

①9



OFICINA ESPAÑOLA DE
PATENTES Y MARCAS

ESPAÑA



①1 Número de publicación: **2 372 840**

②1 Número de solicitud: 201000392

⑤1 Int. Cl.:
C12Q 1/70 (2006.01)

①2

SOLICITUD DE PATENTE

A1

②2 Fecha de presentación: **24.03.2010**

④3 Fecha de publicación de la solicitud: **27.01.2012**

④3 Fecha de publicación del folleto de la solicitud:
27.01.2012

⑦1 Solicitante/s: **GENÓMICA, S.A.U.**
c/ Alcarria, 7
Polígono Industrial Coslada
28823 Coslada, Madrid, ES

⑦2 Inventor/es: **Villahermosa Jaén, María Luisa y**
Moraga Quintanilla, Ana Isabel

⑦4 Agente: **No consta**

⑤4 Título: **Kit para la detección del virus del papiloma humano.**

⑤7 Resumen:

Kit para la detección del virus del papiloma humano.

La presente invención se basa en una sonda de ADN que permite la detección específica del tipo 33 del virus del papiloma humano (VPH), al mismo tiempo que evita la detección inespecífica del tipo 31 de VPH.

Asimismo, la presente invención está relacionada con un microarray de sondas de ADN que contiene la sonda de la presente invención, con un Kit de detección de HPV que comprende dicho microarray, así como con el uso de la sonda de ADN, del microarray o del kit que la contienen, para la detección del tipo 33 de VPH en una muestra.

ES 2 372 840 A1

DESCRIPCIÓN

Kit para la detección del virus del papiloma humano.

5 Antecedentes de la invención

El virus del papiloma humano (VPH) es uno de los agentes etiológicos del cáncer de cérvix (cuello de útero) y produce la enfermedad de transmisión sexual más común entre mujeres (Bosch *et al.*, 1995, *J. Natl. Cancer Inst.*, 87: 796-802). En los últimos años se ha determinado que la infección con el VPH es la principal causa de cáncer de cuello de útero y de neoplasia cervical intraepitelial (Walboomers *et al.*, 1999, *J. Pathol.*, 189:12-19; Bosch *et al.*, 2002, *J. Clin. Pathol.*, 55: 244-265).

Cerca de 30 tipos de VPH se transmiten por medio del contacto sexual, y producen infección anogenital, clasificándose en dos grupos de riesgo según su asociación con el cáncer de cuello de útero (Dunne *et al.*, 2007, *JAMA*, 297 (8); Muñoz *et al.*, 2003, *N. Engl. J. Med.*, 348(6): 518-527): Tipos de alto y bajo riesgo oncogénico. Una correcta identificación de los tipos de VPH causantes de la infección es fundamental para poder determinar el tratamiento médico adecuado.

De entre todos los tipos de VPH, los que presentan la tasa de malignidad más elevada son el 16, 18, 31 y 33 (Berkhof *et al.*, 2006, *Cancer Epidemiol Biomarkers Prev.*, 15(7): 1268-73). Además, todas las evidencias epidemiológicas apuntan a que existe una relación directa entre estos tipos de VPH y el desarrollo del cáncer de cuello de útero (IARC Monographs on the evaluation of carcinogenic risk to humans. Human Papillomaviruses. Vol. 90. Lyon: International Agency for Research on Cancer, 2007).

Otros estudios indican que los tipos 31 y 33 son, junto con los tipos 16 y 18, de los más abundantes en casos de HSIL (high-grade squamous intraepithelial lesions) y SCC (squamous cell carcinoma of the cervix) (Clifford *et al.*, 2003, *British Journal of Cancer* 89, 101-105).

Las técnicas moleculares más empleadas y más sensibles para la detección de VPH están basadas en la Reacción en Cadena de la Polimerasa o PCR; Las dos reacciones de PCR consenso más comunes empleadas son las llamadas MY-PCR y su variante PG-MY, que contienen el conjunto de cebadores de amplificación MY11, MY09 y HMB01 (Manos *et al.*, 1989, *Cancer Cells*, 7:209-214.; Hildesheim *et al.*, 1994, *J. Infect. Dis.*, 169: 235-240; Gravitt *et al.*, 2000, *J. Clin. Microbiol.*, 38(1): 357-361), y la llamada GP-PCR, que contiene el conjunto de cebadores GP5+/GP6+ (de Roda *et al.*, 1995, *J. Gen. Virol.*, 76:1057-1062; Jacobs *et al.*, 1995, *J. Clin. Microbiol.*, 33: 901-905; Jacobs *et al.*, 1997, *J. Clin. Microbiol.*, 35:791-795).

Una vez que se ha detectado la presencia de VPH mediante una reacción de amplificación, se crea la necesidad de tiparlo; Para ello se han utilizado a lo largo del tiempo diferentes técnicas que van desde la secuenciación, pasando por el análisis con enzimas de restricción, y finalmente técnicas basadas en la hibridación de los productos de PCR con sondas complementarias depositadas en diferentes superficies (Jacobs *et al.*, 1995, *J. Clin. Microbiol.*, 33: 901-905).

Un método de diagnóstico y tipado de VPH fundamental dentro del estado de la técnica, es el descrito en WO2007017699. En él se lleva a cabo una reacción de amplificación PCR basada en los cebadores MY-PCR, seguida de tipado mediante hibridación del producto de PCR con un microarray de sondas específicas para una gran variedad de tipos de VPH, tanto de alto como de bajo riesgo oncogénico.

Estudios llevados a cabo con muestras reales a las que se sometió al método de detección de WO2007017699, revelaron que se producían hibridaciones inespecíficas del amplificado correspondiente al genotipo 31 de VPH sobre la sonda correspondiente al 33. De este modo, muestras que aparentemente contenían tanto el genotipo 31 como el 33 de VPH, cuando se analizaban mediante nested-PCR y/o secuenciación, resultaban contener sólo el tipo 31.

Las secuencias de las sondas originales para detección del producto de PCR correspondiente al tipo 33 son:

TABLA 1

Nº SEQ	Nombre sonda	Secuencia (5'→3')	nt	Tm	%GC
SEQ ID NO 1	33B1-AS	GTATATTTACCTAAGGGGTCTTCCCTTTCC	30	84	40
SEQ ID NO 2	33A2	TACTGTCAGTACTTGTGTGCATAAAG	30	82	36,7

El análisis de los alineamientos entre el genotipo 31 y las sondas correspondientes al genotipo 33 no justificaba la hibridación cruzada que se observaba en la realidad entre ambos (Figura 1), al no presentar una identidad entre las secuencias que hiciera obvia para un experto en la materia la existencia de una posible hibridación; Por ese motivo, la información técnica de que se disponía no aportaba ninguna indicación acerca de cómo resolver el problema de la hibridación cruzada.

Descripción de la invención

Había, por tanto, que resolver el problema de la hibridación inespecífica del genotipo 31 con la sonda correspondiente al 33.

La solución a ese problema la aportó la sonda de ADN según la reivindicación N° 1, la sonda de secuencia SEQ ID NO 3.

Con la sonda de ADN según la reivindicación N° 1 (Sonda de secuencia SEQ ID NO 3, Tabla 2), se ha conseguido evitar la hibridación inespecífica con VPH del tipo 31, así como hibridaciones inespecíficas con otros tipos de VPH de secuencia similar, al mismo tiempo que se consigue una hibridación específica con VPH de tipo 33.

Con otras sondas de nuevo diseño, diseñadas siguiendo el mismo criterio que para el diseño de la sonda de secuencia SEQ ID NO 3 (Sondas de secuencias SEQ ID NO 4, SEQ ID NO 5, SEQ ID NO 6, y SEQ ID NO 7 de la Tabla 2), se conseguía evitar la hibridación inespecífica de VPH del tipo 31 que tenía lugar con las sondas originales de secuencias SEQ ID NO 1 y SEQ ID NO 2, pero se perdía la capacidad para detectar el propio VPH de tipo 33.

TABLA 2

N° SEQ	Nombre sonda	Secuencia (5'→3')	nt	Tm	%GC
SEQ ID NO 3	T33A2.1-A-AR	CTGTCACTAGTTACTTGTGTGCA	23	66	43,5
SEQ ID NO 4	T33B1.2-A-AR	GTATATTTACCTAAGGGGTC	20	56	40
SEQ ID NO 5	T33B1.3-A-AR	CCTTTTCCTTTGGAGGTA CTG	21	62	47,6
SEQ ID NO 6	T33B1.4-A-AR	GTATATTTACCTAAGGGGTCTTCC	24	68	41,7
SEQ ID NO 7	T33B1.5-A-AR	CTTCCTTTTCCTTTGGAGGTA CTG	24	70	45,8

El hecho de que con las sondas de secuencias SEQ ID NO 4, SEQ ID NO 5, SEQ ID NO 6, y SEQ ID NO 7 no se consiga detectar VPH de tipo 33 no es debido a motivos de secuencia, dado que un análisis *in silico* arroja datos de una perfecta complementariedad entre dichas sondas y la secuencia de ADN de HPV de tipo 33 (Figura 2).

Además, tanto la sonda de secuencia SEQ ID NO 3 de la presente invención, como las sondas de secuencias SEQ ID NO 4, SEQ ID NO 5, SEQ ID NO 6, y SEQ ID NO 7, presentan unas características similares entre sí, tanto en cuanto a longitud (número de nucleótidos, nt), como a parámetros como el de la Temperatura de Melting (Tm), porcentaje de GC, y otros parámetros termodinámicos.

Por tanto, nada hacía evidente, ni a la vista de los alineamientos de la Figura 2, ni a la vista de las características de las distintas sondas de nuevo diseño (Tabla 2), que la única sonda que conseguiría evitar la hibridación inespecífica del tipo 31, y de otros tipos de VPH de secuencia similar, y a la vez fuera capaz de detectar el propio tipo 33, sería la sonda de secuencia SEQ ID NO 3 de la presente invención.

Además, la sonda de secuencia SEQ ID NO 3 es muy similar a la sonda original de secuencia SEQ ID NO 2 (ver Tablas 1 y 2), y sin embargo, a diferencia de ella, no se produce hibridación de la misma con VPH de tipo 31.

Los inventores de la presente invención han comprobado que ligeras variaciones en la longitud de la sonda de secuencia SEQ ID NO 3, en particular, variaciones de 1, 2, 3 o más nucleótidos, afectan de manera significativa a las características funcionales de la sonda de secuencia SEQ ID NO 3.

Un primer aspecto de la presente invención consiste pues en la sonda de ADN de secuencia SEQ ID NO 3.

Otro aspecto de la presente invención es el uso de dicha sonda de ADN para llevar a cabo la detección del tipo 33 de VPH.

La sonda de la presente invención puede encontrarse formando parte de un microarray de sondas de ADN, el cual puede contener sondas específicas para la detección de uno o más tipos de VPH, y cuya finalidad es la detección y el tipado de VPH presente en una muestra.

Otro aspecto de la presente invención es un Kit para la detección de uno o más tipos de VPH, que contiene un microarray que a su vez contiene la sonda de ADN de secuencia SEQ ID NO 3.

Descripción de las figuras

Figura 1

5 La figura 1 muestra un alineamiento de las secuencias de ADN correspondientes a los tipos 31 y 33 de HPV. En ella se señala la posición en la que hibridan las sondas de secuencias SEQ ID NO 1 y SEQ ID NO 2, diseñadas para detección específica del tipo 33. Asimismo, se indica la posición en la que hibridan las sondas de secuencias SEQ ID NO 8 y SEQ ID NO 9, específicas para la detección de VPH de tipo 31.

Figura 2

10 Ejemplos representativos del análisis *in silico* de la identidad entre las sondas de secuencias SEQ ID NO 3, SEQ ID NO 4, SEQ ID NO 5, SEQ ID NO 6, y SEQ ID NO 7, y las secuencias de las bases de datos del GenBank.

Figura 3

20 Visualización de la hibridación de un mismo amplificado correspondiente a una muestra, positiva para el tipo 31 y negativa para el tipo 33, con un microarray que contiene las sondas originales de secuencias SEQ ID NO 1 y SEQ ID NO 2 para detección del tipo 33 (panel A) y con un microarray que contiene la sonda según la presente invención, de secuencia SEQ ID NO 3, para detección del tipo 33 (panel B). Las sondas para detección del tipo 31 presentes en el microarray son las sondas de secuencias SEQ ID NO 8 y SEQ ID NO 9.

25 Tanto el microarray del panel A como del B, incluyen marcadores de posición, que se muestran rodeados por un cuadrado, así como sondas para la detección de los controles de amplificación de ADN, que se indican con la reseña "ADN". En la Figura se indican, además, las señales correspondientes a los tipos 31 y 33.

30 Descripción detallada de la invención

Con el fin de resolver el problema de la hibridación inespecífica del genotipo 31 con la sonda correspondiente al 33 se diseñaron nuevas sondas de detección para el tipo 33. Para ello se empleó el programa Oligo 6 (Molecular Biology Insights, Inc). Se seleccionaron sondas de un tamaño menor a las ya existentes (ver Tabla 1), pero manteniendo un contenido en Guaninas/Citosinas (G/C) de entre el 40-60%, y una temperatura de melting (T_m) cuyo valor máximo fuera de 15°C por encima de la Temperatura de Hibridación.

El resultado fueron las sondas de ADN de la Tabla 2.

40 En una realización particular de la presente invención, las sondas de ADN se inmovilizan en un microarray. Los soportes empleados y la tipología de los microarrays pueden ser variados, pudiendo tratarse de microarrays de alta o baja densidad en soporte de cristal (Tecnología CLART[®], mostrada por ejemplo en WO2007017699), o soporte líquido (Tecnología Luminex) hasta macroarrays de nitrocelulosa (Tecnología Lipa); y con diferente tecnología de mareaje como la fluorescencia o la precipitación de distintos compuestos (Bodrossy & Sessitsch, 2004, *Current Opinión in Microbiology*, 7(3): 245-254).

Una realización particular de la presente invención consiste en un microarray de sondas de ADN inmovilizadas sobre soporte de plástico, en particular, de poliestireno.

50 En una realización particular de la presente invención, el microarray contiene una o más sondas de ADN diseñadas para la detección del tipo 33 (Tabla 2). El microarray puede contener además una o más sondas para la detección de uno o más tipos diferentes de VPH, hasta un total de 35 tipos diferentes de HPV, así como sondas para detección de uno o más controles. Algunos ejemplos de sondas posibles son los recogidos en WO2007017699. El microarray puede contener además, uno o más marcadores de posición, los cuales preferiblemente son sondas biotiniladas.

55 En una realización particular de la presente invención, el microarray de la presente invención puede estar contenido en un portaobjetos o en un tubo de reacción. Este último puede presentarse en distintos formatos, que incluyen desde tubos individuales de reacción, a conjuntos de tubos de reacción dispuestos en forma de tiras o placas. Estas últimas están compuestas por pocillos independientes, cada uno de los cuales contiene un microarray, y que, a su vez, pueden organizarse en tiras de pocillos.

De este modo, los microarrays de la presente invención pueden estar contenidos en un tubo de reacción individual, así como en tiras de tubos, cada una de los cuales contiene un microarray, así como en placas de pocillos.

65 Preferiblemente cada tira de tubos contiene 8 tubos de reacción, y cada placa de pocillos es del tipo microtiter plate, preferiblemente compuesta por 96 pocillos.

En una realización particular, el microarray de la presente invención está inmovilizado en un soporte sólido. Dicho soporte sólido puede estar contenido en un tubo de reacción, el cual puede ser individual, o formar parte de una tira de tubos de reacción, o bien estar contenido en un pocillo dentro de una placa de pocillos. Según otra realización de la presente invención, el soporte sólido en que se inmoviliza el microarray es el propio fondo del tubo de reacción o pocillo. El tubo de reacción y el pocillo pueden estar en cualquiera de los formatos arriba mencionados (tubo de reacción individual, o miembro de una tira de tubos de reacción, o bien pocillo dentro de una placa de pocillos, individuales o dispuestos en tiras de pocillos).

En una realización particular de la presente invención, las sondas de ADN del microarray se inmovilizan en el correspondiente soporte sólido gracias a la presencia de un grupo amino en el extremo 5' de la sonda de ADN.

Para realizar el análisis de subtipos de VPH presentes en una muestra, en una realización particular de la presente invención la muestra es amplificada mediante la técnica de PCR, previamente a la hibridación con las sondas específicas de tipo.

Cada tubo de amplificación contiene todos los reactivos necesarios para realizar una amplificación a partir del ADN. En una realización particular, el tubo de reacción contiene nucleótidos (dNTPs), enzima Taq polimerasa, MgCl₂, buffer de la enzima y una mezcla de cebadores -marcados con biotina- específicos para la amplificación de hasta 35 subtipos de VPH basados en la bibliografía (Manos *et al.*, 1989, *Cancer Cells*, 7:209-214; Hildesheim *et al.*, 1994, *J. Infect. Dis.*, 169: 235-240). La estrategia radica en que la región a amplificar está altamente conservada y se emplean estos cebadores que contienen las degeneraciones que contemplan los diferentes subtipos a detectar.

En una realización particular de la presente invención, el sistema de detección de los productos amplificados de una muestra se basa en la precipitación de un producto insoluble en aquellas zonas del microarray en las que se produce la hibridación de los productos amplificados con las sondas específicas. Durante la PCR, los productos amplificados se marcan con biotina bien debido a que los diferentes cebadores están marcados con esta molécula en su extremo 5', bien debido a la incorporación de nucleótidos marcados con biotina. Después de la amplificación, estos productos se hibridan con sus respectivas sondas específicas a las que son complementarias, que están inmovilizadas en zonas concretas y conocidas del microarray. Después se incuba con un conjugado de estreptavidina-peroxidasa. El conjugado se une a través de la estreptavidina con la biotina presente en los productos amplificados (que a su vez se encuentran unidos a sus sondas específicas) y la actividad peroxidasa provoca la aparición de un producto insoluble en presencia del sustrato TMB (3,3',5,5'-tetrametilbenzidina), que precipita sobre las zonas del microarray en las que tiene lugar la hibridación. Alternativamente, se puede usar como sustrato o-Dianisidina, o sustratos que produzcan el mismo efecto. La presente invención admite cualquier otra forma de mapeo de los amplificados y de visualización de la hibridación de los mismos con sus correspondientes sondas de ADN.

Preferiblemente, el tubo de amplificación de la presente invención incluye reactivos para llevar a cabo un control de extracción de ADN y de amplificación. En una realización particular de la presente invención, el tubo de amplificación también contiene dos cebadores, CFTR-F4 y CFTR-R5 que amplifican un fragmento del gen CFRT humano (acrónimo del inglés Cystic Fibrosis Transmembrane Regulator, "regulador de la conductancia transmembrana de la fibrosis quística") de un tamaño de 892 pares de bases, que constituye el control de extracción de ADN genómico, el cual es necesario para la confirmación de un verdadero resultado negativo, ya que nos informa de la presencia de ADN del paciente en la muestra, aunque no haya habido amplificación de ningún tipo de VPH. Estos mismos cebadores también amplifican una región de 1202 pares de bases de un plásmido recombinante que ha sido construido, a partir del plásmido pBSK (pBluescript® II SK(+), Stratagene) e insertado en pGEM-T (pGEM-T easy vector system, Promega) para que sea el control de amplificación del tubo, por lo tanto este plásmido está inserto en la mezcla de reacción de la PCR. Este control nos permitirá distinguir entre los casos de inhibición de la reacción de PCR y aquéllos en los que no se encontró ADN en la muestra. La reacción de amplificación estará desplazada siempre hacia los fragmentos más pequeños favoreciendo la amplificación de VPH frente al resto.

Con las sondas de la Tabla 2, se consiguió eliminar la hibridación inespecífica del amplificado correspondiente a VPH de tipo 31 con la sonda correspondiente al tipo 33, que tenía lugar cuando el microarray contenía las sondas originales de secuencias SEQ ID NO 1 y SEQ ID NO 2. Sin embargo, con las sondas de secuencias SEQ ID NO 4, SEQ ID NO 5, SEQ ID NO 6, y SEQ ID NO 7, se perdía la capacidad para detectar el propio VPH de tipo 33, por motivos que se desconocen, pero que no se deben a una falta de complementariedad entre las secuencias de las sondas y la secuencia del amplificado de VPH 33 (Figura 2).

La única sonda, pues, que cumple el doble propósito de eliminar la hibridación inespecífica del amplificado correspondiente a VPH de tipo 31 con la sonda correspondiente al tipo 33, y de detectar el propio VPH de tipo 33, es la sonda de secuencia SEQ ID NO 3 de la Tabla 2 (sonda según la reivindicación N° 1 de la presente invención).

Un aspecto fundamental de la presente invención es un Kit para la detección de uno o más tipos de VPH, que contiene un microarray que a su vez contiene la sonda de ADN de secuencia SEQ ID NO 3 para la detección de VPH de tipo 33. Este kit, así como el propio microarray, constituyen una posible aplicación industrial de la presente invención.

ES 2 372 840 A1

El kit de la presente invención puede además contener, además de la sonda de ADN de secuencia SEQ ID NO 3 para detección del tipo 33 de VPH, al menos una de las sondas de secuencias SEQ ID NO 8 y SEQ ID NO 9 para detección de VPH del tipo 31.

5 Además del microarray, el kit de la presente invención puede contener una mezcla de reactivos para la amplificación del ADN presente en una muestra y/o reactivos para la visualización de la hibridación entre el producto amplificado y las sondas del microarray.

10 Ejemplos

Los ejemplos que se muestran son sólo ilustrativos de la presente invención, sin que los aspectos técnicos contenidos en ellos puedan constituir una limitación del alcance de dicha invención.

15 Ejemplo 1

Se analizaron 30 muestras clínicas donde estaban representados los siguientes resultados: muestras positivas sólo para el genotipo 31, muestras positivas sólo para el genotipo 33, muestras con resultado previo positivo para el genotipo 20 31 y 33 pero cuyo resultado para el genotipo 33 constituía un falso positivo de la técnica, y muestras con coinfección real.

Para ello, se llevó a cabo la extracción de ADN de cada una de las muestras, se sometió el material extraído de cada una de las muestras a una amplificación mediante PCR, y se hibridó una parte de cada amplificado con un microarray 25 en que estaban presentes las sondas originales de secuencias SEQ ID NO 1 y SEQ ID NO 2 (Tabla 1) para detección de VPH de tipo 33, y otra parte de cada amplificado con un microarray que contenía la sonda de secuencia SEQ ID NO 3 de la presente invención (Tabla 2). Alternativamente, se emplearon microarrays que contenían una o más sondas de secuencias SEQ ID NO 4, SEQ ID NO 5, SEQ ID NO 6, y SEQ ID NO 7, (Tabla 2), los cuales dieron un resultado negativo para la muestra positiva para el tipo 33 de VPH (datos no mostrados).

30 Finalmente, se llevó a cabo la detección de la presencia del producto insoluble en aquellas zonas del microarray en las que se había producida la hibridación de los productos amplificados con sondas del microarray.

Cada tubo de amplificación contenía todos los reactivos necesarios para realizar una amplificación a partir del 35 ADN. En concreto, nucleótidos (dNTPs), enzima Taq polimerasa, MgCl₂, buffer de la enzima y una mezcla de cebadores -marcados con biotina- específicos para la amplificación de hasta 35 subtipos de VPH basados en la bibliografía (Manos *et al.*, 1989, *Cancer Cells*, 7:209-214; Hildesheim *et al.*, 1994, *J. Infect. Dis.*, 169: 235-240).

A modo de control, el tubo de amplificación también contiene dos cebadores, CFTR-F4 y CFTR-R5 que amplifican un fragmento del gen CFRT humano (acrónimo del inglés Cystic Fibrosis Transmembrane Regulator, “regulador de la conductancia transmembrana de la fibrosis quística”) de un tamaño de 892 pares de bases, que constituye el control de extracción de ADN genómico, el cual es necesario para la confirmación de un verdadero resultado negativo, ya que nos informa de la presencia de ADN del paciente en la muestra, aunque no haya habido amplificación de ningún tipo de VPH. Estos mismos cebadores también amplifican una región de 1202 pares de bases de un plásmido 45 recombinante que ha sido construido, a partir del plásmido pBSK (pBluescript® II SK(+), Stratagene) e insertado en pGEM-T (pGEM-T easy vector system, Promega) para que sea el control de amplificación del tubo, por lo tanto este plásmido está inserto en la mezcla de reacción de la PCR. Este control nos permitirá distinguir entre los casos de inhibición de la reacción de PCR y aquéllos en los que no se encontró ADN en la muestra. La reacción de amplificación estará desplazada siempre hacia los fragmentos más pequeños favoreciendo la amplificación de VPH frente 50 al resto.

La visualización de la hibridación amplificado-sonda se llevó a cabo mediante incubación con un conjugado de estreptavidina-peroxidasa, el cual se une a través de la estreptavidina con la biotina presente en los productos amplificados (que a su vez se encuentran unidos a sondas del microarray). La actividad peroxidasa provoca la aparición de 55 un producto insoluble en presencia del sustrato TMB (3,3',5,5'-tetrametilbenzidina), que precipita sobre las zonas del microarray en las que tiene lugar la hibridación.

La visualización de los dos microarrays correspondientes a una misma muestra se llevó a cabo en paralelo.

60 En la figura 3 se muestra un ejemplo representativo de la visualización de la hibridación de un mismo amplificado correspondiente a una muestra, positiva para el tipo 31 y negativa para el tipo 33, con un microarray que contiene las sondas originales de secuencias SEQ ID NO 1 y SEQ ID NO 2 para detección del tipo 33 (panel A) y con un microarray que contiene la sonda según la presente invención, de secuencia SEQ ID NO 3, para detección del tipo 33 (panel B). Las sondas para detección del tipo 31 son las sondas de secuencias SEQ ID NO 8 y SEQ ID NO 9. Tanto el 65 microarray del panel A como del B, incluyen marcadores de posición, que se muestran rodeados por un cuadrado, así como sondas para la detección de los controles de amplificación, que se indican con la reseña “ADN”. En la Figura se indican, además, las señales correspondientes a los tipos 31 y 33.

ES 2 372 840 A1

Ejemplo 2

Con el fin de evaluar la funcionalidad de la sonda y microarray de la presente invención en el marco de un sistema de detección que permita la identificación adicional de otros tipos diferentes de VPH, se llevó a cabo el análisis de 310 muestras reales en las que estuviese representado un gran número de genotipos diferentes de VPH, con un kit que comprende un microarray en que está presente: la sonda de secuencia SEQ ID NO 3 de la presente invención para detección de VPH de tipo 33, las sondas de secuencias SEQ ID NO 8 y SEQ ID NO 9 para la detección de VPH de tipo 31, y sondas específicas para cada uno de los otros genotipos de VPH detectados.

En la tabla 3 se muestra el resultado obtenido para los distintos genotipos, así como los parámetros diagnósticos de especificidad y sensibilidad para cada genotipo.

TABLA 3

Análisis de los parámetros diagnósticos del Kit para la detección de distintos genotipos de VPH, mediante el uso de un microarray de sondas en que están presentes las sondas de secuencias SEQ ID NO 3, SEQ ID NO 8 y SEQ ID NO 9 de la presente invención. En la columna 1 se muestra el genotipo analizado. En las columnas 2 y 3, los valores de Sensibilidad y Especificidad, respectivamente

Genotipo	Sensibilidad	Especificidad
6	94,12	100
11	100,00	100
16	100,00	100
18	100,00	100
26	100,00	100
31	100,00	100
33	100,00	100
35	100,00	100
39	100,00	100
40	100,00	100
42	100,00	100
43	100,00	100
44	100,00	100
45	100,00	100
51	100,00	100
52	100,00	100
53	96,97	100
54	100,00	100
56	100,00	100
58	96,30	100
59	100,00	100
61	100,00	100
62	94,12	100
66	100,00	100
68	100,00	100
70	100,00	100
71	100,00	100
72	100,00	100
73	100,00	100
81	100,00	100
82	100,00	100
83	100,00	100
84	94,44	100
89	100,00	100
Total	98,87	100

REIVINDICACIONES

1. Sonda de ADN de secuencia SEQ ID NO 3.

5

2. Uso de la sonda de ADN de secuencia SEQ ID NO 3 para llevar a cabo la detección del tipo 33 de VPH.

3. Microarray de sondas para detección de uno o más tipos de VPH, **caracterizado** en que el microarray contiene la sonda de ADN de secuencia SEQ ID NO 3.

10

4. Microarray según la reivindicación 3, que contiene, además de la sonda de ADN de secuencia SEQ ID NO 3 para detección de VPH de tipo 33, al menos una de las sondas de secuencias SEQ ID NO 8 y SEQ ID NO 9, para detección de VPH del tipo 31.

15

5. Kit para la detección de uno o más tipos de VPH, que contiene un microarray de acuerdo con la reivindicación 3.

20

6. Kit de detección según la reivindicación 4, en el cual el microarray contiene, además de la sonda de ADN de secuencia SEQ ID NO 3 para detección del tipo 33 de VPH, al menos una de las sondas de secuencias SEQ ID NO 8 y SEQ ID NO 9, para detección de VPH del tipo 31.

25

7. Kit de detección según las reivindicaciones 4 y 5, que contiene, además del microarray de sondas, una mezcla de reactivos para la amplificación del ADN presente en la muestra a analizar y/o reactivos para la visualización de la hibridación entre el producto amplificado y las sondas del microarray.

30

35

40

45

50

55

60

65

ES 2 372 840 A1

Figura 2

SEQ ID NO 3	T33A2.1-A-AR	CTGTCACTAGTTACTTGTGTGCA
-------------	--------------	-------------------------

> [gb|GU797245.1|](#) Human papillomavirus isolate 10071 L1 protein gene, partial cds
Length=453

Score = 46.1 bits (23), Expect = 0.002
Identities = 23/23 (100%), Gaps = 0/23 (0%)
Strand=Plus/Minus

```
Query 1      CTGTCACTAGTTACTTGTGTGCA  23
             |||
Sbjct 111    CTGTCACTAGTTACTTGTGTGCA  89
```

SEQ ID NO 4	T33B1.2-A-AR	GTATATTTACCTAAGGGGTC
-------------	--------------	----------------------

> [gb|GQ479019.1|](#) Human papillomavirus type 33 isolate 8 major capsid protein L1 (L1) gene, complete cds
Length=1500

Score = 40.1 bits (20), Expect = 0.050
Identities = 20/20 (100%), Gaps = 0/20 (0%)
Strand=Plus/Minus

```
Query 1      GTATATTTACCTAAGGGGTC  20
             |||
Sbjct 1331   GTATATTTACCTAAGGGGTC  1312
```

SEQ ID NO 5	T33B1.3-A-AR	CCTTTTCCTTTGGAGGTACTG
-------------	--------------	-----------------------

> [gb|GQ479019.1|](#) Human papillomavirus type 33 isolate 8 major capsid protein L1 (L1) gene, complete cds
Length=1500

Score = 42.1 bits (21), Expect = 0.019
Identities = 21/21 (100%), Gaps = 0/21 (0%)
Strand=Plus/Minus

```
Query 1      CCTTTTCCTTTGGAGGTACTG  21
             |||
Sbjct 1309   CCTTTTCCTTTGGAGGTACTG  1289
```

SEQ ID NO 6	T33B1.4-A-AR	GTATATTTACCTAAGGGGTCTCC
-------------	--------------	-------------------------

> [gb|GQ479019.1|](#) Human papillomavirus type 33 isolate 8 major capsid protein L1 (L1) gene, complete cds
Length=1500

ES 2 372 840 A1

Score = 48.1 bits (24), Expect = 5e-04
Identities = 24/24 (100%), Gaps = 0/24 (0%)
Strand=Plus/Minus

```
Query 1      GTATATTTACCTAAGGGGTCTTCC 24
            |||
Sbjct 1331   GTATATTTACCTAAGGGGTCTTCC 1308
```

SEQ ID NO 7	T33B1.5-A-AR	CTTCCTTTTCCTTTGGAGGTACTG
-------------	--------------	--------------------------

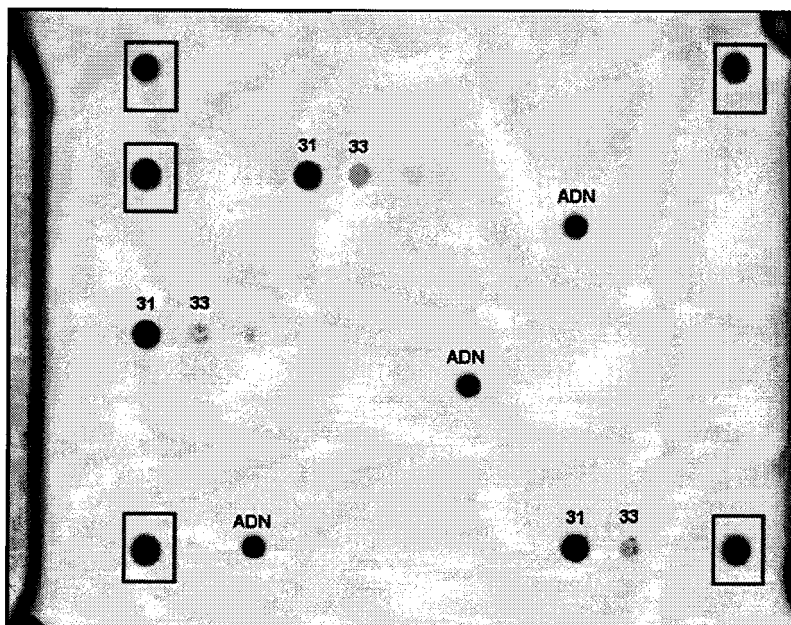
> [gb|GQ479019.1|](#) Human papillomavirus type 33 isolate 8 major capsid protein L1 (L1) gene, complete cds
Length=1500

Score = 48.1 bits (24), Expect = 5e-04
Identities = 24/24 (100%), Gaps = 0/24 (0%)
Strand=Plus/Minus

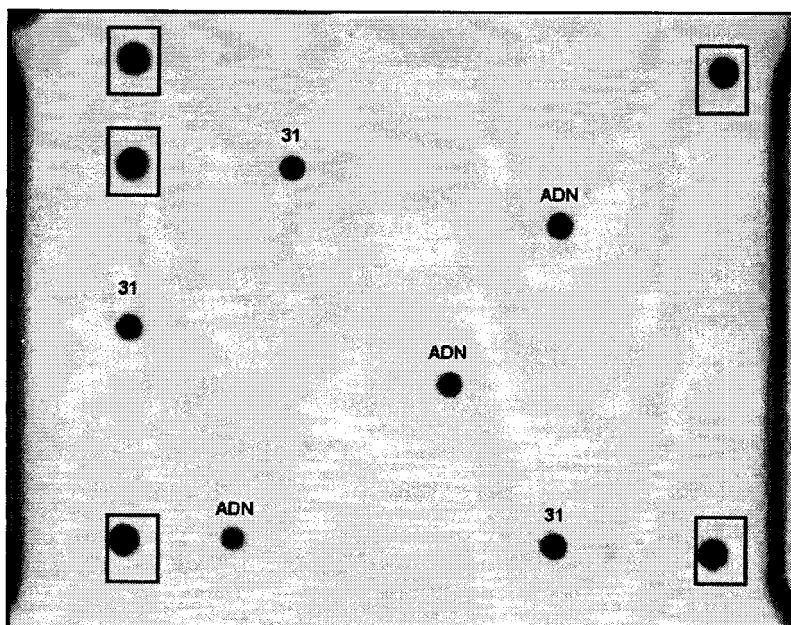
```
Query 1      CTTCCTTTTCCTTTGGAGGTACTG 24
            |||
Sbjct 1312   CTTCCTTTTCCTTTGGAGGTACTG 1289
```

Figura 3

A.



B.



ES 2 372 840 A1

LISTA DE SECUENCIAS

<110> GENOMICA S.A.U.

5 <120> Kit para la detección del virus del papiloma humano.

<130> P201000392

10 <140> P201000392

<141> 2010-03-24

<160> 9

15

<170> PatentIn version 3.3

<210> 1

20 <211> 30

<212> DNA

<213> Secuencia artificial

25

<223> 33B1-AS

<400> 1

30

gtatatttac ctaaggggtc ttccttttcc

30

<210> 2

35 <211> 30

<212> DNA

<213> Secuencia artificial

<223> 33A2

40

<400> 2

45

tactgtcact agttacttgt gtgcataaag

30

<210> 3

<211> 23

50 <212> DNA

<213> Secuencia artificial

<223> T33A2.1-A-AR

55

<400> 3

60

ctgtcactag ttacttgtgt gca

23

<210> 4

<211> 20

<212> DNA

65 <213> Secuencia artificial

<223> T33B1.2-A-AR

ES 2 372 840 A1

	<400> 4			
		gtatatttac ctaaggggtc		20
5	<210> 5			
	<211> 21			
	<212> DNA			
	<213> Secuencia artificial			
10	<223> T33B1.3-A-AR			
	<400> 5			
15		ccttttcctt tggagggtact g		21
	<210> 6			
	<211> 24			
	<212> DNA			
20	<213> Secuencia artificial			
	<223> T33B1.4-A-AR			
25	<400> 6			
		gtatatttac ctaaggggtc ttcc		24
	<210> 7			
30	<211> 24			
	<212> DNA			
	<213> Secuencia artificial			
35	<223> T33B1.5-A-AR			
	<400> 7			
40		cttccttttc ctttggagggt actg		24
	<210> 8			
	<211> 30			
	<212> DNA			
45	<213> Secuencia artificial			
	<223> 31A-AS			
50	<400> 8			
		tgtagtatca ctgtttgcaa ttgcagcaca		30
	<210> 9			
55	<211> 30			
	<212> DNA			
	<213> Secuencia artificial			
60	<223> 31B5			
	<400> 9			
65		agaacctgag ggagggtgtgg tcaatccaaa		30



OFICINA ESPAÑOLA
DE PATENTES Y MARCAS

ESPAÑA

②① N.º solicitud: 201000392

②② Fecha de presentación de la solicitud: 24.03.2010

③② Fecha de prioridad:

INFORME SOBRE EL ESTADO DE LA TÉCNICA

⑤① Int. Cl.: **C12Q1/70** (2006.01)

DOCUMENTOS RELEVANTES

Categoría	Documentos citados	Reivindicaciones afectadas
A	WO 2007017699 A2 (GENOMICA SAU) 15.02.2007, todo el documento. Citado en la solicitud	1-7
A	YANG G. et al., "The development and clinical application of human papillomavirus genotyping by DNA chip" Zhonghua Liuxingbingxue Zazhi (2006), 27(1), pág. 47-49. Página 48 tabla1.	1-7
A	JIN Y. et al. "Development and clinical application of male human papillomavirus genotyping by membrane DNA chip" Zhonghua Nankexue Zazhi (2008), 14(2), pág. 106-109. Página 107, tabla 1.	1-7

Categoría de los documentos citados

X: de particular relevancia

Y: de particular relevancia combinado con otro/s de la misma categoría

A: refleja el estado de la técnica

O: referido a divulgación no escrita

P: publicado entre la fecha de prioridad y la de presentación de la solicitud

E: documento anterior, pero publicado después de la fecha de presentación de la solicitud

El presente informe ha sido realizado

para todas las reivindicaciones

para las reivindicaciones nº:

Fecha de realización del informe
13.12.2011

Examinador
M. Hernández Cuellar

Página
1/4

Documentación mínima buscada (sistema de clasificación seguido de los símbolos de clasificación)

C12Q

Bases de datos electrónicas consultadas durante la búsqueda (nombre de la base de datos y, si es posible, términos de búsqueda utilizados)

INVENES, EPODOC

Fecha de Realización de la Opinión Escrita: 13.12.2011

Declaración

Novedad (Art. 6.1 LP 11/1986)	Reivindicaciones 1-7	SI
	Reivindicaciones	NO
Actividad inventiva (Art. 8.1 LP11/1986)	Reivindicaciones 1-7	SI
	Reivindicaciones	NO

Se considera que la solicitud cumple con el requisito de aplicación industrial. Este requisito fue evaluado durante la fase de examen formal y técnico de la solicitud (Artículo 31.2 Ley 11/1986).

Base de la Opinión.-

La presente opinión se ha realizado sobre la base de la solicitud de patente tal y como se publica.

1. Documentos considerados.-

A continuación se relacionan los documentos pertenecientes al estado de la técnica tomados en consideración para la realización de esta opinión.

Documento	Número Publicación o Identificación	Fecha Publicación
D01	WO 2007017699 A2 (GENOMICA SAU)	15.02.2007
D02	YANG G. et al., "The development and clinical application of human papillomavirus genotyping by DNA chip" Zhonghua Liuxingbingxue Zazhi (2006), 27(1), pág. 47-49. Página 48 tabla1.	
D03	JIN Y. et al. "Development and clinical application of male human papillomavirus genotyping by membrane DNA chip" Zhonghua Nanxue Zazhi (2008), 14(2), pág. 106-109. Página 107, tabla 1.	

2. Declaración motivada según los artículos 29.6 y 29.7 del Reglamento de ejecución de la Ley 11/1986, de 20 de marzo, de Patentes sobre la novedad y la actividad inventiva; citas y explicaciones en apoyo de esta declaración

La presente solicitud de patente se refiere a la identificación y genotipado del virus del papiloma humano (VPH). En particular, la invención reivindica la sonda correspondiente a SEQ ID NO 3 que hibrida específicamente con el subtipo 33 de VPH y al mismo tiempo evita la hibridación inespecífica con VPH 31. La invención también reivindica microarray y kit para la detección de VPH.

1.- NOVEDAD

Ninguno de los documentos citados en el informe de búsqueda describe una sonda idéntica a la sonda correspondiente a SEQ ID NO 3. En consecuencia, en opinión de esta Oficina, las reivindicaciones 1-7 cumplen el requisito de novedad del Art. 6.1 LP.

2.- ACTIVIDAD INVENTIVA

El problema identificado en la presente solicitud parte del documento D01. Este documento de patente describe un método de diagnóstico y genotipado de VPH en el que se han detectado hibridaciones inespecíficas del amplificado correspondiente al genotipo 31 de VPH sobre la sonda correspondiente al 33. La solución propuesta en la presente invención es la sonda correspondiente a SEQ ID NO 3: 5'CTGTCAGTACTTGTGTGCA 3' que hibrida específicamente con el subtipo 33 de VPH y al mismo tiempo evita la hibridación inespecífica con VPH 31.

El documento D02 en la tabla 1 de la página 48 describe la sonda específica de VPH 33:

5'CTGTCAGTACTTGTGTGC 3'.

El documento D03 en la tabla 1 de la página 107 describe la sonda específica de VPH 33:

5'CTGTCAGTACTTGTGTGC 3'.

La sonda que proporciona la invención se diferencia de las sondas descritas en D01 y D02 en el último nucleótido de adenina situado en el extremo 3'. No obstante, el solicitante indica en la página 3 de su memoria que "ligeras variaciones en la longitud de la sonda SEQ ID NO 3, en particular, variaciones de 1, 2, 3 o más nucleótidos, afectan de manera significativa a las características funcionales de la sonda de secuencia SEQ ID NO 3". En este sentido, esta Oficina considera que las reivindicaciones 1-7 cumplen con el requisito de actividad inventiva recogido en el Art. 8.1 LP.