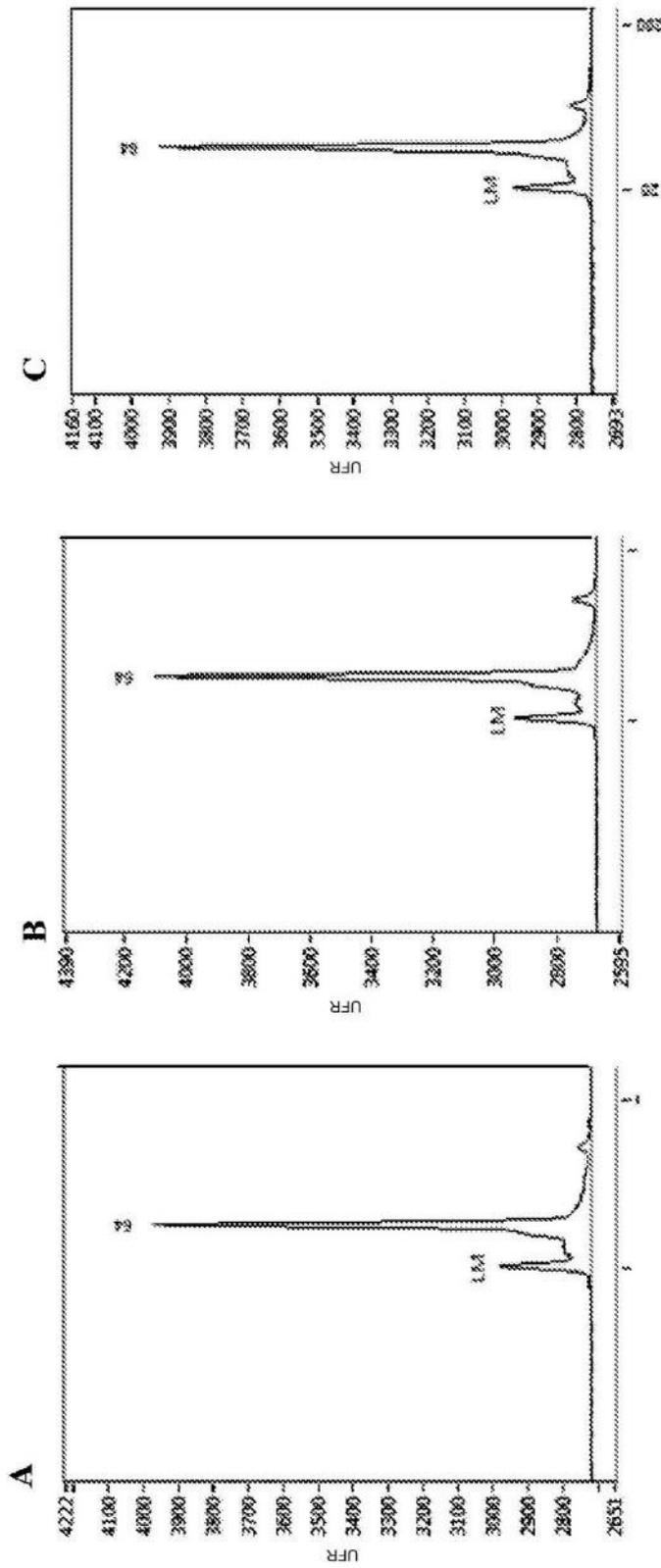


FIG. 6

	Diana de miARN sintético		
	let-7a	let-7c	let-7x
Valor de Cq	20,985	23,18	27,06
Detección relativa (%)	100	21,8	1,48

FIG. 7

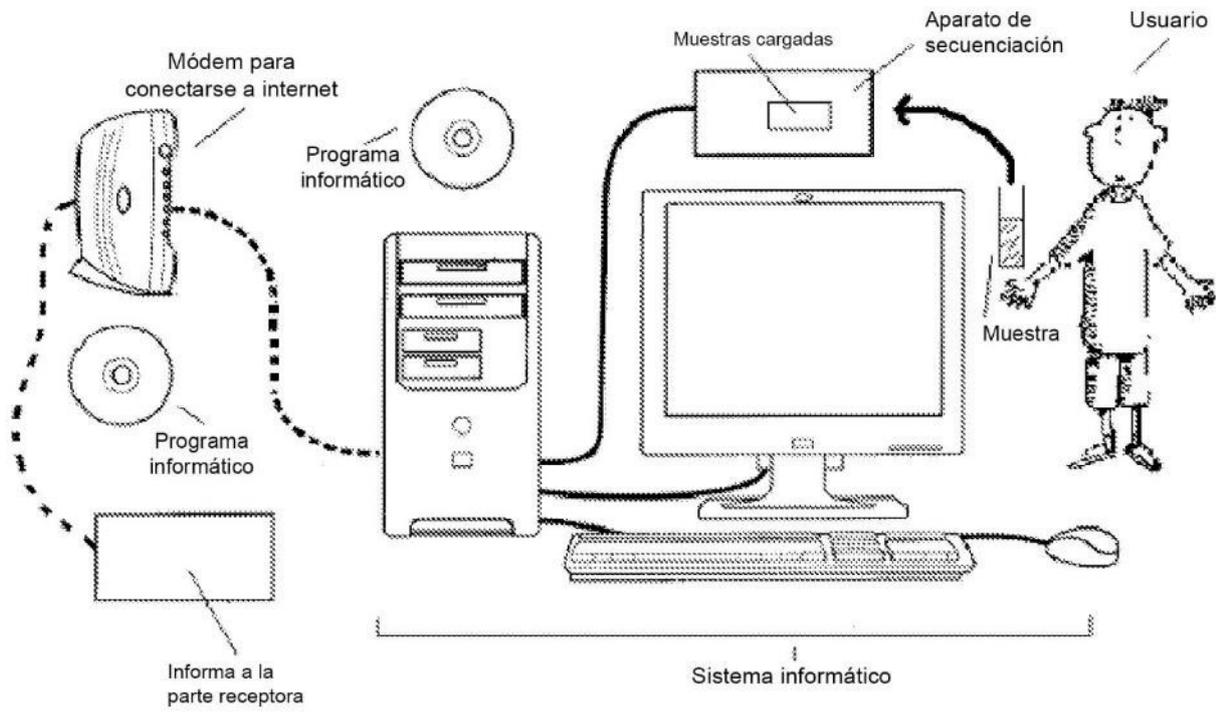


FIG. 8

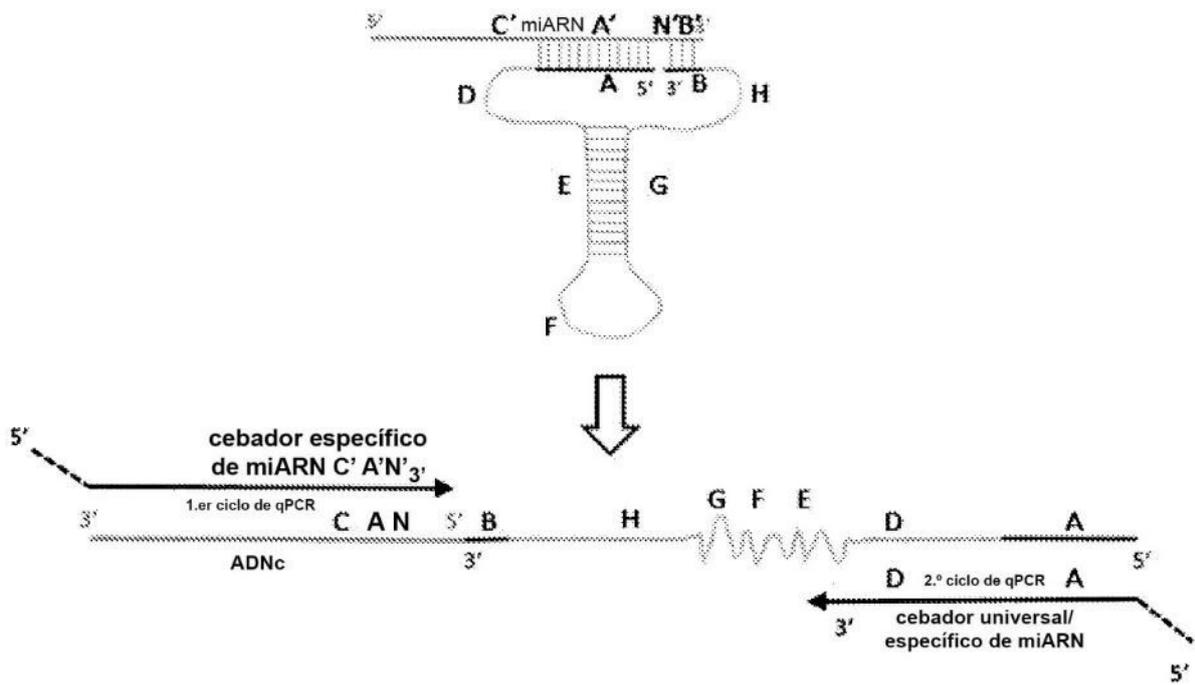


FIG. 9

A

Diana	Secuencia de Let 7	Cebador en bucle para RT	Cebador para qPCR directo	Cebador para qPCR inverso
let-7a	UGAGGUAGUAGGU UGUAUAGUU	TACTACCTCACCCACCCACGLACGGCTAGA AGACGTACCACTCTGCAAACTA	TACTACCTCA CCCACCAG	GCGGCTGAGGTAG TAGGTTGTATA
let-7b	UGAGGUAGUAGGU UGUGUGGUU	TACTACCTCACCCACCCACGLACGGCTAGA AGACGTACCACTCTGCAAAACCAC	TACTACCTCA CCCACCAG	GCGGCTGAGGTAGT AGGTTGTG
let-7b	UGAGGUAGUAGGU UGUGUGGUU	TACTACCTCACCCACCCACGLACGGCTAGA AGACGTACCACTCTGCAAAACC	TACTACCTCA CCCACCAG	GCGGCTGAGGTAGT AGGTTGTG
let-7c	UGAGGUAGUAGGU UGUAUUGGUU	TACTACCTCACCCACCCACGLACGGCTAGA AGACGTACCACTCTGCAAAACCA	TACTACCTCA CCCACCAG	GCGGCTGAGGTAG TAGGTTGTATA
let-7c	UGAGGUAGUAGGU UGUAUUGGUU	TACTACCTCACCCACCCACGLACGGCTAGA AGACGTACCACTCTGCAAAACCAI	TACTACCTCA CCCACCAG	GCGGCTGAGGTAGT AGGTTGTATG
let-7d	AGAGGUAGUAGGU UGCAUAGU-	TACTACCTCTCCCACCCACGLACGGCTAGA AGACGTACCACTCTGCAACTATG	TACTACCTCTC CCACCAG	CGGCAGAGGTAGT AGGTTGC
let-7e	UGAGGUAGGAGGU UGUAUAGU-	TCTTACCTCACCCACCCACGLACGGCTAGA AGACGTACCACTCTGCAACTATA	TCTTACCTCAC CCACCAC	GCGGCTGAGGTAG GAGG

B

	A	B	C	D	E	RT-	NTC
RT10a	16,20	22,90	22,10	26,31	29,44	37,19	
RT10b.1	28,70	11,31	14,36	29,80	35,77	38,30	39,45
RT10b.2	28,50	20,03	26,01	32,08	34,93	44,39	
RT10c.1	21,27	20,23	13,94	22,84	31,24	39,38	44,63
RT10c.2	16,09	12,41	10,09	25,91	31,11	36,35	39,13
RT10d	13,50	17,70	15,66	10,24	25,89	32,19	37,46
RT10e	27,19	29,74	28,07	29,78	17,19	30,96	30,37

C

	A	B	C	D	E
RT10a	100,0 %	1,0 %	1,7 %	0,1 %	0,0 %
RT10b.1	0,0 %	100,0 %	12,1 %	0,0 %	0,0 %
RT10b.2	0,3 %	100,0 %	1,6 %	0,0 %	0,0 %
RT10c.1	0,6 %	1,3 %	100,0 %	0,2 %	0,0 %
RT10c.2	1,6 %	20,1 %	100,0 %	0,0 %	0,0 %
RT10d	10,4 %	0,6 %	2,3 %	100,0 %	0,0 %
RT10e	0,1 %	0,0 %	0,1 %	0,0 %	100,0 %

FIG. 10

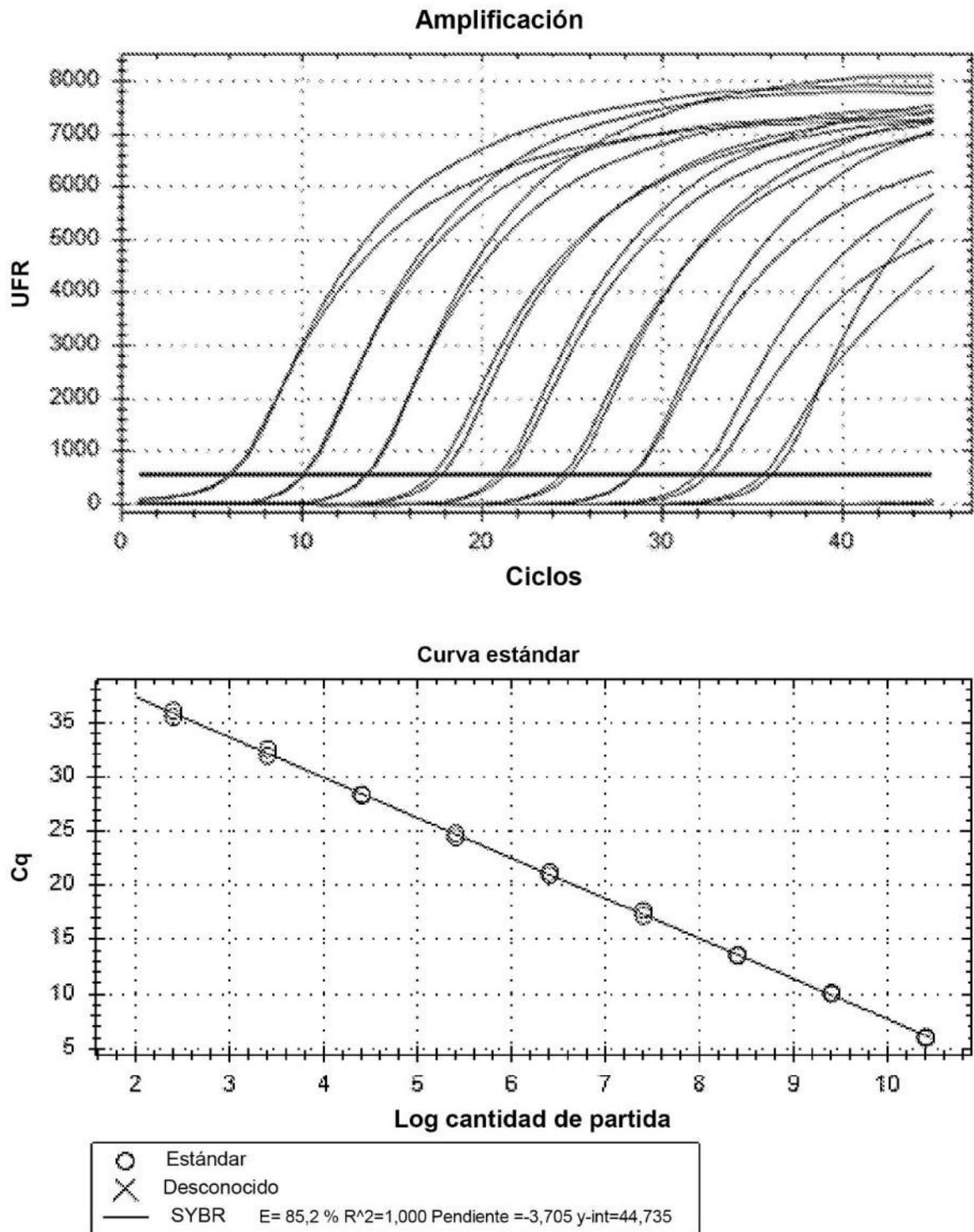


FIG. 11

ID de reacción	Secuencia de cebador en bucle	Diana	Cq promedio
RT10	TACTACCTCACCCACCACGTACGGCTAGAAGAC GTACCATCTGCAAATA	Let7a	16,12
		Ctrl neg.	34,86
RT18	TACTACCTCAACTCCCTCGCGTTCGTTGTTTCGAC CGCACTCCGTCAAATA	Let7a	16,07
		Ctrl neg.	
RT19	TACTACCTCAACTCCTTCCCGTTCGTTGTTTCGACC GGACTCCGTTAATA	Let7a	16,44
		Ctrl neg.	37,57
RT20	TACTACCTCAACTCCTTCTCGGTTTCGTTGTTTCGAC CCGACTCCGTTAATA	Let7a	16,29
		Ctrl neg.	39,41

FIG. 12

parámetro sometido a prueba	grupo	RT	característica	cebador para qPCR para pruebas
longitud de secuencia complementaria hacia 3'	C	RT11	10-8-61,1 (19)-14-5	7a_fw7.3 + 7a_rv9
		RT12	10-8-61,1 (19)-14-4	7a_fw7.3 + 7a_rv9
		RT13	10-8-61,1 (19)-14-3	7a_fw7.3 + 7a_rv9

Muestra	Contenido	RT11	DE	Tf	RT12	DE	Tf	RT13	DE	Tf
55,0	ADNc	26,38	0,08	78,50	23,28	0,26	78,50	22,24	0,08	79,00
	RT-	29,81	0,88	78,00	33,08	0,07	78,00	31,07	1,40	77,75
49,2	ADNc	21,51	0,65	78,75	28,95	0,35	78,75	24,66	0,53	79,25
	RT-	29,31	0,22	78,00	33,90	0,18	78,00	31,99	2,07	77,75
41,5	ADNc	22,36	0,38	78,50	29,01	0,14	78,75	24,97	0,22	79,25
	RT-	29,89	0,22	78,00	32,91	0,15	78,00	31,28	0,52	78,00
37,0	ADNc	18,69	0,42	78,75	26,34	0,14	79,00	23,38	0,17	79,25
	RT-	30,48	0,40	78,00	34,13	0,58	77,50	32,21	0,12	78,00
31,0	ADNc	18,75	0,40	78,50	23,89	0,23	79,00	22,42	0,14	79,25
	RT-	30,22	0,61	78,00	33,38	0,19	77,75	31,32	0,15	78,00
	NTC	38,90	0,59		36,90	0,59		36,90	0,59	

FIG. 13

RT	secuencia (5'-3')	pb	% de GC	horquilla
RT10	TACTACCTCACCACCCACGTCACGGCTAGAAAGACGTCACCAATCTGCAAACTA	50	50,0	ok
RT10.1	CTACCTCACCACCCACGTCACGGCTAGAAAGACGTCACCAATCTGCAAACTA	48	52,1	ok
RT10.2	CCTCACCACCCACGTCACGGCTAGAAAGACGTCACCAATCTGCAAACTA	45	53,3	ok
RT10.3	CTCACCACCCACGTCACGGCTAGAAAGACGTCACCAATCTGCAAACTA	44	52,3	ok
RT10.4	TCACCACCCACGTCACGGCTAGAAAGACGTCACCAATCTGCAAACTA	43	51,2	ok
RT10.5	TACTACCTCACCACCCACGTCACGGCTAGAAAGACGTCACCAATCTGCAAACTAT	51	49,0	ok
RT10.6	TACTACCTCACCACCCACGTCACGGCTAGAAAGACGTCACCAATCTGCAAACTATA	52	48,1	ok

Muestra	Contenido	PROM.	DE	Tf
RT10.0	Desco.	16,92	0,03	77,00
	Ctrl neg.	32,22	0,50	76,50
RT10.1	Desco.	18,89	0,43	77,00
	Ctrl neg.	30,48	0,59	76,50
RT10.2	Desco.	25,41	0,19	76,50
	Ctrl neg.	30,60	0,40	76,50
RT10.3	Desco.	26,66	0,26	76,50
	Ctrl neg.	31,85	0,35	75,75
RT10.4	Desco.	27,19	0,90	76,50
	Ctrl neg.	33,12	0,71	76,50
RT10.5	Desco.	14,14	0,02	77,00
	Ctrl neg.	32,37	0,46	76,75
RT10.6	Desco.	14,26	0,00	77,00
	Ctrl neg.	31,49	0,13	76,50

FIG. 14

parámetro de pruebas	variante	secuencia (5'-3')	longitud (pb)	GC en brazo hacia 5' (%)
longitud de brazo	X	CAACCTGGCCACACCGGAC~ ~TCTGCTCAACTA	12+7	66,7
	Y	CAACCTGGGAGACTCTACAT~ ~GTACTGCTCAACTA	15+10	46,7
	Z	CAACCTGGGAGACTCTACATGA~ ~GTACTGCTCAATGAACTA	17+14	47,1

Muestra	Contenido	RT5	DE	Tf	RT2	DE	Tf	DE	Tf	RT6	DE	Tf
55,0	ADNc	24,23	0,45	78,00	22,99	0,10	76,50	0,42	76,50	24,38	0,42	76,50
	RT-	34,35	0,20	78,50	36,37	0,95	70,50	#DIV/0!	#DIV/0!	34,87	#DIV/0!	#DIV/0!
49,2	ADNc	23,83	1,08	78,00	22,95	1,92	76,75	1,94	76,50	25,55	1,94	76,50
	RT-	32,94	0,31	78,50	34,40	1,34	70,00	1,88	70,00	35,73	1,88	69,50
41,5	ADNc	24,18	0,07	78,00	23,01	0,18	76,50	0,04	76,50	28,12	0,04	76,50
	RT-	32,78	0,69	78,50	35,26	0,10	70,00	0,76	70,00	37,33	0,76	#DIV/0!
37,0	ADNc	24,14	0,04	78,00	21,77	0,39	76,50	2,03	76,50	26,48	2,03	76,75
	RT-	34,79	2,12	78,50	35,72	0,77	70,00	0,42	70,00	38,97	0,42	70,00
31,0	ADNc	24,89	0,13	78,00	21,91	0,37	77,00	0,14	77,00	24,74	0,14	76,75
	RT-	35,14	0,47	78,50	37,48	0,40	70,50	#DIV/0!	70,50	38,37	#DIV/0!	70,25
	NTC				39,55		69,50		69,50	39,43		

FIG. 15

RT	dir.	inv.
RT10.m1	7a_fw7.2.m1	7a_rv7
RT10b.1	7a_fw7.2	7b_rv1
RT10b.2	7a_fw7.2	7b_rv1
RT10c.1	7a_fw7.2	7a_rv9
RT10c.2	7a_fw7.2	7c_rv2
RT10d.1	7d_fw1	7d_rv1
RT10e.1	7e_fw1	7e_rv1

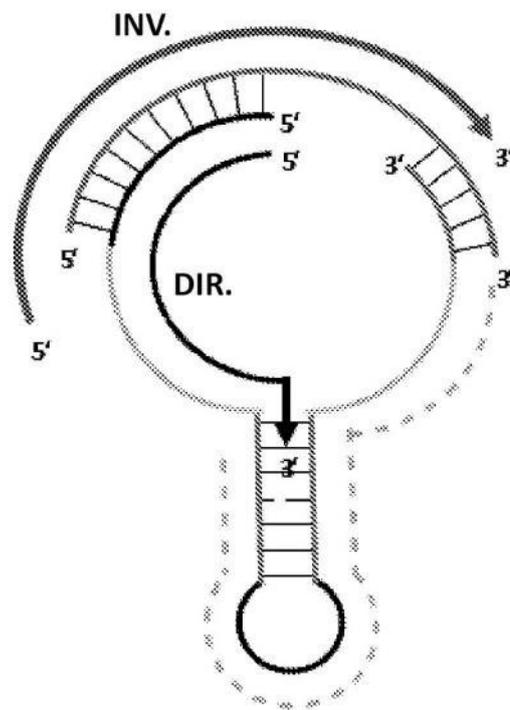


FIG. 16A

Diana	Conc. de oligo. (nM)	PROM. de Cq	DE de Cq
RT 10d.1	1000	34,25	0,39
	500	31,83	0,23
	100	29,88	0,15
	50	29,60	0,14
	10	29,34	0,18
	1	29,26	0,06
	0,1	29,22	0,06
	0,01	29,33	0,10
	0	29,08	0,07

Diana	Muestra	PROM. de Cq	DE de Cq
RT 10d.1	4000	44,93	
	3000		
	2000	43,94	1,14
	1500	40,87	0,13
	1000	35,15	1,05
	500	31,64	0,11
	100	29,58	0,05
	50	29,19	0,06
	0	28,34	0,13
	NTC		36,05

Diana	Muestra	PROM. de Cq	DE de Cq
ADNc	3000	11,37	0,19
	2000	11,29	0,14
	1500	11,27	0,11
	1000	10,98	0,31
	0	10,84	0,40
RT-	3000	#DIV/0!	#DIV/0!
	2000	40,29	0,58
	1500	36,05	0,39
	1000	34,25	0,49
	0	30,17	0,13
NTC	3000	40,64	0,03
	2000	37,14	1,09
	1500	38,00	0,07
	1000	39,82	0,70
	0	36,29	0,76

FIG. 16B

Muestra	Contenido	RT2		RT10		RT11	
		PROM. de RT	DE de RT	PROM. de RT	DE de RT	PROM. de RT	DE de RT
500	ADNc	23,69	0,04	15,80	0,16	16,21	0,09
	RT-	31,04		30,79		33,78	
250	ADNc	22,36	0,38	15,04	0,18	15,42	0,11
	RT-	35,34		30,84		33,67	
100	ADNc	21,77	0,60	14,50	0,02	15,06	0,12
	RT-	34,48		31,32		33,99	
50	ADNc	21,72	0,29	14,62	0,08	14,99	0,22
	RT-	37,99		32,23		35,41	
10	ADNc	23,35	0,00	15,53	0,09	15,18	0,11
	RT-	37,12		38,49		36,40	

	RT10		RT10/ 16		
31 °C	15,00	0,05	15,28	0,10	CFX96 1. ^a tanda
28 °C	14,43	0,12	14,80	0,18	CFX96 2. ^a tanda
25 °C	14,04	0,07	14,27	0,08	T100 1. ^a tanda
20 °C	13,59	0,20	14,00	0,12	T100 2. ^a tanda

FIG. 17A

	Replicado	PROM.	DE	PROM.	DE
RT10st	1	14,10	0,06	14,09	0,15
	2	13,96	0,21		
	3	14,00	0,15		
	4	14,29	0,17		
RTpage	1	13,91	0,15	13,95	0,15
	2	14,12	0,41		
	3	13,76	0,26		
	4	14,02	0,10		
RT10st frente a RT10page			Valor de P= 0,26		

	Duración de la incubación en RT a 25 °C (min)				
replicado	15	30	45	60	75
1	15,18	14,93	14,88	14,40	14,64
2	14,77	14,67	14,30	14,29	14,36
3	14,79	14,52	14,30	14,60	14,34
PROM.	14,91	14,71	14,49	14,43	14,45
DE	0,23	0,21	0,34	0,16	0,17

FIG. 17B