

MÉTODOS Y COMPOSICIONES PARA DETECTAR TUBERCULOSIS ACTIVA

CAMPO TÉCNICO

[001] La presente invención se encuentra dirigida al campo de las pruebas moleculares para la detección de tuberculosis activa, y, en particular, a métodos para el diagnóstico de infecciones por *Mycobacterium tuberculosis* por medio de la detección de un ARN no codificante en una muestra biológica, de esputo, suero u orina. Además, la presente solicitud proporciona composiciones y kits para llevar a cabo dichos métodos.

ANTECEDENTES DE LA INVENCION

[002] La tuberculosis (Tb) es causada por la bacteria *Mycobacterium tuberculosis* (Mtb) es uno de los agentes infecciosos de mayor patogenicidad a nivel mundial, logrando infectar a cerca de un cuarto de la población global, y siendo, hasta el inicio de la pandemia por coronavirus, la principal causa de muerte causada por un único agente infeccioso, es decir, estando por encima de VIH/SIDA. Sin embargo, alrededor del 85% de los pacientes que acceden a las metodologías actualmente aprobadas de tratamiento con antibióticos logran recuperarse (Reporte Global sobre la Tuberculosis, OMS, 2022).

[003] No todos los individuos infectados desarrollan síntomas, y muchos de ellos logran eliminar la infección sin ayuda de agentes terapéuticos. De hecho, la mayoría de la población contagiada desarrolla una infección latente o inactiva (ausente de síntomas de la enfermedad), que no puede ser transmitida a otros individuos. Por otra parte, los pacientes con tuberculosis activa presentan síntomas (tos persistente, dolor en el pecho, pérdida de peso, fatiga, fiebre, entre otros), que pueden desarrollarse semanas o años después de adquirir la infección; estos pacientes pueden transmitir la infección a otras personas.

[004] Actualmente, el diagnóstico de la tuberculosis se realiza por medio de un grupo variado de técnicas. Entre otras, el diagnóstico de tuberculosis puede llevarse a cabo por medio de pruebas cutáneas, análisis de sangre en donde se mide la respuesta inmune contra Mtb, pruebas de microscopia empleando métodos de tinción específicos, o cultivos bacterianos a partir de pruebas de esputo. Sin embargo, estas técnicas usualmente requieren equipos, reactivos y personal especializado, pueden dar lugar a falsos positivos por reacción cruzada en pacientes inmunizados o resultados imprecisos en pacientes con infecciones por otros patógenos (VIH/SIDA). Otras dificultades comunes incluyen, por ejemplo, largos tiempos requeridos para obtener resultados en las pruebas basadas en cultivos bacterianos, así como los problemas relacionados con garantizar que la recolección, el almacenamiento y el transporte de las muestras de esputo se de en las condiciones necesarias para hacer que dichas muestras sean aptas para los análisis posteriores.

[005] La dificultad en lograr un diagnóstico preciso de la enfermedad impide el acceso a un tratamiento oportuno, lo cual, a su vez, repercute en el aumento de las tasas de transmisión por parte del paciente afectado al resto de la población. Además, los retrasos en el diagnóstico de la enfermedad se relacionan también con la aparición y consecuente transmisión de cepas resistentes a los agentes antituberculosos comúnmente empleados, tales como rifampicina e isoniazida, dificultando aún más el control de la enfermedad.

[006] Debido a lo anterior, las investigaciones recientes se han centrado en proporcionar herramientas que permitan el diagnóstico temprano de la infección activa, que tengan una sensibilidad y especificidad adecuada, así como también a la búsqueda de alternativas que permitan realizar el diagnóstico de manera inmediata en el punto en donde se atiende al paciente (POCT, Point-of-care-test).

[007] Ejemplos de algunos métodos de detección en el sitio de tratamiento se han descrito en documentos como *Detection and Quantification of HspX Antigenin Sputum Samples Using Plasmonic Biosensing: Toward a Real Point-*

*of-Care (POC) for Tuberculosis Diagnosis*¹, que divulga un dispositivo que permite la detección de la proteína HspX de Mtb en muestras de esputo. Para ello, el documento proporciona biosensor portátil de resonancia plasmón de superficie (SPR).

[008] Por otra parte, también se han proporcionado diversas metodologías para lograr el diagnóstico de la enfermedad activa basadas en la evaluación del nivel de biomarcadores en muestras diferentes a esputo, tales como orina, plasma, suero, o líquido cefalorraquídeo.

[009] Recientemente, gracias al desarrollo tecnológico de la secuencia de ARN (RNAseq), se ha incrementado significativamente el hallazgo de sRNAs de Mtb. El análisis del transcriptoma de Mtb permitió encontrar que cerca del 2% del transcriptoma es no codificante en fase exponencial de crecimiento *in vitro* y aumenta al 3% en la fase estacionaria, encontrando, además, que el sRNA más expresado fue el MTS2823 que se encuentra en la región intergénica entre los genes Rv3161 y Rv3262c². Hallazgos posteriores han permitido sugerir que los sRNAs juegan un papel importante en la regulación génica e influyen en la patogénesis de Mtb³. Estos estudios pusieron en evidencia el papel de los ARN pequeños o ARN no codificantes en el metabolismo de Mtb, y orientaron la investigación hacia el uso de dichas moléculas como biomarcadores de la infección.

[010] Este enfoque ha sido utilizado en diversos documentos, tales como se puede observar en publicaciones como *Detection of mycobacterial small RNA in the bacterial culture supernatant and plasma of patients with active tuberculosis*⁴, y en solicitudes de patente como US 10526665 B2 y EP 2351857. Además, el documento *Screening of 20 Mycobacterium tuberculosis sRNAs in plasma for detection of active pulmonary tuberculosis*⁵ y la solicitud de patente CN110093432 divulgan la medición de biomarcadores de ARNs en plasma para la detección de tuberculosis activa y la diferenciación del bacilo de la tuberculosis de la vacuna de BCG (bacilo de Calmette-Guérin), respectivamente.

[011] No obstante, persiste la necesidad de desarrollar métodos y kits capaces de llevar a cabo el diagnóstico de la tuberculosis activa de manera rápida a partir de muestras distintas al esputo, que cuenten con una alta especificidad y sensibilidad para detectar las variantes resistentes y que sean de fácil acceso y aplicación.

BREVE DESCRIPCIÓN DE LA INVENCION

[012] La presente invención se refiere a métodos dirigidos a la detección de la tuberculosis, así como también a las composiciones y kits empleados para dichos métodos. En particular, los métodos, composiciones y kits de acuerdo con la invención se basan en la detección de un ARN pequeño o ARN no codificante (sRNA por sus siglas en inglés) denominado MTS2823 en muestras de fluidos biológicos.

[013] En modalidades particulares, los métodos, composiciones y kits de acuerdo con la invención son útiles para detectar individuos infectados con tuberculosis a partir de muestras biológicas, tales como esputo, sangre, plasma, jugo gástrico, líquido pleural, líquido cefalorraquídeo, heces, u orina. En aun otras modalidades, los métodos y kits de acuerdo con la presente invención permiten monitorear la respuesta a tratamiento en pacientes previamente diagnosticado con Mtb.

[014] En una primera modalidad, la detección del ARN se hace por medio de RT-qPCR (transcripción reversa seguida de PCR en tiempo real o PCR cuantitativa). En otras modalidades, la detección del ARN se hace mediante técnicas de hibridación en membranas de nitrocelulosa.

[015] En ciertas modalidades, la invención proporciona kits para detectar la presencia de Mtb en una muestra clínica humana, que comprenden cebadores y sondas dirigidos a la detección de ARN pequeños seleccionados, preferiblemente MTS2823. En modalidades particulares, el kit comprende cebadores y sondas dirigidas al sRNA MTS2823.

[016] En ciertas modalidades la invención proporciona composiciones que comprenden oligonucleótidos útiles para detectar la presencia de tuberculosis por medio de pruebas moleculares, tales como PCR, RT-qPCR e hibridación. Específicamente, la invención proporciona composiciones que comprenden cebadores y sondas dirigidas específicamente a genes de Mtb. Preferiblemente, la invención proporciona composiciones que comprenden parejas de cebadores directos y reversos, y sondas dirigidas al gene MTS2823. En modalidades preferidas, las sondas empleadas en el método de la invención poseen, en uno de sus extremos restos fluorescentes, preferiblemente FAM, y en el otro, restos de apagado, preferiblemente BHQ1.

[017] En una modalidad preferida de la invención, el método de la invención incluye un paso de tratamiento con una composición de inducción previo a la fase de detección del ARN no codificante. Asimismo, en modalidades preferidas, la invención se refiere a una composición de inducción, en modalidades aún más preferidas, los kits de la invención incluyen una composición de inducción. De manera preferente, la composición de inducción de la presente invención comprende una mezcla de sales de ácidos grasos de cadena larga, preferiblemente sales de ácido palmítico, esteárico y oleico, más preferiblemente, palmitato de sodio, estearato de sodio y oleato de sodio.

[018] En modalidades particularmente preferidas, los kits de la invención comprenden, además, uno o más soluciones amortiguadoras (Tris-HCl); enzimas (TaqDNA polimerasa, y Transcriptasa Reversa); y otros reactivos necesarios para llevar a cabo el análisis por transcripción inversa seguida por PCR cuantitativa, tales como dNTPs (deoxinucleosidos trifosfato) y cofactores enzimáticos (magnesio). En modalidades preferidas, el kit incluye, además, un control positivo.

[019] En otras modalidades, los kits de la invención incluyen soportes o membranas de nitrocelulosa aptas para la detección por hibridación inversa de uno o más ARN no codificantes. En modalidades preferidas la invención

P-2023/6086

proporciona una sonda de captura fijada sobre membranas de nitrocelulosa y una sonda de detección.

BREVE DESCRIPCIÓN DE LAS FIGURAS

[020] La figura 1 muestra la expresión del ARN pequeño durante el proceso de infección de ratones BALB/c con las cepas de Mtb Beijing 323 y 391. El ARN se extrajo 3, 14, 28 y 60 días después de la infección con las respectivas cepas.

[021] La figura 2 muestra los resultados de la evaluación de la amplificación del fragmento del gen de interés (MTS2823 de 300pb) por electroforesis en gel de agarosa. **A.** en una muestra de ADN genómico a partir de la cepa de MTB H37Rv; **B.** en el producto purificado; **C.** PCR de colonias de *E. Coli* transformadas para expresar el fragmento de interés, Carril 1-12 colonias recombinantes, WM: Marcador de peso molecular, carril 13: Control negativo.

[022] La figura 3 muestra los resultados de amplificación empleando conjuntos de cebadores y sondas 1 y 3 de la invención. **A.** Curvas de amplificación; **B.** Curva de calibración.

[023] La figura 4 muestra los resultados de los ensayos de sensibilidad de detección por qPCR.

[024] La figura 5 muestra el resultado de las pruebas de especificidad de amplificación del blanco de la presente invención. **A.** Gel de agarosa que muestra la ausencia del ARN de interés (300pb) en diversos microorganismos comúnmente presentes en muestras respiratorias y de orina. De izquierda a derecha: Marcador de peso, *Staphylococcus epidermidis*, *Enterococcus faecalis*, *Proteus mirabilis*, *Klebsiella pneumoniae*, *Staphylococcus aureus*, *Escherichia coli*, *Pseudomonas aeruginosa*, Control negativo, y Control Positivo TBC H37Rv. **B.** Pruebas de especificidad realizadas mediante qPCR con los cebadores diseñados en la presente invención (amplicón de 147 pb) y su correspondiente

P-2023/6086

sonda fluorescente. Además de los microorganismos previamente mencionados, se realizaron pruebas en muestras de tres Mycobacterias atípicas: *M. avium*, *M. szulgai* y *M. kansasii*. **C.** Análisis de los resultados de qRT-PCR de muestras de ADN de microorganismos seleccionados. El panel de micobacterias atípicas incluye *M. abscessus*, *M. goodnae*, *M. avium* y *M. kansasii* y las micobacterias previamente analizadas por SYBR-green, *M. kansasii*, *M. szulgai* y *M. avium*.

[025] La figura 6 muestra los resultados de la detección en una muestra de orina del biomarcador MTS2823 por medio del método de la invención.

[026] La figura 7 ilustra la metodología empleada para la estandarización del protocolo de manejo de muestras de orina.

[027] La figura 8 muestra los resultados de la detección de MTS2823 en muestras de orina procesadas mediante dos metodologías distintas. Curva de amplificación (número de ciclos frente a fluorescencia - Δ RN) del RNA total extraído por cada método. (1) Control negativo de la qPCR; (2) Control de Transcriptasa Reversa; (3) Muestra procesada por medio del kit Quick-cfRNA™ Serum & Plasma Kit (ZYMO); (4) metodología alternativa propia; (5) control positivo correspondiente a la cepa H37RV de *M. tuberculosis*.

[028] La figura 9 muestra los resultados de la evaluación de los límites de detección. **A.** En condiciones de laboratorio y **B.** En muestras de orina intervenidas.

DESCRIPCIÓN DETALLADA DE LA INVENCION

[029] La presente invención hace referencia a métodos para diagnosticar la infección por Mtb en una muestra biológica por medio de la detección de un ARN pequeño (también llamado ARN no codificante) mediante transcripción reversa acoplada a la reacción en cadena de la polimerasa en tiempo real (RT-qPCR) o por detección por hibridación inversa en membranas de nitrocelulosa. En

particular, los métodos de la invención se basan en la detección del ARN pequeño denominado MTS2823 por medio de conjuntos de cebadores y sondas que permiten la amplificación del mismo en diversos tipos de muestras.

[030] Los métodos de la invención permiten realizar un diagnóstico *in vitro* de tuberculosis activa a partir de muestras biológicas en las que el bacilo de *Mycobacterium tuberculosis* está presente, tales como muestras de esputo, líquido pleural o jugo gástrico, y en muestras biológicas en las que el biomarcador de ARN pequeño está circulante, tales como muestras de orina, suero y plasma.

[031] En modalidad preferida, el método de acuerdo con la presente invención involucra la detección de MTS2823 luego de realizar un paso inducción con una composición de inducción en muestras de esputo, líquido pleural o jugo gástrico. En otra modalidad la detección de MTS2823 se realiza en muestras de orina, plasma o suero, sin requerir el paso de inducción.

Inducción de la expresión de MTS en muestras en donde el bacilo está presente (Esputo, líquido pleural, o jugo gástrico)

[032] De acuerdo con la primera modalidad de la invención, el método comprende la incubación con una composición de inducción. El proceso de inducción comprende las siguientes etapas:

- a) Tratar las muestras con una solución que comprende NaOH, N-acetil-L-cisteína y citrato de sodio, por toda la noche a 37°C;
- b) Centrifugar las muestras tratadas a 3500 rpm;
- c) Descartar el sobrenadante y resuspender el precipitado en la composición de inducción;
- d) Incubar la suspensión a temperatura ambiente por 4 horas;
- e) Centrifugar a 13.000 rpm por 10 minutos;
- f) Recuperar el sobrenadante para los posteriores pasos de detección.

[033] En donde la composición de inducción comprende sales de ácidos grasos de cadena larga en un buffer adecuado. En una modalidad preferida, la composición de inducción comprende una mezcla de sales de ácido palmítico, ácido esteárico y ácido oleico, preferiblemente en donde las sales son sales de sodio. En modalidades aún más preferidas, las sales están disueltas de manera independiente en etanol y buffer citrato, preferiblemente, etanol al 50% (v/v) y buffer citrato pH 4.5. En modalidades aún más preferidas, cada una de las sales se encuentran en una concentración 0,001% (p/v) en la composición de inducción.

Preparación de las muestras que no requieren inducción (Plasma, suero, u orina)

[034] De acuerdo con la segunda modalidad de la invención, el método comprende un tratamiento para la extracción del ARN presente.

[035] Preferiblemente, el tratamiento de las muestras se realiza por medio de un kit disponible en el mercado que tiene como fundamento el paso de la muestra por dos columnas, la primera remueve los RNAs largos mientras que la segunda concentra los RNAs pequeños. Más preferiblemente, las muestras se tratan empleando el kit Quick-cfRNA Serum & Plasma Kit de Zymo Research™. Sin embargo, se deberá entender que el método de la invención no se limita al uso de dicho kit, sino que comprende las alternativas conocidas en el estado de la técnica que lleguen a dicho resultado.

[036] Mas preferiblemente, cuando se trata de una muestra de orina, el tratamiento comprende la centrifugación de la muestra de orina y posterior adición de un buffer de lisis (de fabricación propia), a continuación, la mezcla se incuba a 95°C por 10 min, y se centrifuga a 12.000 rpm por alrededor de 3 min, reservándose el sobrenadante para ensayos posteriores.

Detección del biomarcador mediante RT-PCR

[037] Una vez obtenido el ARN (encontrado en el sobrenadante de la inducción o en el producto de la purificación) se procede a realizar la transcripción reversa (RT) y la qPCR.

[038] En una modalidad preferida, la síntesis de cADN comprende los siguientes pasos:

- Mezclar el extracto de ARN con una solución de dNTPs, hexámeros al azar, y agua DEPC, e incubar la mezcla a una temperatura de alrededor de 75°C por aproximadamente 5 minutos,
- Preparar una mezcla de buffer DTT, agua DEPC, inhibidor de RNAsa y Transcriptasa Reversa,
- mezclar las soluciones preparadas en los pasos anteriores e incubar a aproximadamente 25°C por alrededor de 10 min, y, en seguida, incubar a aproximadamente 50°C por alrededor de 50 min,
- finalmente, terminar la reacción a aproximadamente 85°C por aproximadamente 5 min.

[039] En otra modalidad las reacciones de retrotranscripción (RT) y reacción en cadena de la polimerasa (PCR) se llevan a cabo en un único paso.

Cebadores y sondas

[040] Tal como puede observarse en la Tabla 1, La invención comprende conjuntos de cebadores y sondas dirigidos al ARN denominado MTS2823.

Tabla 1 Características de los cebadores y sondas empleados en los métodos de la invención

Cebador o Sonda	Secuencia	SEQ ID NO:	Tamaño del Fragmento (pb)	TM (°C)
Directo 1	TGAGGCCAAGGCTCGAT	SEQ ID NO: 1	147	63
Reverso 1	GTCGATGCCATCTGCTGTTC	SEQ ID NO: 2		63
Directo 2	CACCCACGCGGAGTCATAG	SEQ ID NO: 3	131	64

P-2023/6086

Reverso 2	GTGGCCTCGGCGATCTT	SEQ ID NO: 4		64
Directo 3	TTGCGGGTCTGCGTAAT	SEQ ID NO: 5	143	61
Reverso 3	CCCACCAACACGGTTCT	SEQ ID NO: 6		61
Directo 4	TAGTACAAAGGAACCAC	SEQ ID NO: 7	300	52
Reverso 4	GAAGAACTCGAATCGC	SEQ ID NO: 8		54
Sonda 1	FamAGAAGTGTTGCGGGTCTGCGTAAT _{BHQ1}	SEQ ID NO: 9	---	68
Sonda 3	FamACAGCTAGAAGCGTCGCAAGATCG _{BHQ1}	SEQ ID NO: 10	---	68

bp: pares de bases

[041] El método de la invención se basa en un conjunto de cebadores y sondas específicamente diseñados por los inventores y dirigidos a un fragmento específico del MTS2823, los cuales permiten detectar, con alta sensibilidad y especificidad, la tuberculosis en muestras de diversas naturalezas. En particular, el método de la invención emplea los cebadores Directo 1 (SEQ ID NO: 1) y Reverso 1 (SEQ ID NO: 2), en combinación con la sonda 1 (SEQ ID NO: 9) para el diagnóstico de la tuberculosis activa.

[042] En general, las soluciones que comprenden cada uno de los cebadores y la sonda, se mezclan con una enzima polimerasa termorresistente, un buffer adecuado y una muestra de cADN obtenido previamente a partir de las muestras a analizar, para obtener una mezcla de reacción que se someterá a la etapa de amplificación.

[043] En particular, la etapa de amplificación del método de la presente invención se lleva a cabo en un termociclador y, comprende, de manera preferida:

- un ciclo inicial de denaturación a 95°C por 5 minutos,
- 30 ciclos compuestos por:
 - denaturación a 95°C por 15 segundos,
 - anillaje a 64°C por 15 segundos y
 - extensión final a 72°C por 2 minutos.

Kits

P-2023/6086

[044] Además, la presente invención hace referencia a kits para detectar la presencia de Mtb en una muestra biológica, por medio de cebadores y sondas que permiten la amplificación de un fragmento específico del ARN pequeño MTS2823. De esta forma, la invención proporciona kits que permiten realizar un diagnóstico *in vitro* de Mtb a partir de muestras biológicas, tales como muestras de suero, plasma, orina, o también de muestras de esputo, líquido gástrico o líquido pleural, después de que estas han sido sometidas a un proceso de inducción.

[045] Particularmente, el kit de acuerdo con la invención comprende composiciones que incluyen los cebadores y sondas identificadas en la tabla 1, ya sea solos o en combinación, y, opcionalmente, otras composiciones que comprendan los reactivos necesarios para llevar a cabo la detección por medio de RT-qPCR.

EJEMPLOS

[046] Los ejemplos descritos a continuación cumplen con la función de ilustrar la mejor manera conocida por los inventores para poner en práctica la invención, y no deben ser entendidos como limitaciones de la invención. De hecho, tal como podría entender el experto en la técnica, el estado de la materia proporciona información que permitiría realizar diversos cambios o modificaciones en las condiciones particulares de los métodos aquí descritos, y, que, por lo tanto, deben incluirse dentro del concepto divulgado por la presente solicitud y el alcance de las reivindicaciones adjuntas a la misma. Asimismo, todas las publicaciones, patentes y solicitudes de patente citadas aquí, se incorporan como referencia en su totalidad para todos los propósitos. Además, salvo que se indique lo contrario, debe entenderse que las técnicas de biología molecular empleadas en los ejemplos se llevan a cabo según los protocolos estándar.

A. Selección de biomarcador de interés

[047] Con el fin de desarrollar un método que permita el diagnóstico de la tuberculosis activa, los inventores comenzaron la búsqueda de un biomarcador adecuado. Para ello, los inventores llevaron a cabo estudios previos de expresión de MTS2823 en un modelo *in vitro* de crecimiento de Mtb en ácidos grasos, encontrando que dicho biomarcador se expresa desde el comienzo del crecimiento bacteriano y se incrementa a medida que progresa la misma. Además, como se observa en la Figura 1, los inventores encontraron que MTS2823 es el ARN pequeño de mayor expresión *in vivo*.

[048] Asimismo, los inventores demostraron la presencia del MTS2823 en 35 esputos de pacientes sospechosos de presentar infección por Mtb, demostrando un 100% de sensibilidad y un 92% de especificidad. Estudios adicionales permitieron el desarrollo de un sistema de hibridación reversa que demuestra la factibilidad de la utilización de este biomarcador en la detección de la infección.

B. Diseño de cebadores y sondas

[049] Se diseñaron iniciadores específicos sobre la secuencia del ARN pequeño de *Mycobacterium tuberculosis* reportada en tuberculist (<https://mycobrowser.epfl.ch/>). Teniendo en cuenta parámetros como: longitud de los cebadores (18-20 pb), temperatura de anillaje y condiciones específicas de la PCR utilizando la herramienta OligoAnalyzer v3.1. La especificidad fue evaluada realizando un análisis con la herramienta básica de alineamientos BLAST (Basic Alignment Search Tool), finalmente se descartó que los iniciadores formaran estructuras secundarias entre ellos. Los cebadores (directo y reverso) diseñados en esta primera etapa se muestran en la Tabla 1, y corresponden a las secuencias SEQ ID NO: 7 y 8, respectivamente.

[050] Como puede observarse en la Figura 2, se logró amplificar el fragmento de interés (correspondiente a las 300pb del ARN MTS2823) en muestras de MTB H37Rv (Carril 1 Figura 2 A). Una vez se corroboró la integridad del producto amplificado y se confirmó el tamaño esperado, el producto purificado y analizado (Carril 1, Figura 2B), y posteriormente clonado en células TOP 10 E. coli. El

P-2023/6086

análisis por PCR de colonias permitió verificar la presencia del fragmento de interés (Figura 2C).

[051] A continuación, se diseñaron y sintetizaron dos sondas marcadas en su extremo 5' con FAM y en su extremo 3' con BHQ1, y tres pares de cebadores directos y reversos. Estos cebadores se muestran en la Tabla 1, y corresponden a las secuencias SEQ ID NO: 1 a 6, mientras que las sondas corresponden a las SEQ ID NO: 9 y 10.

[052] Se verificó entonces la amplificación de los fragmentos respectivos empleando las sondas y los cebadores diseñados, se utilizaron 4 diluciones de plásmidos obtenidos de las colonias previamente obtenidas (19 ng/μl, 1.9 ng/μl, 0,19 ng/μl y 0,0019 ng/μl) y como control positivo de la reacción se utilizó ADN total de MTB H37Rv. Los resultados se muestran en la Figura 3. Los datos obtenidos demuestran que las dos sondas diseñadas funcionan adecuadamente para detectar el ARN de interés. De este modo, se seleccionaron los cebadores directo e inverso 1, y la sonda 1 para continuar con los análisis posteriores.

C. Sensibilidad y especificidad del método de la invención

[053] A continuación, se procedió al diseño de un control positivo específico para el kit de la invención, mediante el diseño de un conjunto adicional de cebadores y la clonación del fragmento en un plásmido de expresión araBADGIII. A partir del ARN total purificado del clon pBADIII-sRNA inducido con arabinosa, se realizaron los primeros estudios de sensibilidad del método de acuerdo con la invención, se detectaron 3,5 pg/ul del ARN pequeño.

[054] Con el fin de determinar la especificidad de los cebadores y sondas diseñados para el método de la invención, se realizaron dos pruebas:

- a. Se evaluó la amplificación de MTS2823 haciendo uso de los cebadores de SEQ ID NO: 7 y 8, verificando la presencia del fragmento de 300 pb mediante geles de agarosa. En este ensayo se incluyeron microorganismos que están presentes comúnmente en muestras

respiratorias y de orina. El control positivo para esta reacción es DNA de Mtb. Como puede observarse en la Figura 5A, este ensayo demostró que el biomarcador no está presente en los microorganismos estudiados.

- b. Se evaluó la amplificación del fragmento de 147pb haciendo uso de los cebadores de SEQ ID NO: 1 y 2 y su correspondiente sonda fluorescente (SEQ ID NO: 9). se emplearon los mismos microorganismos y se incluyeron tres ADNs correspondientes a Mycobacterias atípicas: *M. avium*, *M. szulgai* y *M. kansasii*. Como se observa en las Figuras 5B y 5C, la amplificación realizada por el método de la invención es específica para Mtb.

[055] Por lo tanto, el método de la presente invención es altamente específico. A pesar de que la muestra 3, correspondiente a *Enterococcus faecalis* presenta una amplificación en el ciclo 38, al analizar la curva melting, se observa que esta no corresponde al fragmento amplificado. Estas reacciones fueron realizadas con un ciclo de anillaje de 64°C.

[056] Tal como se observa en la Figura 5C, se usó un panel mayor de micobacterias atípicas, es decir, micobacterias no tuberculosas (MNT) aisladas de pacientes y recolectadas por el laboratorio de micobacterias de la Corporación para Investigaciones Biológicas (CIB), que incluyen *M. abscessus* (dos aislados), *M. gordonae* (dos aislados), *M. avium* (dos aislados) y *M. kansasii*. Adicionalmente si incluyeron las micobacterias previamente analizadas por SYBR-green, *M. kansasii*, *M. szulgai* y *M. avium*. Los resultados demuestran que la sonda solo detecta *M. tuberculosis* mostrando una alta especificidad.

D. Procesamiento de muestra de orina para la detección de MTS2823

[057] De manera preliminar, se realizó la evaluación de una muestra de orina de un paciente diagnosticado con Mtb. La muestra fue centrifugada a 14.000 rpm y luego 300 ul del sobrenadante fueron empleados para la extracción de RNA total. El RNA precipitado fue resuspendido en agua DEPC y empleado para la qRT-PCR, se empleó un control negativo, un primer control positivo a una

P-2023/6086

concentración de 3 ng/ul y un segundo control positivo a una concentración de 0.3 ng/ul. Como se observa en la figura 6, el biomarcador fue efectivamente identificado en la muestra.

[058] Con este resultado en mente, los inventores continuaron con el establecimiento de un protocolo de trabajo con muestras de orina. Como se ilustra en la Figura 7, para el establecimiento de un protocolo de trabajo, la orina recolectada fue inoculada con una concentración final de 1,6 ng/ml a 1,6 pg/μl del ARN total expresado por el plásmido pBADIII-sRNA. Se centrifugó a 14.000 rpm por 10 minutos, y el sobrenadante se empleó para la extracción, de acuerdo con dos metodologías:

1. Se empleó el kit Quick-cfRNA™ Serum & Plasma Kit (ZYMO), el cual consiste en: Digestión de proteínas, precipitación del RNA, unión del RNA a la columna, lavados y finalmente elución, siguiendo las recomendaciones del fabricante.
2. La extracción de ARN por medio de un proceso que comprende las etapas de:
 - Adicionar de 50 μl de buffer de lisis (de preparación propia) a 450 μl de sobrenadante de orina,
 - incubar a 95°C por 10 min,
 - centrifugar a 12.000 rpm por aproximadamente 3 min, y
 - reservar el sobrenadante,
 - extraer el ARN con perlas magnéticas, y, finalmente,
 - eluir en 20 μl de H₂O DEPC.

[059] Una vez extraído el ARN de cada una de las muestras por ambos métodos de extracción, se prosiguió con la detección del biomarcador mediante la técnica RT- qPCR de acuerdo con las condiciones previamente mencionadas (Ver Figura 8). Aun cuando no se obtienen resultados comparables a las muestras tratadas con el kit comercial, se observa amplificación del fragmento, demostrando la efectividad del método de amplificación divulgado por la presente invención.

E. Límite de detección (LOD) del fragmento de MTS2823 de *Mycobacterium tuberculosis* en condiciones de laboratorio

[060] Con el fin de determinar el límite de detección del fragmento de MTS2823 de *Mycobacterium tuberculosis*, se llevaron a cabo experimentos de transcripción “*in vitro*” que aseguran la expresión y purificación exclusivamente de dicho fragmento. Para ello se empleó el kit megascript t7 transcription kit (Thermo Fisher Scientific).

[061] Inicialmente, el fragmento de 300 pb correspondiente a la totalidad del MTS2823 fue subclonado en el vector pGEMT Easy Vector (Thermo Fisher Scientific). Este vector se caracteriza porque el fragmento insertado queda bajo el control del promotor T7 de la RNA polimerasa del virus T7. Otra característica del vector es que tiene un sitio múltiple de clonaje que facilita su linearización lo que asegura que la RNA polimerasa transcriba solamente el inserto clonado.

[062] Una vez obtenido el fragmento de interés, se procedió a determinar el LOD realizando diluciones seriadas en H₂O. La concentración inicial fue de 10 ng y se realizaron 11 diluciones en base 10 por triplicado.

[063] Así, se obtuvo una curva de calibración del transcrito sRNA-TBC generada del constructo PGEM/sRNA-TBC. Los datos de la curva corresponden al CT vs Concentración inicial (expresada en escala logarítmica) de cada dilución. Mediante regresión lineal se obtuvo el coeficiente de regresión y la pendiente que describe la línea recta (Ver Figura 9A).

Concentración ng/μl	Log [ARN]	Promedio CT
1	0	8,76333333
0,1	-1	10,2233333
0,01	-2	14,6466667
0,001	-3	18,9566667
0,0001	-4	22,3733333
0,00001	-5	25,8333333

0,000001	-6	27,9266667
0,0000001	-7	31,1633333
0,00000001	-8	35,03
0,000000001	-9	37,6233333

[064] Como se puede observar, la prueba de qPCR bajo condiciones de laboratorio es altamente sensible, con un límite de detección de 0.001 fg/μl.

F. Límite de detección (LOD) del fragmento de MTS2823 de *Mycobacterium tuberculosis* en muestras de orina intervenidas

[065] Con el fin de determinar la sensibilidad de la reacción directamente en la muestra biológica, se intervinieron 500 μl de orina con una concentración de 10 ng del ARN pequeño de Mtb purificado. Posteriormente, se realizaron diluciones seriadas con base de 10, empleando orina como matriz biológica. El ARN pequeño fue extraído con el kit Quick-cfRNATM Serum & Plasma Kit (ZYMO). Como resultado, se obtuvo la curva de calibración mostrada en la Figura 9B.

[066] Al comparar las dos curvas: a) a nivel de laboratorio y b) en la muestra biológica intervenida podemos ver como el procesamiento de la muestra disminuye en 100X el límite de detección. El LOD de la prueba de qPCR bajo condiciones reales es altamente sensible, con un límite de detección de 0.01 fg del ARN pequeño. Esta sensibilidad es muy alta para el desarrollo de un kit diagnóstico.

REFERENCIAS

¹ Peláez, E. C., Estevez, M. C., Mongui, A., Menéndez, M. C., Toro, C., Herrera-Sandoval, O. L., ... & Lechuga, L. M. (2020). Detection and quantification of HspX antigen in sputum samples using plasmonic biosensing: toward a real point-of-

care (POC) for tuberculosis diagnosis. *ACS Infectious Diseases*, 6(5), 1110-1120.

² Arnvig, K. B., & Young, D. B. (2009). Identification of small RNAs in *Mycobacterium tuberculosis*. *Molecular microbiology*, 73(3), 397-408.

³ Ostriak, A. A., Azhikina, T. L., & Salina, E. G. (2021). Small noncoding RNAs and their role in the pathogenesis of mycobacterium tuberculosis infection. *Biochemistry (Moscow)*, 86, S109-S119.

⁴ Fu, Y., Li, W., Wu, Z., Tao, Y., Wang, X., Wei, J., & Zhang, F. (2018). Detection of mycobacterial small RNA in the bacterial culture supernatant and plasma of patients with active tuberculosis. *Biochemical and biophysical research communications*, 503(2), 490-494.

⁵ Han, X., Li, T., Fan, Y., Wang, X., Gu, W., Lu, W., & Fu, Y. (2021). Screening of 20 *Mycobacterium tuberculosis* sRNAs in plasma for detection of active pulmonary tuberculosis. *Tuberculosis*, 129, 102086.

CONFIDENCIAL